

**Identifikation des Interleukin-23 Rezeptors und
Fc μ R als neue Substrate der Metalloproteasen
ADAM10 und ADAM17
und
die Rolle des *scaffolding* Proteins SAP97 in der
Proteolyse des Interleukin-6 Rezeptors**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Manuel Franke
aus Neuss

Neuss, Juni 2016

aus dem **Institut für Biochemie und Molekularbiologie II**, Medizinische Fakultät, der
Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.16

Für Sonja

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Limitierte Proteolyse von Membranproteinen reguliert zelluläre Vorgänge	1
1.2 Limitierte Proteolyse wird vermittelt durch Mitglieder der membranständigen ADAM Familie	3
1.2.1 ADAM10 und ADAM17 sind die Hauptsheddasen der ADAM-Familie	7
1.2.2 Substratspektrum der <i>Sheddasen</i> ADAM10 und ADAM17	13
1.3 Regulation der ADAM Proteasen ADAM10 und ADAM17 durch das <i>Synapse-associated protein 97</i> (SAP97)	14
1.4 Bekannte (IL-6R) und neue Substrate der ADAM-Proteasen.....	16
1.4.1 Der Aufbau und die Signalwege des IL-6R.....	16
1.4.2 Aufbau und Funktion des IL-23R.....	19
1.4.3 Aufbau und Funktion des IgM Rezeptors Toso (FcμR)	23
1.5 Ziele dieser Arbeit.....	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Antibiotika	27
2.1.2 Antikörper	27
2.1.3 Chemikalien	31
2.1.4 Enzyme	32
2.1.5 Geräte.....	32
2.1.6 Kits.....	33
2.1.7 Oligonukleotide.....	34
2.1.8 Plasmide.....	36
2.1.9 Puffer und Lösungen.....	38
2.1.10 Rekombinante Zytokine und Inhibitoren.....	40
2.1.11 Verbrauchsmaterialien	41
2.1.12 Zellkulturmedien.....	42

Inhaltsverzeichnis

2.1.13	Zelllinien	42
2.2	Methoden	45
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	45
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	51
2.2.3	Kultur von Säugetierzellen	58
2.2.4	Statistische Analysen	62
3	Ergebnisse	63
3.1	Einfluss von SAP97 auf das ADAM-vermittelte <i>Shedding</i> des IL-6R	63
3.1.1	Generierung der SAP97 Mutanten zur Untersuchung der Interaktion mit ADAM17 und dem IL-6R	63
3.1.2	SAP97 interagiert mit ADAM17 und dem IL-6R	66
3.1.3	Einfluss von SAP97 auf das ADAM10- und ADAM17-vermittelte <i>Shedding</i> des IL-6R	69
3.1.4	SAP97 hat keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von ADAM17 und hIL-6R	71
3.1.5	SAP97 ist nicht an der Reifung von ADAM17 beteiligt	74
3.2	Identifikation des IL-23R als neues Substrat von ADAM10 und ADAM17	75
3.2.1	Internalisierung des IL-23 Rezeptors	76
3.2.2	Induziertes <i>Shedding</i> des humanen und murinen IL-23R	80
3.2.3	Der IL-23R ist ein Substrat von ADAM17	81
3.2.4	ADAM10 vermitteltes <i>Shedding</i> des humanen und murinen IL-23R	84
3.2.5	Generierung von IL-23R Deletionsvarianten zur Eingrenzung der ADAM17-Schnittstelle im IL-23R	86
3.2.6	Die IL-23R Deletionsvarianten sind biologisch aktiv	87
3.2.7	Eingrenzung der proteolytischen Schnittstelle des murinen IL-23R durch Deletionsvariante	89
3.2.8	Eingrenzung der proteolytischen Schnittstelle im humanen IL-23R	91
3.2.9	Mutation der putativen, proteolytischen Schnittstelle im murinen IL-23R	93
3.2.10	Durch spezifische Aminosäureaustausche im IL-23R wird das <i>Shedding</i> des IL-23R reduziert	96
3.2.11	Interaktion von ADAM17 und IL-23R	100

Inhaltsverzeichnis

3.3	Identifikation des IgM Rezeptors Toso als neues Substrat für ADAM10 und ADAM17	102
3.3.1	Konstruktion des Toso-Deletionsvarianten.....	103
3.3.2	Generierung von Toso-2A-GFP Varianten.....	106
3.3.3	Generierung von stabil transfizierten Ba/F3-gp130 und HEK293-Zellen mit Toso-2A-GFP Varianten.....	110
3.3.4	ADAM17 spaltet den IgM Rezeptor Toso.....	112
3.3.5	ADAM10 spaltet den IgM-Rezeptor Toso	117
3.3.6	Zusammenfassung der ADAM10- und ADAM17-vermittelten Prozessierung des Toso-Rezeptors	120
4	Diskussion	124
4.1	Einfluss von SAP97 auf die ADAM17 vermittelte Proteolyse des IL-6R.....	124
4.2	IL-23R ist ein neues Substrat von ADAM10 und ADAM17.....	126
4.3	Der IgM Rezeptor Toso ist ein neues Substrat für ADAM10 und ADAM17	133
5	Zusammenfassung	136
6	Summary.....	138
	Literaturverzeichnis.....	139
7	Anhang	167
7.1	Substrate von ADAM10.....	167
7.2	Substrate von ADAM17.....	169
7.3	Klonierungsschemata	172
7.4	Publikationen	178
7.5	Danksagungen.....	179
7.6	Eidesstattliche Erklärung	181

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	<i>Shedding</i> als regulatorische Maßnahme	2
Abbildung 1.2:	Struktur und Funktion einer ADAM-Protease	6
Abbildung 1.3:	Schematische Darstellung der Aktivierungsprozesse von ADAM10 und ADAM17.....	9
Abbildung 1.4:	Substratspektrum von ADAM10 und ADAM17.....	14
Abbildung 1.5:	Schematische Darstellung der Signalwege des IL-6/IL-6R Komplexes. ..	18
Abbildung 1.6:	Schematische Darstellung der untersuchten Rezeptoren Toso und IL-23R.....	22
Abbildung 3.1:	Klonierung von p409-SAP97- Δ PDZ3-YFP.	65
Abbildung 3.2:	Interaktion von SAP97, ADAM17 und dem IL-6R	68
Abbildung 3.3:	Einfluss von SAP97 auf die induzierte Proteolyse des IL-6 Rezeptors	70
Abbildung 3.4:	Oberflächenexpression von hIL-6R und ADAM17	73
Abbildung 3.5:	Reifung des ADAM17 wird nicht durch SAP97 beeinflusst.....	74
Abbildung 3.6:	Expression des IL-23R in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-Zellen	76
Abbildung 3.7:	Internalisierung des IL-23R.....	79
Abbildung 3.8:	ADAM17 prozessiert den humanen und murinen IL-23R.....	80
Abbildung 3.9:	ADAM17 spaltet den IL-23R nach PMA-Stimulation.....	82
Abbildung 3.10:	ADAM10 vermitteltes <i>Shedding</i> des murinen und humanen IL-23R.	85
Abbildung 3.11:	Stalkdeletionsvarianten des murinen und humanen IL-23R.....	87
Abbildung 3.12:	Proliferationsassay der transduzierten Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R-Zellen und der IL-23R-Stalkdeletionsvarianten.	88
Abbildung 3.13:	Identifikation der proteolytischen ADAM17 Schnittstelle im murinen IL-23R	90
Abbildung 3.14:	Alignment der murinen und humanen Stalkregion des IL-23R	91
Abbildung 3.15:	Proteolytische Spaltung des humanen IL-23R in HEK293-Zellen	92
Abbildung 3.16:	Heatmap der bevorzugten Spaltungssequenz von ADAM17	94
Abbildung 3.17:	Klonierung der kodierenden Plasmide, für die IL-23 Rezeptoren mit Mutationen in der putativen Schnittstelle.....	95
Abbildung 3.18:	Analyse der IL-23R-Punktmutation in der putativen ADAM17 Schnittstelle	97

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.19:	Reduktion des <i>Sheddings</i> durch Mutationen der putativen ADAM17 Schnittstelle im IL-23R	98
Abbildung 3.20:	Interaktion von mADAM17 und IL-23R.....	101
Abbildung 3.21:	Struktur von Toso und den generierten Mutationen.....	104
Abbildung 3.22:	Klonierung von Toso Δ IG.	105
Abbildung 3.23:	Oberflächenexpression der Toso-Varianten in HEK293-Zellen	107
Abbildung 3.24:	Klonierung der Toso-2A-GFP Varianten am Beispiel des pcDNA3.1-Toso Δ 50-2A-GFP.....	109
Abbildung 3.25:	Expression von Toso-2A-GFP-Varianten in Ba/F3-gp130- und HEK293-Zellen	111
Abbildung 3.26:	PMA-induziertes <i>Shedding</i> von Toso.....	113
Abbildung 3.27:	PMA-induziertes <i>Shedding</i> der Toso-Varianten.....	115
Abbildung 3.28:	Ionomycin-induziertes <i>Shedding</i> des Toso-Rezeptors	118
Abbildung 3.29:	Ionomycin-induziertes <i>Shedding</i> der Toso-Varianten.....	119
Abbildung 3.30:	Zusammenfassung des <i>Shedding</i> des Toso Rezeptors.....	121
Abbildung 4.1:	Einfluss der sterischen Hinderung auf die Proteolyse.....	130
Abbildung 4.2:	Auswirkung der Proteolyse des IL-23R	131
Abbildung 4.3:	Proteolyse des IgM Rezeptors Toso.	134
Abbildung 7.1:	Klonierungsschema von PDZ3 only.....	172
Abbildung 7.2:	Deletion des YFP aus SAP97 und SAP97- Δ PDZ3.	172
Abbildung 7.3:	Klonierungsschema smIL-23R D2.	173
Abbildung 7.4:	Klonierungsschema smIL-23R D3	174
Abbildung 7.5:	Klonierungsschema von Toso Δ ICD.....	175
Abbildung 7.6:	Klonierung des TIL6R.....	175
Abbildung 7.7:	Klonierungsschema von sToso.....	176
Abbildung 7.8:	Klonierungsschema der Stalkdeletionsvariante Δ 50	177

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Liste der verwendeten Oligonukleotide	34
Tabelle 2:	Zusammenfassung der Daten des <i>Sheddings</i> des Toso Rezeptors.....	122
Tabelle 3:	Substrate von ADAM10. Bisher beschriebene Substrate von ADAM10..	167
Tabelle 4:	Substrate von ADAM17. Bisher beschriebene Substrate von ADAM17..	169

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase</i>
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CBM	Zytokin-bindendes Modul
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CLL	Chronisch-lymphatische Leukämie
D1-D3	Domäne 1-3
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAIM	<i>Fast apoptotic inhibitor molecule</i>
f.c.	<i>Final Concentration</i> (Endkonzentration)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
gp130	Glykoprotein 130
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Human bzw. Stunde
ICD	Intrazelluläre Domäne
Ig	Immunglobulin

Abkürzungsverzeichnis

IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
JAK	Janus-Kinase
kb	Kilobasen
LPS	Lipopolysaccharide
m	Murin
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD _x	Optische Dichte bei X nm
ORF	<i>Open reading frame</i>
PBS	<i>Phosphat Buffer Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phytoerythrin
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Rezeptor
RIP	<i>Regulated intramembrane proteolysis</i>

Abkürzungsverzeichnis

rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
S	Stalk
s	<i>Soluble</i> (löslich)
SAP97	<i>Synapse-associated Protein 97</i>
sec	Sekunden
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOE-PCR	<i>Splicing by overlapping extension-PCR</i>
TACE	<i>Tumor Necrosis Factor-α-converting enzyme</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
U	<i>Units</i>
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp

Aminosäuren:

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

1 Einleitung

1.1 Limitierte Proteolyse von Membranproteinen reguliert zelluläre Vorgänge

Die Oberfläche der Zelle ist von besonderer Bedeutung für biologische Prozesse. Durch verschiedene Proteine, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden, kann die Zelle mit ihrer Umgebung kommunizieren. Die proteolytische Ektodomänenspaltung durch Proteasen bietet eine weitere Form die Zellkommunikation zu regulieren. Diese Proteasen setzen durch eine hydrolytische Spaltung membrangebundene Proteine frei. Dieser Vorgang der proteolytischen Spaltung wird auch allgemein als *Shedding* bezeichnet und die beteiligten Enzyme werden *Sheddasen* genannt. Beim *Shedding* wird durch eine Spaltung in der Nähe der Membran die extrazelluläre Domäne des Proteins freigesetzt. Der Gehalt des Membranproteins wird auf diese Weise verringert, wodurch die Zelle nicht mehr so sensitiv auf Liganden reagiert (Hooper et al. 1997). Außerdem werden dadurch lösliche, biologisch aktive Proteine gebildet, die autokrine, parakrine oder juxtakrine Signalkaskaden hemmen oder auslösen können (s. Abbildung 1.1) (Blobel 2005).

Zytokinrezeptoren, die auf diese Weise freigesetzt werden, reagieren auf zwei Arten. Einerseits können sie antagonistisch wirken, indem sie ihren natürlichen Liganden binden und dadurch mit dem membranständigen Rezeptor konkurrieren (Levine 2008). Diese antagonistische Wirkung trifft auf die meisten geschnittenen Rezeptoren zu. Andererseits können sie auch, wie am Beispiel des Interleukin-6 Rezeptors (IL-6R), eine agonistische Wirkung haben. Die lösliche Form des IL-6 Rezeptors (soluble IL-6R [sIL-6R]) bildet in diesem Fall einen Komplex mit Interleukin-6 (IL-6) und löst Signale in Zellen aus, die den Co-Rezeptor gp130, aber nicht den IL-6 Rezeptor tragen. Dieser Vorgang wird auch *trans-signaling* genannt (Rose-John and Heinrich 1994).

1 Einleitung

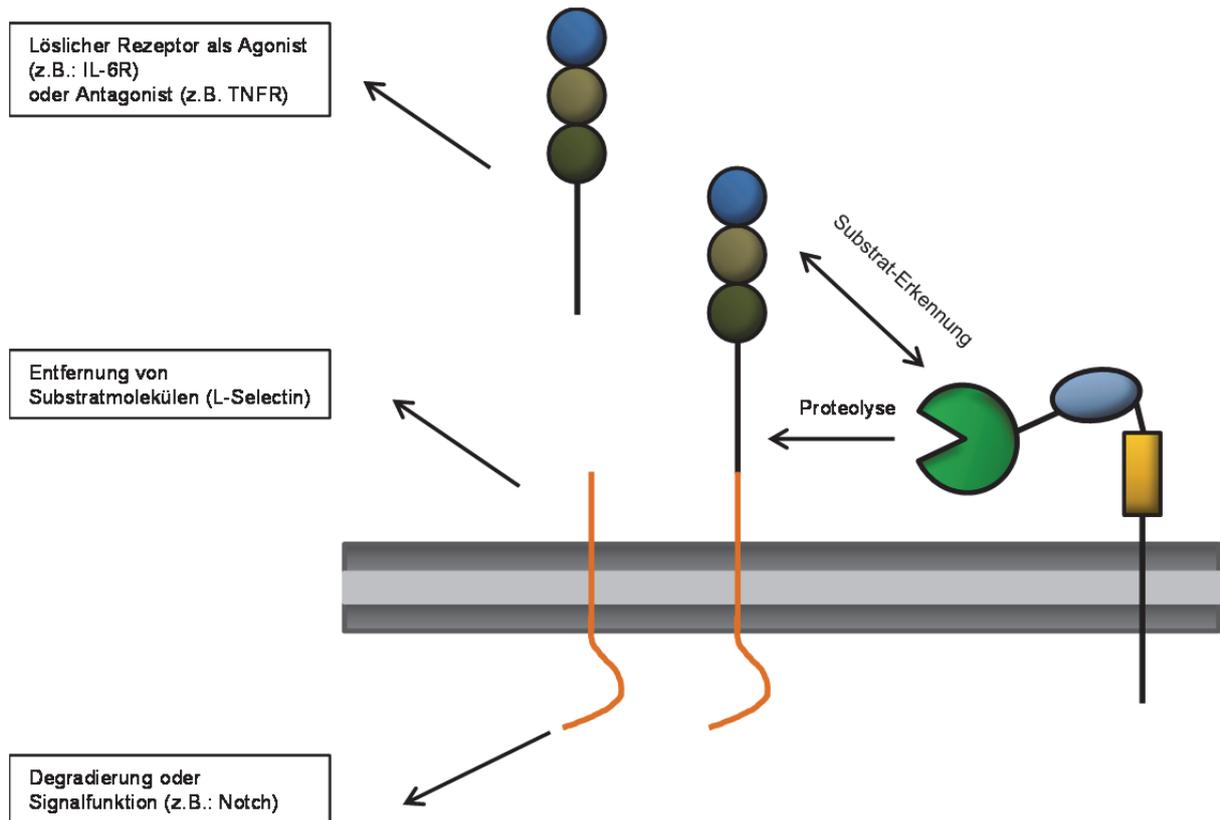


Abbildung 1.1: *Shedding* als regulatorische Maßnahme. Gezeigt ist eine schematische Darstellung einer ADAM-Protease und dem *Shedding* eines membrangebundenen Rezeptors. Des Weiteren sind die Konsequenzen für das geschnittene Substrat dargestellt. Die Abbildung ist modifiziert nach (Dreymueller et al. 2015).

Proteasen sind an vielen pathophysiologischen Prozessen, wie Neurodegeneration, Apoptose, Onkogenese und Entzündungsprozessen beteiligt. Bislang wurde gezeigt, dass hauptsächlich Typ-I, Typ-II Transmembran- und GPI-verankerte Proteine von der Zelloberfläche gespalten werden (Lewandrowski et al. 2009; Fong et al. 2011).

Nach dem *Shedding* kann das Fragment, das in der Membran verbleibt, weiter prozessiert und im Proteasom abgebaut werden. Im Falle von Notch-1 wird nach der Spaltung durch eine α -Sekretase (ADAM10) der in der Membran verbliebende Teil durch eine γ -Sekretase gespalten. Dieser Prozess wird als *RIPping* (*regulated intramembrane proteolysis*) bezeichnet und setzt die intrazelluläre Domäne von Notch frei, die daraufhin in den Zellkern transportiert wird und dort als Transkriptionsfaktor für Proteine der Zelldifferenzierung fungiert (Bray 2000a; Selkoe and Kopan 2003) (s. Abb. 1.1).

Durch das *Shedding* werden viele verschiedene zelluläre Prozesse irreversibel beeinflusst. Daher ist die Analyse der biochemischen Abläufe des *Sheddings* für eine mögliche Regulation dieser Vorgänge essentiell.

1.2 Limitierte Proteolyse wird vermittelt durch Mitglieder der membranständigen ADAM Familie

ADAMs (*A Disintegrin and Metalloproteinase*) gehören zu den M12B Adamlysinen. Zu dieser Unterfamilie der Zink-abhängigen Proteasen, gehören neben den ADAMs auch noch die Matrixmetalloproteinasen, ADAMTSSs, die Schlangengift-Metalloproteinasen (SVMPs), die Astacine und die alkalische Proteinasen (Stöcker et al. 1995). Besonders die SVMPs weisen eine große Sequenzhomologie gegenüber den ADAM-Proteasen auf (Takeda et al. 2012).

Im humanen Genom kodieren 21 Gene für ADAM Proteasen, von denen nur für 13 eine proteolytische Aktivität nachgewiesen wurde. Diese aktiven Proteasen spielen eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion, Migration, Proteolyse und Signaltransduktion (Edwards et al. 2008). ADAM-Proteine sind Multi-Domänen-Proteine mit einer durchschnittlichen Größe von 750 Aminosäuren und gehören zur Typ-I Transmembranproteinfamilie. Sie sind charakterisiert durch den folgenden Aufbau: Auf ein N-terminales Signalpeptid folgt eine Prodomäne, eine katalytische Metalloproteinasedomäne, eine Disintegrin- und eine Cysteinreiche-Domäne. Einige ADAMs tragen im Anschluss eine EGF-ähnliche Region, gefolgt von einer Transmembran- und der zytoplasmatischen Domäne. Vor der Transmembrandomäne befindet sich noch eine kurze *Stalk*-Region (Primakoff and Myles 2000). Im Gegensatz zu anderen Vertretern der ADAM-Familie tragen ADAM10 und ADAM17 an Stelle der Cysteinreichen und EGF-ähnlichen Domäne eine membran-nahe Domäne (*membrane-proximal domain* MPD), die reich an Cysteinresten ist (Janes et al. 2005; Takeda 2009; Düsterhöft et al. 2013).

Das Signalpeptid leitet die ADAM-Proteine über den sekretorischen Weg Richtung Zelloberfläche, auf welchem die angeschlossene Prodomäne im Golgi-Netzwerk durch Pro-Protein Konvertasen, wie Furin oder autokatalytisch (ADAM8 und ADAM28) abgespalten wird (Lum et al. 1998; Howard et al. 2000; Schlomann et al. 2002; Endres et al. 2003; Seals

1 Einleitung

and Courtneidge 2003). Die Prodomäne besitzt neben einer inhibitorischen Funktion (Gonzales et al. 2004; Milla et al. 2006; Moss et al. 2007) auch eine Funktion als intramolekulares Chaperon, wodurch eine korrekte Proteinfaltung gewährleistet wird (Roghani et al. 1999; Anders et al. 2001). Für eine vollständige Entfernung der Prodomäne muss diese an zwei Stellen geschnitten werden. An der ersten Stelle wird ein Teil der Prodomäne abgelöst, an der zweiten Stelle wird dann der verbliebene Rest der Prodomäne entfernt. Erfolgt der Schnitt nur in der Region zwischen der Pro- und der katalytischen Domäne, bleibt die Bindung der intakten Prodomäne an der ADAM Protease bestehen und bildet so ein inaktives Pseudo-Proenzym (Wong et al. 2015). Die katalytische Domäne variiert zwischen den einzelnen Vertretern der Metalloproteinase-Familie, jedoch beinhaltet sie bei allen das konservierte HEXXHXXGXH-Motiv (Bode et al. 1993). Für die proteolytische Aktivität wird ein essentielles Zinkion durch drei Histidine und ein Wassermolekül im katalytischen Zentrum gehalten (Stöcker et al. 1995). Die Disintegrin-Domäne dient der Interaktion mit Integrinen, wodurch Zelladhäsion und Zell-Zell-Kontakte beeinflusst werden (White et al. 2005). Diese Interaktion konnte nicht für alle ADAMs nachgewiesen werden, obwohl sie bei ADAM12 für die Integrin-vermittelte Adhäsion und Ausbreitung wichtig ist (Kawaguchi et al. 2002). Des Weiteren wird vermutet, dass sowohl die Disintegrin, als auch die folgenden Domänen (Cysteinreiche- und EGF-ähnliche Domäne) eine Rolle in der Substraterkennung spielen. Für die Cysteinreiche-Domäne wurde gezeigt, dass diese Domäne essentiell für das *Shedding* des IL-1 Rezeptors durch ADAM17 ist (Reddy et al. 2000) und dass sie eine große Rolle bei der Interaktion zwischen ADAM10 und dem EphA3/ephrin-A5 Komplex spielt (Janes et al. 2005). Die membrannahere Domäne ist beteiligt an der Substraterkennung, Multimerisation und Regulation von ADAM17 und kann zwei Konformationen annehmen: eine offene, aktive und eine geschlossene, inaktive Form. Eine Konformationsänderung wird durch Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) erzeugt, wodurch ADAM17 inaktiviert wird (Düsterhöft et al. 2013). Innerhalb der Stalk-Region befindet sich bei ADAM17 eine hoch konservierte CANDIS-Sequenz (*conserved ADAM seventeen dynamic interaction sequence*), welche für die Bindung an den Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R) verantwortlich ist (Düsterhöft et al. 2014).

Diese Rolle der Substratinteraktion wird dadurch bekräftigt, dass bisher für ADAM-Proteine keine Konsensuspaltsequenz definiert werden konnte (Caescu et al. 2009). Durch die Analyse von Peptiddatenbanken wurde nachgewiesen, dass die Enzyme ADAM10 und

1 Einleitung

ADAM17 N-Terminal eines Leucins schneiden. Der größte Unterschied in der Spaltungssequenz beider Proteasen befindet sich hinter der Schnittstelle. So bevorzugt ADAM10 aromatische Aminosäuren und ADAM17 Valin als erste Aminosäure hinter der Schnittstelle (Tucher et al. 2014).

Die zytoplasmatische Region, die genau wie die Transmembrandomäne nur bei den membrangebundenen ADAMs vorkommt, ist sehr variabel und weist eine Länge zwischen 14 (ADAM11, UniProtKB-Q9PSZ3) und 235 (ADAM19, UniProtKB-Q9H013) Aminosäuren auf (Seals and Courtneidge 2003). Die zytoplasmatische Region ermöglicht durch Motive, wie dem PxXP-Motiv (x= irgendeine Aminosäure, X= hydrophobe Aminosäure) (Aitio et al. 2010), Interaktionen mit verschiedenen Proteinen und wird an Serin, Threonin oder Tyrosin-Resten phosphoryliert (Poghosyan et al. 2002). Dies führt auch zu der Annahme, dass der zytoplasmatische Teil für die Regulation der Proteaseaktivität dient (Cao et al. 2002). Auch für den Transport der Proteasen scheint die zytoplasmatische Domäne einen Einfluss zu haben. Dies wurde sowohl für den Membrantransport von ADAM12 (Hougaard et al. 2000; Sundberg et al. 2004), als auch bei der korrekten basolateralen Lokalisation von ADAM10 in polarisierten Zellen gezeigt (Wild-Bode et al. 2006).

1 Einleitung

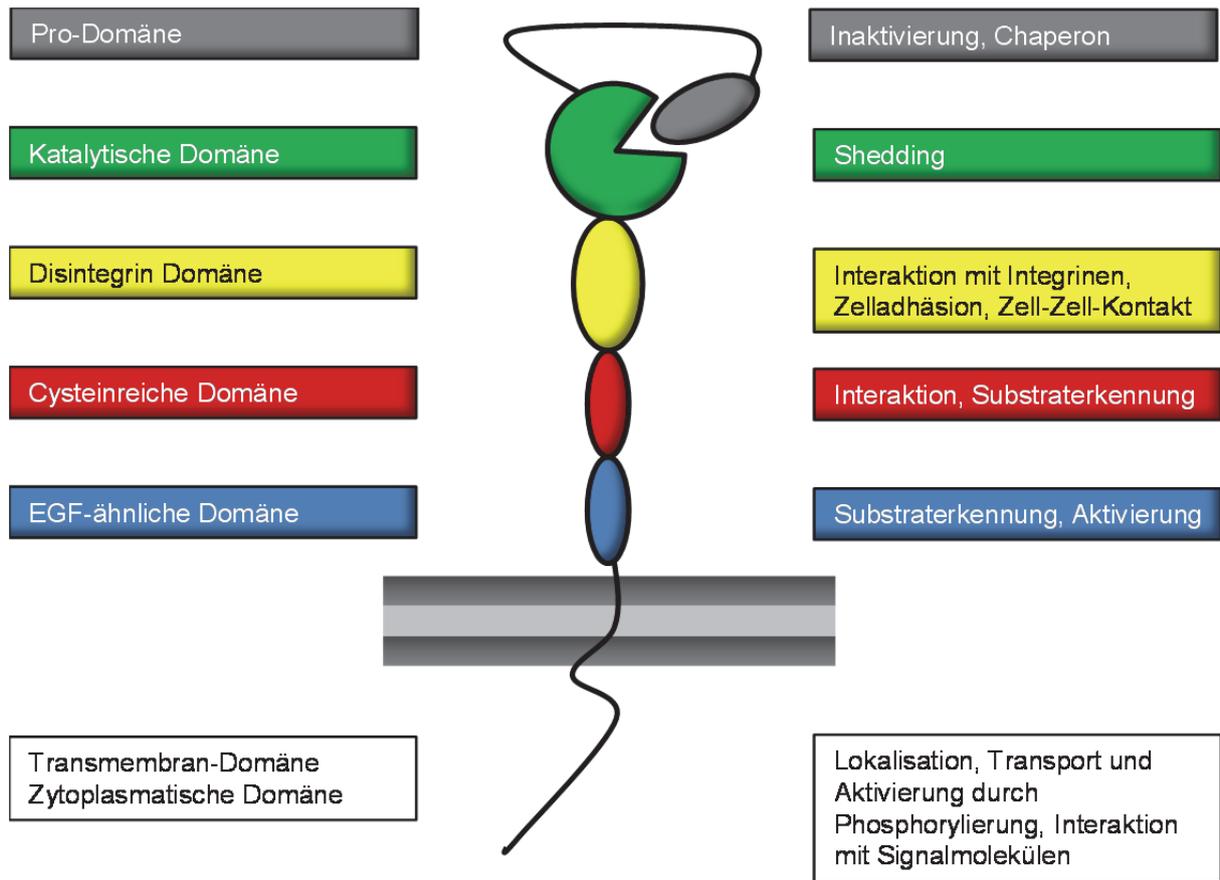


Abbildung 1.2: Struktur und Funktion einer ADAM-Protease. Struktur und Funktion der einzelnen Domänen der ADAM-Protease. Abbildung modifiziert nach (Blobel 2005; Scheller et al. 2011a).

ADAM-Proteine sind an vielen pathologischen Vorgängen wie Krebs, Asthma und Alzheimer beteiligt. Insbesondere bei Alzheimer erfüllen sie eine protektive Funktion, indem sie APP (*amyloid-precursor-protein*) prozessieren ohne A β Peptide zu bilden, die für die Ausbildung von amyloiden Plaques und somit der Entstehung von Alzheimer verantwortlich sind (Schlondorff and Blobel 1999). Matrixmetalloproteinasen können durch eine dichte, nicht kovalente Interaktion mit TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) inhibiert werden. Durch eine Stimulation mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR)-, Protein-Kinase C (PKC)-Aktivatoren, Ca²⁺ Ionophore und andere experimentelle und natürliche Stimuli können ADAM-Proteasen aktiviert werden. ADAM10 und ADAM17 sind die meist untersuchten Proteasen der ADAM-Familie, für die die meisten Substrate beschrieben wurden (Edwards et al. 2008; Scheller et al. 2011a). Daher werden diese Proteasen in den folgenden Abschnitten noch genauer beschrieben.

1.2.1 ADAM10 und ADAM17 sind die Hauptsheddasen der ADAM-Familie

1.2.1.1 ADAM10

1996 wurde *Kuzbanian* (kuz) als Protein in *Drosophila* beschrieben, das für die Entwicklung neuronaler und nicht-neuronaler Zellen während der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems essentiell ist (Rooke et al. 1996). In Vertebraten wurde später ein ähnliches Protein der ADAM Proteinfamilie identifiziert, das daraufhin als ADAM10 bezeichnet wurde (Wen et al. 1997). Das entsprechende Gen ist im humanen Genom auf Chromosom 15 lokalisiert (Yamazaki et al. 1997). Dessen Genexpression wird aufgrund einer RXR-Bindedomäne, welche sich in der 5' untranslatierten Region befindet, durch Retinsäure (RAR α/β -RXR dimer) erhöht (Prinzen et al. 2005). Ebenso verstärkt das menschliche Sirtuin SIRT1 durch die Deacetylierung und Co-Aktivierung des Retinsäurerezeptors β die Transkription und Proteinexpression von ADAM10 (Donmez et al. 2010). Die Expression von ADAM10 ist in allen Zellen nachweisbar (Prinzen et al. 2005). ADAM10 defiziente Mäuse sterben während der Embryonalentwicklung am Tag E9.5 durch den Verlust des Notch Signalwegs (Hartmann et al. 2002).

Der generelle Aufbau des Proteins entspricht dem der ADAM Familie (s. Abschnitt 1.2). Für die Reifung muss auch diese Protease durch eine Pro-Protein Konvertase (Furin oder PC7) prozessiert werden. Für die Abspaltung der Prodomäne sind posttranslationale Modifikationen notwendig (Anders et al. 2001). ADAM10 wird in ihrem extrazellulären Bereich an vier potentiellen N-Glykosylierungsstellen modifiziert. Diese Modifikationen sind essentiell für die Reifung und vollständige Aktivierung der Protease (Escrevente et al. 2008).

Am C-Terminus trägt ADAM10 ein Arginin-reiches ER-Retentionssignal, wodurch es im Endoplasmatischem Retikulum (ER) zurückgehalten wird (Marcello et al. 2010). ADAM10 interagiert über seinen C-Terminus mit dem Synapsen-assoziierten Protein-97 (SAP97), wodurch die Aktivität dieser α -Sekretase durch eine Veränderung der Lokalisation zur postsynaptischen Membran erhöht wird (Marcello et al. 2007). Eine Überexpression oder Phosphorylierung von SAP97 verhindert jedoch nicht, dass ADAM10 zu einem Teil durch

1 Einleitung

das Retentionssignal im ER zurückgehalten wird. Daher müssen noch andere Interaktionspartner den Transport von ADAM10 regulieren (Marcello et al. 2010).

Die Aktivität von ADAM10 ist nicht nur direkt durch Protein-Protein Interaktionen reguliert, sondern auch durch die Struktur der Plasmamembran. ADAM10 ist in erhöhter Konzentration in Membranbereichen lokalisiert, die reich an Tetraspaninen (besonders CD9, CD81, CD82) sind (Arduise et al. 2008). Die Aktivität wird durch die Depletion von Cholesterin erhöht, da sich das Enzym und sein Substrat besser in der Membran bewegen können (Kojro et al. 2001). Auch durch die Stimulation verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR) erhöht sich die Aktivität der Protease (Endres and Fahrenholz 2010), wodurch heparinbindendes EGF (HB-EGF) geschnitten wird und so die EGF-Rezeptoren der benachbarten Zelle aktiviert werden können (Yan et al. 2002). Ein Anstieg der intrazellulären Konzentration von Ca^{2+} -Ionen löst eine Aktivierung von ADAM10 aus, was unter experimentellen Bedingungen durch das Ionophor Ionomycin induziert wird (Hundhausen et al. 2007). In ADAM10-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) wurde gezeigt, dass durch den Einsatz von Ionomycin auch ADAM17 aktiviert, wodurch der Verlust von ADAM10 kompensiert werden kann. Dies kann aber in Zellkultursystemen vernachlässigt werden, wenn beide Proteasen exprimiert werden (Le Gall et al. 2009). Im Gegensatz zu ADAM17, das nur durch verschiedene Stimuli aktiviert wird, ist ADAM10 auch konstitutiv aktiv (Maretzky et al. 2005b).

Bislang wurden 62 Substrate für ADAM10 identifiziert. Als wichtige Substrate von ADAM10 gelten Notch und Ephidrin. Diese werden von ADAM10 prozessiert und können daraufhin ihre signalisierende Wirkung erfüllen (Edwards et al. 2008). Interessanterweise wird ADAM10 selbst durch die Proteasen ADAM9 und ADAM15 prozessiert. Hierbei wird der proteolytisch aktive, extrazelluläre Bereich freigesetzt und der verbleibende intrazelluläre Teil durch eine γ -Sekretase weiter gespalten (Tousseyn et al. 2009).

Die Aktivität von ADAM10 kann durch die natürlichen Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-3 geblockt werden (Amour et al. 2000), auch RECK (Reversion induzierendes Cystein reiches Protein mit Kazal-Motiven) inhibiert ADAM10 (Baker et al. 2002). Für Experimente im Zellkultursystem werden Hydroxamat-basierende Inhibitoren verwendet, wie GI254023X (GI) und GW280264X (GW), welche beide ADAM10 inhibieren, wobei nur GI selektiv gegen ADAM10 wirkt, da GW sowohl ADAM10 als auch ADAM17 inhibiert (Hundhausen et al. 2003; Ludwig et al. 2005).

1.2.1.2 ADAM17

ADAM17, das im Jahre 1997 kloniert wurde, ist für die Freisetzung von löslichem TNF α verantwortlich und wurde aus diesem Grund initial TACE (*Tumor necrosis factor- α converting enzyme*) genannt. Durch Strukturvergleiche wurde TACE der ADAM-Proteinfamilie (*A Distinterin And Metalloprotease*), zu denen auch die SVMPs (*snake venoms metalloproteinases*) und die Matrix Metalloproteinasen (MMPs) gehören, zugeordnet (Black et al. 1997; Moss et al. 1997). Später wurde nachgewiesen, dass ADAM17 (TACE) auch andere Substrate, wie Zelladhäsionsproteine, Zytokin- und Wachstumsfaktorrezeptoren schneidet. Bislang wurden genau 90 Substrate für ADAM17 identifiziert. Eine Liste der Substrate findet sich im Anhang 7.2. Das Gen, das für ADAM17 kodiert, hat 50 kb, mit 19 Exons und liegt auf dem humanen Chromosom 2p25 (Mezyk et al. 2003). Die gebildete mRNA kann in allen Geweben nachgewiesen werden, wodurch das Protein ubiquitär exprimiert wird (Cerretti et al. 1999).

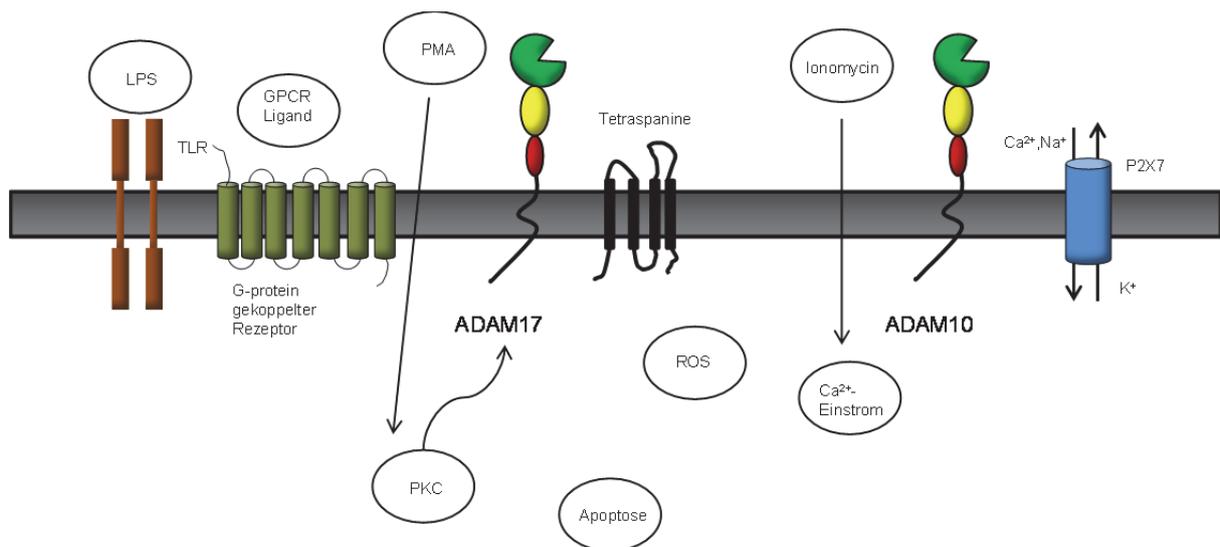


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Aktivierungsprozesse von ADAM10 und ADAM17. ADAM Proteasen werden durch verschiedene Stimuli aktiviert. In dieser Abbildung sind einige Stimulatoren für ADAM10 und ADAM17 zusammengefasst. ADAM10 regulierte Proteolyse wird unter anderem durch den P2X7 Rezeptor, bei dem es sich um einen Ionenkanal handelt, ausgelöst. In Zellkultursystemen wird ADAM10 durch Ionomycin aktiviert. ADAM17 kann unter anderen durch Lipopolysaccharide (LPS), über Toll-Like-Rezeptoren (TLR), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Tetraspanine aktiviert werden. Ein weiterer Aktivator für ADAM17 ist PMA.

Die fundamentale Bedeutung dieser Protease zeigt sich an der Tatsache, dass Mäuse, die kein ADAM17 exprimieren, schon in der Embryonalentwicklung am Tag 17,5 sterben

1 Einleitung

(Peschon et al. 1998; Zhao et al. 2001; Jackson et al. 2003). Der Verlust von ADAM17 hat Auswirkungen auf die Entwicklung und Differenzierung von Zellen und die Regulation des Immunsystems. So zeigen Mäuse, die kein aktives ADAM17 mehr exprimieren, Defekte in der Entwicklung von Haut, Muskeln und Lunge, sowie eine fehlerhafte Entwicklung des Nervensystems und werden mit offenen Augen geboren (Peschon et al. 1998; Horiuchi et al. 2007; Canault et al. 2010). Vergleichbare phänotypische Veränderungen treten auch bei Mäusen mit einem Defekt in der Expression von TGF α (*Transforming growth factor- α*) auf (Peschon et al. 1998). Auch die Beteiligung von ADAM17 an der Prozessierung von Notch wurde nachgewiesen. Notch wird, nach einer Spaltung durch Furin und der Bindung seines Liganden, durch ADAM17 bzw. ADAM10 gespalten. Durch die Freisetzung des extrazellulären Bereichs wird die intrazelluläre Domäne durch eine γ -Sekretase freigesetzt und Zielgene für die Zelldifferenzierung aktiviert (Bray 2000b; Brou et al. 2000). Um mehr über die physiologischen und pathologischen Funktionen von ADAM17 herauszufinden, wurden konditionelle *Knockout* Mäuse erzeugt. Durch die Bildung von ADAM17^{flox/flox} Mäusen, die keine physiologischen Veränderung zeigen und der anschließenden Kreuzung mit gewebespezifischen Cre-Mäusen, wurde ADAM17 nur in bestimmten Zelltypen deletiert (Horiuchi et al. 2007). Diese Mäuse exprimieren in den entsprechenden Geweben weniger ADAM17, aber sterben nicht pränatal. Der *Knockout* von ADAM17 in Lymphozyten und somit im Knochenmark, der Leber und Milz (ADAM17^{flox/flox}/Mx1-Cre) oder in Makrophagen (ADAM17^{flox/flox}/LysM-Cre) führt zu einer Resistenz gegenüber LPS-induzierter Sepsis und einer verminderten Freisetzung des löslichen TNF α (Kühn et al. 1995; Clausen et al. 1999; Horiuchi et al. 2007). Die Auswirkung von ADAM17 auf das Wachstum und die Homöostase wurde durch die Generierung einer ADAM17^{flox/flox}/Sox9-Cre Maus untersucht, wodurch ADAM17 in mesenchymalen Stammzellen deletiert wurde. Diese Mäuse sterben früh, werden mit offenen Augen geboren und weisen Defekte in der Haut und Haaren und im Skelett- und hämatopoetischen System auf. Durch diese Mäuse wurde gezeigt, dass das ADAM17-vermittelte *Shedding* entzündliche Läsionen in der Haut und dem Darm vermindert (Akiyama et al. 2002; Horiuchi et al. 2009a; Horiuchi 2013). Um die Auswirkung der reduzierten ADAM17 Expression im gesamten Organismus zu untersuchen, wurde eine Maus erzeugt, die nur noch 5% ADAM17 in allen Geweben exprimiert und trotzdem lebensfähig ist. Diese Mäuse zeigen Defekte in der Entwicklung der Augen, Haare und Haut, genau wie bei Mäusen, die kein TGF- α exprimieren. Außerdem sind diese Mäuse sehr anfällig gegenüber

1 Einleitung

einer DSS-induzierten Colitis, welche durch das fehlende *Shedding* von EGF-R Liganden hervorgerufen wird (Chalaris et al. 2010a).

ADAM17 hat demnach, durch die Spaltung von Zytokinen und Rezeptoren, einen großen Einfluss auf das Immunsystem. Außerdem spaltet es L-Selectin von der Oberfläche von Leukozyten, wodurch die Migration beeinflusst wird (Peschon et al. 1998).

Trotz der großen Geltung dieser *Sheddase* auf die Entwicklung, ist über die Mechanismen, die zur Aktivierung von ADAM17 führen, noch nicht viel bekannt. Für einige Substrate sind physiologische Aktivatoren, wie zum Beispiel f-MLP (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) und PAF (*platelet-activating factor*) für das *Shedding* von L-Selectin, aufgeklärt (Rizoli et al. 1999). Im Gegensatz zu ADAM10, welches auch konstitutiv aktiv ist, muss ADAM17 aktiviert werden. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) ist ein starker, nicht-physiologischer Aktivator der Proteinkinase C (PKC), welcher zum *Shedding* von ADAM17-Substraten führt (Müllberg et al. 1993) (s. Abb. 1.3). Für eine weitere Regulation von ADAM17 werden die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne, die Beteiligung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden oder Interaktionspartner im zytoplasmatischen Bereich und die Aktivierung von ADAM17 durch die Regulation der Reifung und Lokalisation in der Membran untersucht (Mezyk et al. 2003).

Das reife ADAM17 hat sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen, von denen drei in der katalytischen Domäne, zwei in der Disintegrin und die letzte in der Cysteinreichen-Domäne liegen. Auch in der Prodomäne, die im Laufe der Reifung von Furin abgespalten wird, sind drei weitere Glykosylierungsstellen zu finden (Gooz 2010). Zwar erfolgt eine Glykosylierung des Proteins, die Auswirkungen dieser Modifikation konnten aber bisher nicht genau bestimmt werden (Peiretti et al. 2003a). Laut späteren Untersuchungen zeigen Glykosylierungen von ADAM17 möglicherweise einen Effekt auf die Substratumsetzung und die Inhibition der Protease auf (Chavaroche et al. 2014).

Die intrazelluläre Domäne bietet durch ihre Phosphorylierungsstellen für p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), PKC und ERK (*extracellular-signal regulated kinase*) (Díaz-Rodríguez et al. 2002) eine gute Möglichkeit der Regulation. So wird zum Beispiel Thr₇₃₅ nach einer Stimulation mit PMA durch ERK phosphoryliert, was wiederum zum *Shedding* von TrkA führt. Interessanterweise kann auch ein ADAM17-Protein, dem die komplette intrazelluläre Domäne fehlt, durch PMA aktiviert werden. Somit scheint die zytoplasmatische Domäne für das PMA-induzierte *Shedding* nicht essentiell zu sein (Reddy et

1 Einleitung

al. 2000), obwohl intrazelluläre Signalwege, an denen PKC und ERK beteiligt sind, eine Rolle im PMA-vermitteltem *Shedding* spielen. Dies wurde gezeigt, indem die PMA-induzierte Aktivierung von ADAM17 durch eine Blockade von p38 α MAPK oder ERK inhibiert wurde (Xu and Derynck 2010). Nach der Aktivierung von ADAM17 wird es von der Oberfläche durch Endozytose entfernt, was eine weitere Form der Regulierung darstellt (Doedens and Black 2000).

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Bindungspartner für ADAM17 identifiziert, die das *Shedding* beeinflussen. Welchen Einfluss die Bindung von MAD2 an die zytoplasmatische Domäne von ADAM17 hat, konnte bisher nicht gezeigt werden (Nelson et al. 1999). Als weiterer Bindungspartner wurde SAP97 (*synapse associated protein 97*) nachgewiesen. Dieses bindet mit seiner PDZ3 Domäne an den äußersten Bereich des C-Terminus von ADAM17. Eine Überexpression von SAP97 reduziert die Freisetzung der Substrate TNFR1, TNFR2 und TNF α (Peiretti et al. 2003b). Die Interaktion mit anderen Proteinen führt nicht nur zu einer negativen Regulation des *Sheddings*, sondern kann auch die Aktivität von ADAM17 erhöhen, was durch die Interaktion des Proteins Eve-1 gezeigt wurde (Tanaka et al. 2004). Die Bindung von iRhom2 an ADAM17 beeinflusst nicht nur den Transport und die Reifung des ADAM17, in dem das iRhom2 schon im ER an ADAM17 bindet und dieses durch das Golgi leitet, sondern auch bei der Regulation des *Sheddings*. Durch den *Knockout* von iRhom2 werden bestimmte Substrate, wie HB-EGF, EphB4, KitL2, TNF α und Tie2 nicht mehr prozessiert. Andere Substrate von ADAM17, wie TGF α , CD62L und ICAM-1, werden aber weiterhin von ADAM17 geschnitten (McIlwain et al. 2012; Marezky et al. 2013). iRhom1 reguliert die Reifung von ADAM17 im Gehirn, bis auf in Mikroglia wo die Reifung von ADAM17 durch iRhom2 vermittelt wird. Nur der gleichzeitige *Knockout* von iRhom1 und iRhom2 führt zu einer vollständigen Inaktivierung von ADAM17. Diese Mäuse weisen den gleichen Phänotyp wie ADAM17-KO Mäuse auf und sterben pränatal mit offenen Augen (Li et al. 2015).

Durch Immunostaining wurde nachgewiesen, dass der größte Teil von ADAM17 im perinukleären Bereich der Zelle und nur ein kleiner Teil von reifem ADAM17 auf der Zelloberfläche lokalisiert ist (Mezyk et al. 2003). Dort befindet es sich entfernt von dem entsprechendem Substrat in cholesterinreichen Bereichen, sogenannten *Lipid rafts* (Tellier et al. 2006). Eine Depletion von Cholesterin führt zur Auflösung dieser Bereiche und somit zur Erhöhung des ADAM17-medierten *Sheddings*, bei gleichbleibender Aktivität der Protease

(Matthews et al. 2003). Der Einfluss der Lokalisation von ADAM17 in der Membran wird dadurch unterstützt, dass PMA die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auslöst, wodurch der Redox-Zustand der Zelle verändert wird und Protein-Disulfid-Isomerasen (PDIs) inaktiviert werden. Die Inaktivierung dieser PDIs ermöglicht die Bewegung von ADAM17 und seinen Substraten innerhalb der Membran (Willems et al. 2010). Die Aktivität von ADAM17 wird durch den natürlichen Inhibitor TIMP-3 geblockt (Amour et al. 1998). Für Experimente im Zellkultursystem werden Hydroxamat-basierende Inhibitoren verwendet, wie zum Beispiel GW280264X (GW), welches sowohl ADAM10 als auch ADAM17 inhibiert (Hundhausen et al. 2003; Ludwig et al. 2005).

1.2.2 Substratspektrum der *Sheddasen* ADAM10 und ADAM17

Die Liste der identifizierten Substrate für ADAM10 und ADAM17 wird von Jahr zu Jahr länger. Zu diesen Substraten gehören Zytokine/Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren, welche den größten Teil der prozessierbaren Substrate ausmachen. Nach aktuellem Stand sind für die Protease ADAM10 62 Substrate und für ADAM17 90 Substrate beschrieben. Eine Auflistung aller Substrate findet sich im Anhang, Abschnitt 7.1 und 7.2. Interessanterweise gibt es auch Substrate, die von beiden Proteasen geschnitten werden, was durch den Überlappungsbereich in Abbildung 1.4 dargestellt ist. Wie groß dieser Bereich genau ist, ist schwer zu sagen, weil für viele Substrate nicht getestet wurde, ob diese sowohl von ADAM10 als auch von ADAM17 prozessiert werden können. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit werden 30 Substrate sowohl von ADAM10 als auch von ADAM 17 prozessiert (Scheller et al. 2011a).

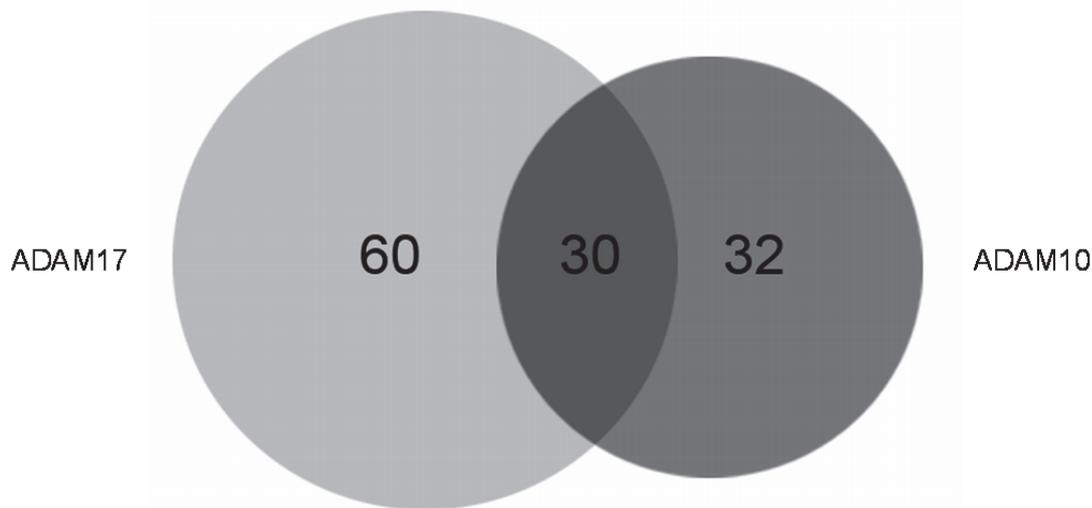


Abbildung 1.4: Substratspektrum von ADAM10 und ADAM17. Bisher wurden für die Protease ADAM17 90 Substrate beschrieben (linker, heller Kreis), für ADAM10 wurden 62 Substrate beschrieben (rechts, dunkelgrauer Kreis). 30 Substrate können von beiden Substraten geschnitten werden (Überlappungsbereich).

1.3 Regulation der ADAM Proteasen ADAM10 und ADAM17 durch das *Synapse-associated protein 97* (SAP97)

SAP97 (*synapse-associated protein 97*) ist ein Protein der MAGUK-Familie (*membrane-associated guanylate kinase homologs*), welches homolog zu dem *discs large tumor suppressor protein* (DLG1) aus *Drosophila* ist. Daher ist es beim Menschen auch als hDlg1 bekannt. Es ist 97 kDa groß und wird im ganzen Gehirn und anderen Organen (besonders in Epithelzellen) exprimiert (Lue et al. 1994; Muller et al. 1995; Valtschanoff et al. 2000).

Zu der MAGUK-Familie gehören die Proteine SAP97, PSD-95 (SAP90), PSD-93 (Chapsyn 110) und SAP102, die sich durch die charakteristische Struktur aus drei N-terminalen PDZ Domänen, einer Src-homologen 3 (SH3) Domäne und einer C-terminalen, katalytisch inaktiven, Guanylatkinase (GUK) Domäne, auszeichnen (Elias et al. 2006). Für SAP97 wurden zwei Splicevarianten beschrieben. Eine Splicestelle liegt zwischen dem N-Terminus und der ersten PDZ-Domäne, die andere liegt zwischen der SH3 und der GUK Domäne (wie bei den Isomeren I2, I3) (McLaughlin et al. 2002). SAP97 bildet außerdem zwei verschiedene N-Termini, wodurch entweder zwei Cysteine, die normalerweise palmitoliert werden (α SAP97), oder eine L27 Domäne (β SAP97) exprimiert werden (Schlüter et al. 2006;

1 Einleitung

Waites et al. 2009; Li et al. 2011a). Durch diese zwei Variationen wird die subsynaptische Lokalisation bestimmt, was zur Folge hat, dass α SAP97 hauptsächlich an einer postsynaptischen dichten Membranregion (PSD) und β SAP97 in perisynaptischen Regionen lokalisiert ist (Waites et al. 2009). Im Gehirn ist β SAP97 sehr stark vertreten (Schlüter et al. 2006). Durch die Variationen des SAP97 können nicht nur verschiedene Funktionen erfüllt werden, es verkompliziert auch die Funktionsanalyse, wenn die Variante nicht klar definiert ist. Durch diese Isoformen werden nicht nur die Lokalisation, sondern auch die Interaktion mit anderen Proteinen beeinflusst, sodass die Isoform I3 das Actin/Spectrin-assoziierte Protein bindet und zur Plasmamembran transportiert, wodurch Zell-Zell-Kontakte modifiziert werden (McLaughlin et al. 2002; Rumbaugh et al. 2003). Im Gegensatz dazu ist die Isoform I2 im Nukleus lokalisiert (Wu et al. 2002; Rumbaugh et al. 2003; Roberts et al. 2007).

SAP97 interagiert mit einer Vielzahl an Bindungspartnern, wie Ionenkanäle, zytosolischen Strukturproteinen und anderen Membranproteinen. Die Selektion der Bindepartner erfolgt meist über den N-Terminus von SAP97, wobei die Interaktion über die PDZ-Domänen stattfindet (Wu et al. 2000; Fourie et al. 2014).

Der N-Terminus hat zusätzlich noch ein Myosin VI-Bindemotiv, wodurch eine direkte Interaktion zwischen Myosin VI, SAP97 und der AMPA Rezeptoruntereinheit GluA1 erfolgt, was für den Transport des AMPA Rezeptors erforderlich ist (Wu et al. 2002). Die Bindung von GKAP (GUK assoziierten Proteinen) wird durch eine intramolekulare Interaktion zwischen den SH3 und der GUK Domäne reguliert (Wu et al. 2000). Auch ein Transport von Kinasen zu ihren Substraten ist durch die Bindung von AKAP79/150 (*A-kinase-anchoring protein 79/150*) mit SAP97 möglich. Auf diese Weise können PKA, PKC (Proteinkinase A und C) und Calcineurin, eine Ca^{2+} /calmodulin abhängige Protein-Phosphatase, effektiv mit ihren Substraten interagieren (Colledge et al. 2000). Größere Proteinkomplexe können durch die L27 Domäne des N-Terminus von SAP97 gebildet werden. Diese Domäne ist für die Heteromultimerisierung und Homodimerisierung von SAP97-Proteinen untereinander oder anderen Proteinen, die eine L27 Domäne tragen, verantwortlich (Nakagawa et al. 2004). Bei der Interaktion des SAP97 mit Proteasen bindet die PDZ3 Domäne den atypischen, prolinreichen Bereich des C-Terminus von ADAM10 und ADAM17, wodurch der Transport dieser Proteasen zur Plasmamembran gefördert wird. Diese Interaktion führt, wie im Fall von ADAM17, zu einer verringerten Freisetzung der Substrate TNF, TNFR1, TNFR2 und TGF α (Peiretti et al. 2003b; Marcello et al. 2007; Surena et al. 2009). Im Falle von ADAM10 wird

das Protein durch SAP97 effektiver durch den Golgi-Apparat transportiert und gelangt so direkt an die Membranoberfläche, was zu einer erhöhten Freisetzung von APP (*amyloid precursor protein*) führt, wodurch weniger A β Peptid gebildet wird (Saraceno et al. 2014).

1.4 Bekannte (IL-6R) und neue Substrate der ADAM-Proteasen

1.4.1 Der Aufbau und die Signalwege des IL-6R

Der IL-6R wurde 1993 als Substrat von ADAM17 nachgewiesen (Müllberg et al. 1993). Zehn Jahre später konnte auch gezeigt werden, dass dieser Rezeptor ebenfalls von ADAM10 prozessiert wird (Matthews et al. 2003). Durch das *Shedding* wird der lösliche IL-6R gebildet (sIL-6R), der bereits 1989 kloniert und untersucht wurde (Taga et al. 1989). Der lösliche Rezeptor kann, genau wie der membrangebundene Rezeptor, weiterhin das entsprechende Zytokin binden.

Dieses ist das IL-6, welches ein 21-28 kDa großes, aus vier langen α -Helices (May et al. 1991; Bravo and Heath 2000) aufgebautes Zytokin ist und sich durch ein breites Wirkungsspektrum auszeichnet. Dieses Zytokin reguliert Einflüsse im Immun- und dem Nervensystem. Darüber hinaus ist es sowohl an metabolischen, als auch an pro- und antiinflammatorischen Prozessen beteiligt (Scheller et al. 2011b). Für die Signaltransduktion des IL-6 ist die Bildung eines Rezeptorkomplexes aus dem IL-6R (α -Rezeptor) und zweier signaltransduzierender β -Rezeptoren (gp130) notwendig (Hirano and Kishimoto 1992; Rose-John et al. 2007). Der Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R) ist ein 80 kDa großer, glykosylierter, Typ-I Transmembranrezeptor, welcher aus drei extrazellulären Bereichen, einer 52 Aminosäuren langen Stalk-Region, einer Transmembrandomäne (TMD) und einer intrazellulären Domäne (ICD) aufgebaut ist. Die drei Domänen des extrazellulären Bereichs bilden eine Immunglobulin (IgG)-ähnliche Domäne (D1) und zwei Fibronectin Typ-III Domänen (D2 und D3) (Yamasaki et al. 1988; Varghese et al. 2002). Die Bindung des Zytokins IL-6 erfolgt über eine Interaktion mit den Domänen D2 und D3, welche ein Zytokin-Bindungs-Modul (CBM) mit einem konservierten WSXWS Motiv und vier Cysteinen bilden

1 Einleitung

(Sprecher et al. 1998). Die Stalkregion muss eine definierte Länge von mindestens 83 Å haben um eine Signaltransduktion durch eine korrekte Interaktion mit den beiden gp130 Proteinen zu gewährleisten (Baran et al. 2013). Des Weiteren findet in der Stalk-Region die proteolytische Spaltung durch ADAM10 und ADAM17 in der Nähe der Membran statt, wodurch eine lösliche Variante des IL-6R freigesetzt wird (Müllberg et al. 1993). Die Signalweiterleitung des IL-6 erfolgt durch gp130. Bislang wurde für die ICD des IL-6R nur eine Funktion zur basolateralen Sortierung nachgewiesen (Martens et al. 2000).

IL-6 und der IL-6R haben nur als ein gemeinsamer Komplex eine Affinität zu gp130. In der ungebundenen Form erfolgt keine Interaktion mit gp130 (Jostock et al. 2001).

Nach der Bindung des IL-6/IL-6R Komplexes an gp130, homodimerisiert gp130 und initiiert eine Signalkaskade über den JAK/STAT-Weg, wobei STAT1 und STAT3 nach Bindung an phosphorylierten Tyrosinen des gp130 aktiviert werden (Eulendorf et al. 2012). Das Tyrosin (Y₇₅₉) rekrutiert die Phosphatase SHP-2, wodurch der Ras-Raf-MAPK Signalweg aktiviert wird (Hibi et al. 1990; Fukada et al. 1996; Schmitz et al. 2000; Heinrich et al. 2003; Scheller et al. 2006a).

Diese Art des IL-6 Signals ist aufgrund der fehlenden Interaktion des IL-6 an gp130 ohne den IL-6R in klassischer Weise nur auf Zellen möglich, die den IL-6R tragen. Somit wären nur Zellen wie Hepatozyten, Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, B-Zellen und einige T-Zellpopulationen, die den IL-6R exprimieren, responsiv gegenüber IL-6 (Oberge et al. 2006; Rose-John et al. 2006; Scheller and Rose-John 2006). Der Co-Rezeptor (gp130), der für die Signalweiterleitung notwendig ist, wird hingegen auf allen Zellen exprimiert (Scheller et al. 2006b; Garbers et al. 2011). Neben dem klassischen Signal gibt es aber auch noch den Trans-Signalweg (*trans-signaling*), der durch die lösliche Variante des IL-6R (sIL-6R) aktiviert wird. Die Bildung des sIL-6R erfolgt auf zwei Arten, einerseits durch eine proteolytische Spaltung in der Stalk-Region, vermittelt durch ADAM10 oder ADAM17 (90-99%), andererseits durch alternatives Splicing der mRNA (1-10%) (Lust et al. 1992; Chalaris et al. 2011; Rose-John 2012) (s. Abb. 1.5). Die Generierung des sIL-6R durch alternatives Splicing konnte bisher nur im Menschen, nicht aber in der Maus nachgewiesen werden (Scheller et al. 2011a; Schumacher et al. 2015).

ADAM17 spaltet den membranständigen IL-6R in der Stalk-Region zwischen den Aminosäuren Q₃₅₇-D₃₅₈ (Müllberg et al. 1994b) und ADAM10 spaltet in der Stalk-Region zwischen den Aminosäuren S₃₅₃-F₃₆₇ (Baran et al. 2013). Nach der proteolytischen Spaltung,

verbleiben die Transmembrandomäne und der intrazelluläre Bereich des IL-6R in der Membran und werden durch eine γ -Sekretase weiter prozessiert. Hierbei wird das C-terminale Fragment (CTF) freigesetzt. Ob dieses Fragment noch eine weitere biologische Funktion hat, wie bei dem CTF von Notch, das noch als Transkriptionsfaktor dient, ist noch nicht erforscht (Oswald et al. 2001; Chalaris et al. 2010b).

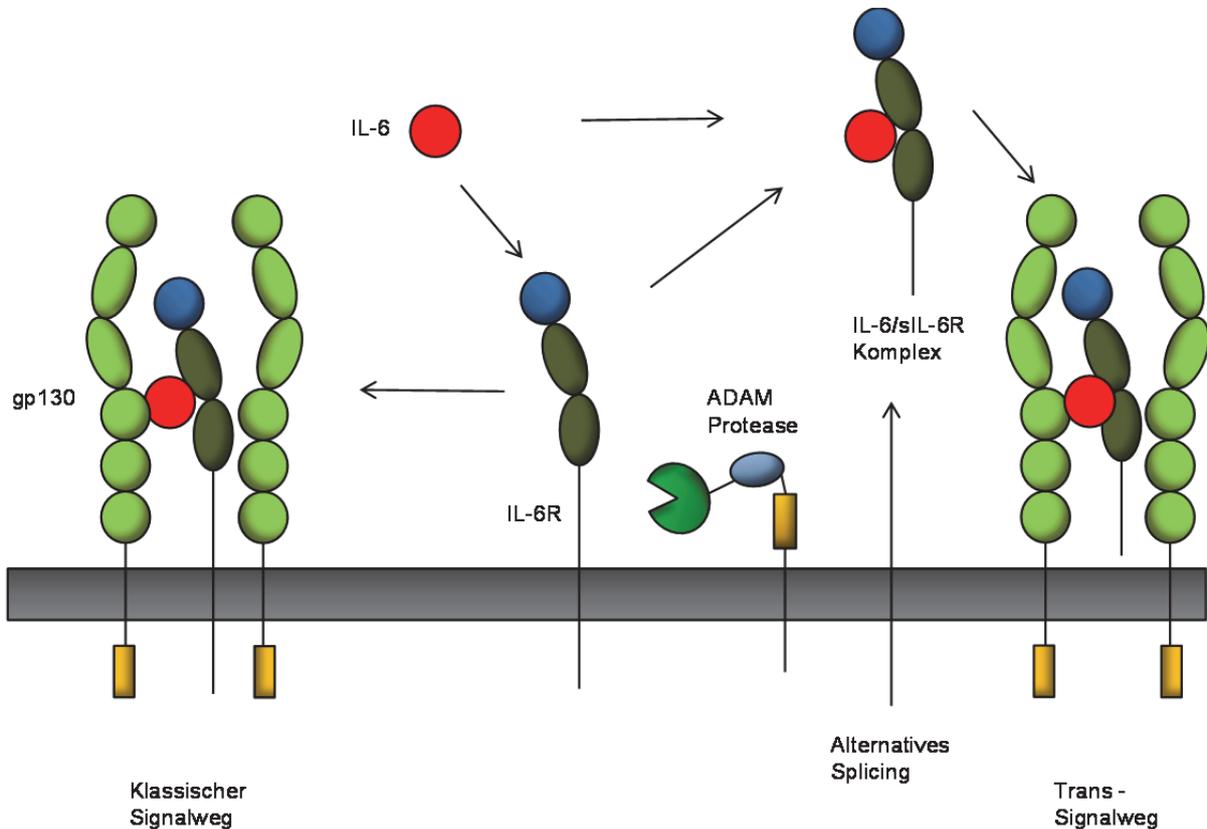


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Signalwege des IL-6/IL-6R Komplexes. Der IL-6/IL-6R Komplex löst Signale über zwei Wege aus. Bei dem klassischen Weg (links dargestellt) bindet IL-6 an den membrangebundenen IL-6R, wodurch zwei signaltransduzierende gp130-Moleküle rekrutiert werden. Der andere Weg erfolgt nach Bindung des IL-6 an den löslichen IL-6R (sIL-6R), welcher durch Ektodomänenspaltung durch ADAM-Proteasen oder durch alternatives Splicing gebildet wird. Dieser Komplex aus IL-6 und sIL-6R stimuliert nun Zellen, die keinen IL-6R exprimieren, Zellen, von denen der Rezeptor freigesetzt wurde oder auch Zellen, die den IL-6R selbst exprimieren. Dieser Signalweg wird auch *trans-signaling* genannt.

Durch einen konditionellen *Knockout* des IL-6R in verschiedenen Zelltypen wurde in diesen transgenen Mäusen nachgewiesen, dass für die Generierung des murinen sIL-6R hauptsächlich Hepatozyten und hämatopoetische Zellen verantwortlich sind (McFarland-Mancini et al. 2010). Im gesunden Menschen findet sich 25-35 ng/ml sIL-6R im Plasma (Honda et al. 1992; Hunter and Jones 2015), was sich jedoch unter inflammatorischen Bedingungen erhöht (Rose-John 2012).

Die Unterschiede der Auswirkungen des *classic-signaling* und des *trans-signaling*, sind gravierend. So führt der klassische Signalweg hauptsächlich zu positiven Zellantworten, wie der Aktivierung des Immunsystems und zu anti-inflammatorischen Zellantworten, aber auch zur Differenzierung von B-Zellen und Proliferation von Hepatozyten, was zur Regeneration der Leber führt. Der Trans-Signalweg führt hingegen zur Aktivierung von pro-inflammatorischen Signalen, Inhibition der T-Zell-Apoptose und malignen Proliferation von Epithelzellen (Chalaris et al. 2011; Scheller et al. 2011b).

Auf der Zelloberfläche ist die Expression von gp130 wesentlich größer als die des IL-6R, deswegen führt der klassische Signalweg nur zur Aktivierung einiger gp130 Moleküle. Beim *trans-signaling* hingegen werden alle gp130 Moleküle aktiviert, und somit eine stärkere Signalamplitude erzeugt (Rose-John 2012).

1.4.2 Aufbau und Funktion des IL-23R

2006 wurde die SNP (*single nucleotide polymorphism*) Variante rs11209026 (R381Q) detektiert, die durch alternatives Splicing eine lösliche Variante des IL-23R (sIL-23R) bildet. Die Expression dieser löslichen Variante führt zu einer verminderten Expression der Th17 Zytokine IL-17A und IL-17F und hat einen protektiven Effekt auf die Krankheiten Morbus Chron und Ulcerative Colitis. Der lösliche IL-23R scheint somit eine antagonistische Wirkung auf den IL-23 Signalweg zu haben (Duerr et al. 2006; Yu and Gallagher 2010; Yu et al. 2015).

Der membrangebundene Interleukin-23 Rezeptor (IL-23R) wurde 2002 als Rezeptor identifiziert, der zusammen mit dem Rezeptor IL-12R β 1 den Rezeptorkomplex für das Zytokin Interleukin-23 (IL-23) bildet. Der Nachweis des IL-23R erfolgte in lymphoiden Zellen des angeborenen Immunsystems, sowie T- und B-Zellen. Die cDNA des IL-23R wurde außerdem in geringen Mengen in Makrophagen, dendritischen Zellen und PBMCs (*peripheral blood mononuclear cell*) nachgewiesen (Parham et al. 2002; Langrish et al. 2004; Chognard et al. 2014).

Ein Gen von 150 kb kodiert für den humanen IL-23R, welches auf dem Chromosom 1 liegt (Maus Chromosom 6). Auf dem gleichen Segment ist auch der humane IL-12R β 2 kodiert. Der IL-23R ist ein Typ-I Transmembranprotein, aus 629 Aminosäuren (Maus 644) und

1 Einleitung

71,72 kDa (Maus 73,45 kDa) (UniProt: Q5VWK5, bzw. Q8K4B4), mit einer großen Homologie zu anderen Zytokinrezeptoren, besonders zum Rezeptor IL-12R β 2 und gp130 (Floss et al. 2015).

Der extrazelluläre Bereich umfasst eine Signalsequenz für den Transport zur Zellmembran, daran angeschlossen liegen eine Ig-ähnliche Domäne (D1) und zwei Zytokin-Binde-Domänen (D2, D3). Für die weitere Modifikation befinden sich im extrazellulären Bereich potentielle N-Glykosylierungsstellen (8 für den humanen und 7 für den murinen Rezeptor). Im Bereich nahe der Membran, in der D3-Region enthält der Rezeptor eine WQPWS Sequenz, die dem WSXWS Motiv anderer Zytokinrezeptoren entspricht. Interessanterweise besitzt der murine IL-23R in dieser Region eine Duplikation von 20 Aminosäuren, die dieses Motiv enthält. Diesem Motiv folgt ein Stalk aus 37 Aminosäuren, dem sich eine einzelne Transmembrandomäne anschließt. Im zytoplasmatischen Bereich des humanen Rezeptors finden sich sieben Tyrosinreste, die mit Ausnahme des Y₄₆₃ auch in der Maus konserviert sind (Parham et al. 2002). Drei dieser Tyrosine bilden SH2-Domänen (Src homolog 2 Domäne), eine potentielle SHP2 Bindestelle (Y₃₉₉EDI) (Case et al. 1994), eine für die Bindung von STAT1 und STAT3 (Y₆₁₁FPQ) (Heinrich et al. 1998) und eine potentielle Bindestelle für STAT4, die sich auch im IL-12R β 1 wiederfindet (GY₄₈₄KPQIS) (Naeger et al. 1999; Yao et al. 1999). Des Weiteren wurde eine Assoziation des Rezeptors mit Jak2 nachgewiesen, obwohl die für die Interaktion notwendige Prolin-reiche Region nicht ausreichend definierbar ist (Parham et al. 2002). Für den IL-23R existieren verschiedene Splice-Varianten, wobei eine dieser Varianten einen löslichen IL-23R bildet (Zhang et al. 2006; Kan et al. 2008; Mancini et al. 2008; Yu et al. 2015).

Der Ligand des IL-23R ist das Zytokin IL-23, welches aus den beiden Untereinheiten p19 und p40 besteht. Die Untereinheit p40 sowie einen der beiden Rezeptoren teilt sich IL-23 zusammen mit IL-12. So nutzen IL-12 als auch IL-23 den IL-12R β 1, wobei IL-23 noch den IL-23 Rezeptor für die Signalweiterleitung verwendet (Oppmann et al. 2000).

IL-23 gehört zu der IL-12 Zytokinfamilie, die aus drei heterodimeren Zytokinen besteht, IL-12 (IL-12p35/p40), IL-23 (IL-23p19/p40) und IL-35 (IL-12p35/Ebi3) (Vignali and Kuchroo 2012). Diese Zytokinfamilie ist durch die Struktur seiner Zytokine nah verwandt mit der IL-6 Zytokinfamilie. Das neu entdeckte IL-35 bildet dabei den Übergang zwischen den beiden Familien und definiert so einen *cross-talk* zwischen den beiden Klassen (Garbers et al. 2012).

1 Einleitung

Die Interaktion des Zytokins mit seinen entsprechenden Rezeptoren verläuft in der IL-6 Familie nach dem kanonischen I-II-III Paradigma. Hierbei bindet das Zytokin mit der Seite I an seinen nicht signalisierenden α -Rezeptor (IL-6R) und mit der Bindestelle II und III die β -Rezeptoren (gp130, Domäne 1 und gp130, Domäne 2 und 3) (Boulangier et al. 2003; Bobby et al. 2014). Dieses Paradigma trifft jedoch nicht auf die Interaktion zwischen IL-23 und seinen Rezeptoren zu. Im Gegensatz zum IL-6R, der nicht ohne IL-6 an gp130 bindet, kann p40, welches dem α -Rezeptor entspricht, auch ohne seinen Bindungspartner (p19) an IL-12R β 1 binden. In diesem Fall blockiert p40 die Signalwege von IL-12 und IL-23. Die Bindung zwischen p19 und p40 wird über die Bindestelle I vermittelt, jedoch ist für die Interaktion von p19 mit dem IL-23R über die Bindestelle III eine vorherige Interaktion mit p40 notwendig. Eine Bestätigung der vermuteten Bindestelle II erfolgte nicht, jedoch wurde der Nachweis erbracht, dass p40 direkt ohne die Bindung von p19 mit IL-12R β 1 interagiert (Schröder et al. 2015).

Die Bindung des heterodimeren Zytokins IL-23, welches aus den Untereinheiten p19 und p40 besteht, resultiert in einer Aktivierung von Jak2 und Tyk2, welche hauptsächlich STAT3, aber auch STAT1, -4 und -5 phosphorylieren. Dies ist die gleiche Antwort, die die Zelle auch auf eine Stimulation mit IL-12 geben würde, wobei in diesem Fall die Aktivität von STAT4 wesentlich höher wäre (Parham et al. 2002). Der IL-23 Rezeptor ist dabei der Hauptakteur um die Signale weiterzuleiten.

IL-23 fördert zusammen mit IL-6, TGF- β und IL-21 die Entwicklung und Proliferation von Th17-Zellen, die durch die Expression von IL-17 und anderer pro-inflammatorischer Zytokine charakterisiert werden (Langrish et al. 2005). Die Expression von IL-17 ist essentiell für die Abwehr verschiedener Pathogene (Infante-Duarte et al. 2000). Für die Entwicklung der Th17-Zelle wird die Differenzierung der naiven CD4⁺-Zellen durch IL-6 und TGF- β induziert, wodurch IL-21 exprimiert wird (Zhou, L. 2007). Im Anschluss fördert IL-21 die Expression des IL-23R in Abhängigkeit von STAT3 und ROR γ t. Die T-Zellen reagieren nun durch die Expression von IL-12R β 1 und IL-23R auf IL-23 (Chen et al. 2006; Wei et al. 2007; Durant et al. 2010).

Eine falsche Regulation des Signalweges von IL-23 kann zu Krankheiten, wie Psoriasis, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose und Krebs führen (Chan et al. 2006; Langowski et al. 2006; Yen et al. 2006; Cargill et al. 2007; McInnes and Schett 2007).

1 Einleitung

Zur Inhibition der IL-23 vermittelten Signaltransduktion sind mehrere Angriffsstellen möglich. So können die Zytokinuntereinheiten (p40 und das p40 Dimer, p80) aber auch lösliche Rezeptoren (sIL-23R) und neutralisierende Antikörper (anti-p40, anti-p19) für die Inhibition genutzt werden. Die Blockierung von p40 oder IL-12R β 1 inhibieren dabei nicht nur den IL-23, sondern auch den IL-12 vermittelten Signalweg (Floss et al. 2015). Als mögliche Therapeutika sind momentan Antikörper gegen die p40 Untereinheit in der Entwicklung (Ustekinumab, Briakunumab) (Lima et al. 2009; Benson et al. 2011). Für eine selektive Inhibition des IL-23 Signalwegs befindet sich ein p19-spezifischer Antikörper in klinischen Studien (Gaffen et al. 2014).

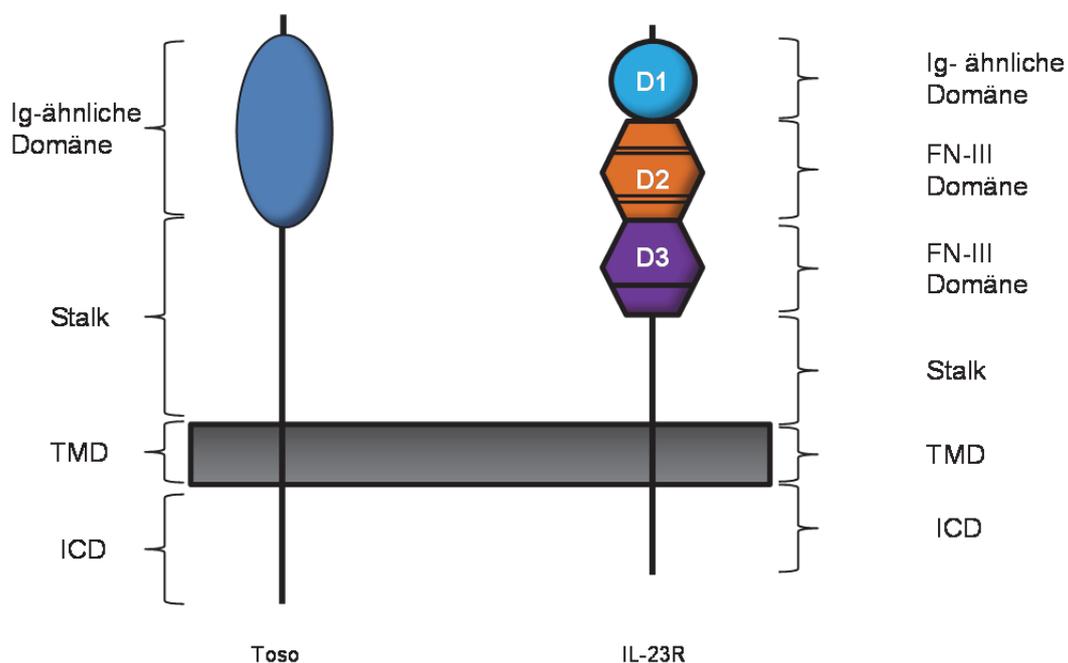


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der untersuchten Rezeptoren Toso und IL-23R. Eine genaue Erklärung der Rezeptoren und Funktionen findet sich in den Abschnitten 1.4.2-1.4.3. Der Toso Rezeptor (links) ist aus einer Ig-ähnlichen Domäne, einer langen Stalk Region und einer Intrazellulären-Domäne (ICD) aufgebaut. Der IL-23R (rechts) ist aus einer N-terminalen Ig-ähnlichen Domäne D1 aufgebaut (Kreis) Die Fibronectin-III Domänen (D2, D3) der Zytokinrezeptor-homologen-Region werden als Sechsecke dargestellt. Konservierte Cysteinpaare werden in der D2 Region als doppelte Linien dargestellt. Das Motiv WQWPS in der Domäne D3 wird durch einen breiten Balken symbolisiert. TMD= Transmembrandomäne, ICD= intrazelluläre Domäne.

1.4.3 Aufbau und Funktion des IgM Rezeptors Toso (Fc μ R)

Im Serum von Patienten, die an Chronisch-Lymphatischer Leukämie (CLL) leiden, wurde ein lösliches Toso-Protein mit einer Größe von 40 kDa nachgewiesen. Dabei wurde gezeigt, dass dieses durch alternatives Splicing gebildet wird (Li et al. 2011b). Ob dieses lösliche Rezeptorprotein immer noch den Antikörper IgM binden kann, wie das membrangebundene Toso, konnte bisher nicht bestätigt werden.

Antikörper sind Proteine aus der Klasse der Immunglobuline. Sie bestehen aus jeweils zwei leichten und zwei schweren Ketten, die durch Disulfidbrücken zu einer Y-förmigen Struktur zusammengesetzt sind. Beide Ketten bestehen aus jeweils einer variablen und mindestens einer konstanten Domäne. Die variablen Regionen dienen der Antigenbindung und die konstante Region wird für die Interaktion mit Fc-Rezeptoren genutzt. Für die Immunglobuline IgG, IgE und IgA sind Fc-Rezeptoren schon beschrieben. So bindet IgG an Fc γ RI und Fc γ RIV, IgE bindet an Fc ϵ RI und IgA interagiert mit Fc α R (Ravetch and Kinet 1991; Daëron 1997; Monteiro and Van De Winkel 2003; Nimmerjahn et al. 2005). IgM, welches als Monomer auf der Oberfläche von B-Zellen, aber auch als sekretiertes Pentamer vorkommt, bindet an PIGR (*polymeric Ig receptor*) und FcR für IgA und IgM (Kubagawa et al. 2009). Ein Rezeptor, der ausschließlich IgM bindet, wurde im Vorfeld vermutet und später auf CD4 und CD8 T-Zellen identifiziert (Moretta et al. 1977; Reinherz et al. 1980). 1987 erfolgte der erste Nachweis eines 60 kDa großen Sialoglykoproteins auf induzierten und Chronisch-Lymphatischen Leukämie (CLL) B-Zellen durch eine Immunopräzipitation mit IgM mAb (Sanders et al. 1987). Im weiteren Verlauf wurde dieser Fc μ R als einziger Fc-Rezeptor auch auf humanen T-Zellen identifiziert. (Nakamura et al. 1993; Kubagawa et al. 2009; Murakami et al. 2012). Durch die Anfertigung und Transfektion einer cDNA-Bibliothek in B-Zellen, die kein IgM binden, wurde ein offener Leserahmen (ORF) identifiziert, welcher einen Rezeptor bildet, der die Bindung des IgM auf den B-Zellen ermöglicht (Kubagawa et al. 2009).

Dieser ORF besteht aus 1173 bp und bildet ein Typ I-Transmembranprotein aus 390 Aminosäuren. Dieser Rezeptor trägt ein Signalpeptid, welches abgespalten wird, gefolgt von einer 107 Aminosäuren großen Ig-ähnlichen Domäne, welche für die Bindung von IgM, mit einer Avidität von ~ 10 nM, verantwortlich ist (Kubagawa et al. 2009). Zwischen dieser

1 Einleitung

Domäne und der Transmembranregion liegt eine 127 Aminosäuren lange Stalkregion, gefolgt von einer Transmembrandomäne, die 21 Aminosäuren lang ist und einen geladenen Histidinrest enthält. Vire et al. bestätigten, dass es mehrere Stellen für O-Glykosylierungen in der Stalkregion gibt (Vire et al. 2011). Der Rest des Rezeptors besteht aus einem 118 Aminosäure langen zytoplasmatischen Bereich (Ohno et al. 1990; Kubagawa et al. 2009). Fc μ R trägt eine geladene Aminosäure in der Transmembrandomäne und eine lange zytoplasmatische Domäne mit konservierten Tyr und Ser Resten. Auf diese Weise ist eine Signalweiterleitung des Fc μ R sowohl durch einen Interaktionspartner, der an das Histidin bindet, als auch direkt über die Tyrosin- und Serinreste möglich (Ravetch and Kinet 1991; Kubagawa et al. 2014a). Bei einer Stimulation mit IgM wurde eine Phosphorylierung der Tyrosin- und Serinreste und außerdem eine Phosphorylierung der PLC γ (Phospholipase C γ) und ERK1/2 nachgewiesen (Kubagawa et al. 2009; Murakami et al. 2012).

Die intrazelluläre Domäne trägt außerdem noch eine Prolin-reiche Domäne, die für den Transport des Rezeptors zur Zelloberfläche verantwortlich ist und ein YXX Φ Motiv, welches für die schnelle Clathrin-abhängige Endozytose nach einer Bindung des IgMs zuständig ist. Der internalisierte Rezeptor wird im Laufe der Endozytose im Lysosom degradiert (Vire et al. 2011).

Das Gen für diesen IgM-Rezeptor liegt auf dem humanen Chromosom 1q32.2, in direkter Nachbarschaft zu zwei anderen IgM- Rezeptoren (pIgR, Fc α / μ R), die zusätzlich IgA binden können (Kubagawa et al. 2009).

Die Oberflächenexpression des Rezeptors ist auf B- und T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems beschränkt. Die Expression des Rezeptors nimmt mit der Entwicklung der B- und T-Zellen weiter ab. Durch eine Stimulation mit IgM wird die Expression des Rezeptors noch gesteigert. Daher ist sie in naïven B- und T-Zellen und in CLL-Zellen besonders hoch (Sanders et al. 1987; Ohno et al. 1990; Kubagawa et al. 2009; Pallasch and Wendtner 2009).

Im Serum von CLL-Patienten fand sich auch eine lösliche Variante des Rezeptors mit unbekannter Funktion. Diese Variante ist ein \sim 40 kDa großes Protein, welches durch alternatives Splicing gebildet wird (Li et al. 2011b). Das Alignment der cDNA von Fc μ R mit einer Datenbank ergab, dass diese cDNA identisch mit der DNA von FAIM3/Toso ist (Kubagawa et al. 2014a).

Nach Hitoschi et.al sind Jurkat Zellen, die den Fc μ R überexprimieren, nach einer Stimulation mit IgM anti-human Fas mAb, resistent gegenüber der Fas induzierten Apoptose.

Dieser Rezeptor wurde daraufhin als *Fas apoptotic inhibitory molecule 3* (FAIM3) klassifiziert und erhielt den Namen Toso. Toso ist ein Likör, welcher in Japan an Neujahr auf ein langes Leben und ewige Jugend getrunken wird (Hitoshi et al. 1998). Dementsprechend wurde auch das Gen im Menschen *FAIM3* und in der Maus *Faim3* benannt. Der positive Effekt des Toso Proteins gegenüber der induzierten Apoptose wurde jedoch wiederlegt, weil in Toso exprimierenden Zellen immer noch Apoptose durch die Stimulation mit Fas-L ausgelöst wird (Honjo et al. 2012b). Die Ergebnisse von Hitoshi bestätigen eher eine Bindung des IgM, als einen Schutz vor Apoptose, da gezeigt wurde, dass Fas, ligiert an IgG3 mAb, Apoptose in Fc μ R exprimierenden Zellen auslöst (Kubagawa et al. 2009). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass nach der Blockierung der IgM-Bindedomäne des Toso Proteins, wieder Apoptose durch den agonistischen IgM anti-Fas mAb ausgelöst wird (Kubagawa et al. 2014b). Aus diesen Gründen handelt es sich bei dem Toso Rezeptor eher um einen IgM-Binderezeptor, als um ein *Fas apoptotic inhibitory molecule*. Die Bindung des IgM an Toso wurde in verschiedenen Publikationen beschrieben. Dabei fiel auf, dass der humane Toso Rezeptor besser murines als humanes IgM bindet und IgA gar nicht gebunden wird (Pricop et al. 1993; Kubagawa et al. 2014a).

In Mäusen konnte der Fc μ R bisher nur in B-Zellen nachgewiesen werden, wobei das Protein in den Prä-B-Zellen exprimiert und im Laufe der Zellentwicklung abnimmt (Honjo et al. 2012a). Fc μ R KO Mäuse zeigten folgende Veränderungen in ihrem Phänotyp: erhöhte IgM Konzentration im Serum nach einer Immunreaktion, Veränderungen in der B-Zell Subpopulation, Dysregulation der Immunantwort, Beeinträchtigung der B-Zell Proliferation und Veranlagung zur Produktion von selbst gerichteten Antikörpern (Ouchida et al. 2012; Choi et al. 2013).

1.5 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung neuer Substrate und der Regulation der ADAM-Proteasen ADAM10 und ADAM17.

ADAM10 und ADAM17 sind an vielen Prozessen beteiligt, wie Embryonalentwicklung und Homöostase des Gewebes. Bisher ist unbekannt, wie diese Enzyme reguliert werden und wie die genaue Erkennung des Substrates abläuft. Eine unkontrollierte Aktivierung von

1 Einleitung

ADAM17 kann zur Tumorentwicklung und chronischen Erkrankungen führen (Mochizuki and Okada 2007; Chalaris et al. 2011). Aus diesem Grund wird nach spezifischen Inhibitoren geforscht, um die Aktivität der Proteasen zu regulieren. Diese Inhibitoren haben jedoch auch einen Einfluss auf die Freisetzung anderer Substrate, wie zum Beispiel Notch, wodurch weitere molekularbiologische Prozesse beeinflusst werden. Daher ist es wichtig alle Substrate, die durch die Proteasen prozessiert werden können, zu identifizieren. Obendrein können durch die Detektion neuer Substrate möglicherweise Rückschlüsse auf die Regulation der Proteasen und auf Krankheitsbilder, die durch die Freisetzung von Rezeptoren entstehen, gezogen werden.

Bei den zu untersuchenden potentiellen Substraten handelt es sich um den Interleukin-23 Rezeptor und den IgM-Rezeptor Toso.

Der IL-23R wird auf das *Shedding* untersucht, um mehr über die Signalweiterleitung dieses Rezeptors zu erfahren. Dieser Signalweg ist nicht nur an der Differenzierung von Th17-Zellen beteiligt, sondern hat auch einen starken Einfluss auf die Entwicklung von Autoimmunkrankheiten, wie Psoriasis, Rheumatoider Arthritis und Multiple Sklerose.

Toso ist ein neu entdeckter, IgM spezifischer Rezeptor, dessen Funktionen noch weitestgehend unbekannt sind. Bisher wurde eine Prozessierung der Fc-Rezeptoren durch ADAM-Proteasen nur für den Fc α R, Fc γ RIIIA und Fc γ RIIIB, nachgewiesen (Peng et al. 2010; Guo et al. 2012; Lajoie et al. 2014).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, den Effekt des SAP97 Metalloproteasebindeproteins auf die Prozessierung des Interleukin-6 Rezeptors zu untersuchen. Auf diesem Wege soll analysiert werden, ob SAP97 das *Shedding* des IL-6R durch ADAM10 und ADAM17 reguliert.

Die Prozessierung der Rezeptoren soll in humanen und murinen Zelllinien durchgeführt werden, um eventuelle Unterschiede zwischen den humanen und murinen ADAM-Proteasen auszuschließen. Durch die Verwendung geeigneter Stimuli und von Inhibitoren, für die eine Selektivität der Proteasen gezeigt wurde, erfolgt eine Unterscheidung zwischen ADAM10 und ADAM17.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	f.c. 100 µg/ml
Kanamycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	f.c. 50 µg/ml
Puromycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	f.c. 1,5 µg/ml
Neomycin	G-418 Genomycin, Genaxxon, Ulm	f.c. 1,6 mg/ml
Hygromycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	f.c. 1 mg/ml

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primäre Antikörper

α -humaner IL-6R (4-11)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus Stocklösung: 1 µg/ml Western Blot, ELISA: 1:1000, Durchflusszytometrie, Immunohistochemie: 1:100 Herstellung beschrieben in (Chalaris et al. 2007)
α -humaner IL-6R (Baf227)	Biotinylierter IgG Antikörper aus der Ziege Stocklösung: 0,5 µg/µl ELISA: 1:1000 R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA
Sap97 (RPI 197.4)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus

2 Material & Methoden

Toso	Stocklösung: 1 µg/µl Western Blot: 1:1000 FAIM3 monoklonaler Antikörper aus der Maus
	Stocklösung: 0,5 µg/µl Durchflusszytometrie: 1:50, Western Blot: 1:500, Immunohistochemie: 1:60 Abnova, Taipei, Taiwan
α-muriner IL-23R (MAB 1686)	Monoklonaler Antikörper aus der Ratte Stocklösung: 0,5 µg/µl Durchflusszytometrie: 1:20 R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA
α-muriner IL-23R biotinyliert (BAF1686)	Polyklonaler Antikörper aus der Ziege Stocklösung: 0,2 µg/µl Western Blot 1:1000 R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA
α-humaner IL-23R (MAB 14001)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus Stocklösung: 0,5 µg/µl Durchflusszytometrie: 1:20 R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA
α-humaner IL-23R biotinyliert (BAF1400)	Polyklonaler Antikörper aus der Ziege Stocklösung: 0,2 µg/µl Western Blot: 1:1000 Durchflusszytometrie: 1:40 R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA
α-muriner IL-12Rβ1 (FAB 1998P)	Polyklonaler Antikörper aus der Ziege PE-konjugiert Durchflusszytometrie: 1:10 R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA
α-humaner IL-12Rβ1 (FAB 839P)	Polyklonaler Antikörper aus der Maus PE-konjugiert

2 Material & Methoden

α -GFP	Durchflusszytometrie: 1:10 R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA Anti-Green Fluorescent Protein Mouse IgG ₁ κ monoklonaler Antikörper Stocklösung: 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Roche Holding GmbH, Mannheim
α -humaner Fc	Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, HRP-konjugiert Stocklösung: 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Western Blot 1:1000 Thermo Fischer Scientific, Perbio Science Bonn, Deutschland
α -ADAM17 (A300E)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus Ein Geschenk vom Institut für Biochemie, CAU, Kiel, Deutschland (Trad et al. 2011) Stocklösung: 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Durchflusszytometrie: 1:40
α -ADAM17 (A300D)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus Ein Geschenk vom Institut für Biochemie, CAU, Kiel, Deutschland (Trad et al. 2011) Stocklösung: 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Western Blot: 1:500

2.1.2.2 Sekundäre Antikörper

α -Maus IgG-POD	<i>ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L)</i> Stocklösung: 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Western Blot: 1:5000 Thermo Fischer Scientific, Perbio Science USA, Waltham
------------------------	--

2 Material & Methoden

α -Kaninchen IgG-POD	<i>ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L)</i> Stocklösung: 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Western Blot: 1:5000 Thermo Fischer Scientific, Perbio Science USA, Waltham
α -Maus IgG (H+L)	<i>Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated Affini Pure F(ab')₂ Fragment</i> aus der Ziege Stocklösung: 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Durchflusszytometrie: 1:1000 Jackson Immuno Research, West Grove, Pa (USA)
α -Maus IgG (H+L)	<i>Allophycocyanin-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment</i> aus der Ziege Stocklösung: 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Durchflusszytometrie: 1:1000 Jackson Immuno Research, West Grove, Pa (USA)
α -Ratte IgG (H+L)	<i>Alexa Fluor 647-conjugated Affini Pure F(ab')₂ Fragment</i> aus der Ziege Stocklösung: 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Durchflusszytometrie: 1:1000 Jackson Immuno Research, West Grove, Pa (USA)
Alexa Fluor 546 Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Stocklösung: 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Immunohistochemie: 1:500 <i>Life Technologies, Eugene, USA</i>

2.1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien, die nicht in dieser Liste aufgeführt sind, wurden von Carl Roth GmbH, Karlsruhe bezogen.

6x Orange DNA Loading Dye	Thermo Scientific, Waltham, USA
APC-Streptavidin (0,2 µg/µl)	BD Biosciences Erembodegem, Belgien
Agarose	Bio-Budget Technologies, Krefeld
Brophenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cell titer blue reagent	Promega, Mannheim
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
GI254023X	Glaxo Smith Kline, Stevenage, UK
GW280264X	Glaxo Smith Kline, Stevenage, UK
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
NHS-aktivierte Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Nonidet-P40	Sigma-Aldrich, Steinheim
PageRuler Prestained	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sucrose	Merck KGaA, Darmstadt

2 Material & Methoden

Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
POD Substrat	Roche Holding GmbH, Mannheim
ProLong Gold <i>antifade reagent with DAPI</i>	<i>Life Technologies</i> , Eugene, USA
Protein-A Agarose	Roche Holding GmbH, Mannheim
Streptavidin-HRP Lösung	R&D Systems, Wiesbaden
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt
Trypanblau	Bio-Rad, München
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.4 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme (Polymerasen, Restriktionsenzyme u.a.) stammen von Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA).

2.1.5 Geräte

BD FACS Canto II	Becton Dickson GmbH, Heidelberg
Binder CO ₂ -Inkubator 150 (E2) Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
Biorad PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik, Lancing, UK
NanoDrop 2000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
INTAS ChemoCam Imager	Intas, Göttingen
INTAS Gel iX Imager	Intas, Göttingen
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf GmbH, Hamburg
Laborfuge 400R	Heraeus GmbH, Hanau
MARS Safety Class 2 Sterilbank	Scanlaf, Lynge, Dänemark
Peqstar 2x Twin Block Thermal Cycler	Peqlab, VWR, Erlangen, Deutschland

2 Material & Methoden

pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetus [®] -Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg
Intelli Mixer	NeoLab, Heidelberg
TC10 Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tecan infinite M200 PRO Reader	Tecan, Maennedorf, Schweiz
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg
Trans-Blot Turbo System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies, Krefeld
Vortexer	VortexGenie2, Scientific Ind., NY, USA
Waage EW 4000	Kern & Sohn GmbH, Balingen

2.1.6 Kits

Folgende Kits wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Bestimmung von Proteinkonzentration	BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Waltham, USA
Detektion von Chemolumineszenz	ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, München
DNA-Extraktion aus Agarosegelen und Reinigung von PCR-Produkten	NucleoSpin Gel and PCR Clean up, Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Midi-Präparation von Plasmid-DNA	NucleoBond Xtra Midi, Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Mini-Präparation von Plasmid-DNA	Gene JET Plasmid Miniprep KIT, Thermo Scientific, Waltham, USA
Proliferationsassay	CellTiter-Blue Cell Viability Assay,

2.1.7 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics MWG Operon GmbH, Ebersberg bezogen und sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Oligonukleotide

Name	Nukleotidsequenz
Toso-1	5'-CTTAAGCTTGGTACCGTTTAAAC-3'
Toso-2	5'-TTCTGGGAGGATCCTCAGATCCTCTTCTGA-3'
Toso-3	5'-TCAGAAGAGGATCTGAGGATCCTCCCAGAA-3'
Toso-4	5'-TGTTACCTCCACTAGGAACAGATTCTTGCG-3'
PDZ3-only-fw	5'-GATCGGTACCGCCACCATGCCTAGAAAAGTTGTTCTT-3'
PDZ3-only rev	5'-GATCGCGGCCGCTGTGCGACAATAGTGACAGC-3'
PDZ3-del-1	5'-GCGGGTAAATGACTGTATACTGAGAGTAAATGAAGC-3'
PDZ3-del-2	5'-GATGAGATCACTAGGGAAAGGGTCTCTCCGAACCAGCC-3'
PDZ3-del-3	5'-GGCTGGTTCGGAGAGACCCTTCCTAGTGATCTCATC-3'
PDZ3-del-4	5'-CACTCTCACCATCTGGGGTCACCTGTCTGGCCTGCCACC-3'
Sap del GFP fw	5'-ACCCACTGCTTAAGCCTCAATAG-3'
Sap del GFP rev	5'-AGATCTGGTGGCGACCGGTAGCGCTA-3'
Toso del TM1	5'-CTGGTGCCGCCTCTAGACTGAGAATCC-3'
Toso del TM2	5'-GGCCAGGGCTTCCACAAGAGGGCCGTGGAA-3'
Toso del TM3	5'-TTCCACGGCCCTCTTGTGGAAGCCCTGGCC-3'
Toso del TM4	5'-AGCTTCTGCTCAAGCTTGGCGGGCACGTTG-3'
Only GFP fw	5'-AAGCTTGGTACCGCCACCATGCCTAG-3'
Only GFP re	5'-GATCTCTAGACCTGTGCGACAATAGTGAC-3'
Sap delP GFP fw	5'-GATCGTTTAAACGCCACCATGCCGGTCCGGAAGCAAG-3'
Sap delP GFP re	5'-GATCGTTTAAACCTCATAATTTTTCTTTTGCTG-3'
Toso del IG1	5'-GCTGGCTAGCGTTTAAACGCCACCATGCTG-3'
Toso del IG2	5'-GAGCTGGGCGGCAGCGCCGGCATGAACACCG-3'

2 Material & Methoden

Toso del IG3	5'-CGGTGTTTCATGCCGGCGCTGCCGCCAGCTC-3'
Toso del IG4	5'-AAGGTTCTGGGCTTGTTCGCCGGCC-3'
Toso IL6R 1	5'-GATCGTTTAAACGCCACCATGCTGGCCGTGG-3'
Toso IL6R 2	5'-TCCCTCCAGCAACCAGGAAGCCCTGGCCCTCTCTGCC-3'
Toso IL6R 3	5'-GGCAGAGAGGGCCAGGGCTTCCCTGGTTGCTGGAGGGA-3'
Toso IL6R 4	5'-TCAGCGGGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTC-3'
GFP 2a ampl fw	5'-GATCGCTAGCGTGAGCAAGGGCGAGGAGC-3'
GFP 2a ampl re	5'-GATCCTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTC-3'
Toso d50 2	5'-CTCTGTGGCCGGCGACAAGCCCTTCCACATCCTGATCCCT-3'
Toso d50 3	5'-AGGGATCAGGATGTGGAAGGGCTTGTTCGCCGGCCACAGAG-3'
Toso d50 4	5'-ATCAGCGGGTTTAACTCAGAGGT-3'
TdICD 2A fw	5'-GATCGGTACCGCCACCATGAAGAGGGCCGTGGAAAG-3'
TdICD 2A re	5'-GATCGCGGCCGCGGGCGGGCACGTTGATGT-3'
mIL23R TV-TDf	5'-CAAACCTCCAGACAGATTCCAGGTACAGC-3'
mIL23R TV-TDr	5'-GCTGTAACCTGGGAATCTGTCTGGGAAGTTTG-3'
mIL23R QV-QDf	5'-CTTCCCAGACAGTTTCCCAGGATACAGCAAATCAT-3'
mIL23R QV-QDr	5'-ATGATTTTGCTGTATCCTGGGAAACTGTCTGGGAAG-3'
IL23R beide fw	5'-CTTCCCAGACAGATTCCCAGGATACAGCAAATCAT-3'
IL23R beide re	5'-ATGATTTTGCTGTATCCTGGGAAACTGTCTGGGAAG-3'
1fw3IL23soe	5'-CGTGGATAGCGGTTTACTC-3'
2re2IL23soe	5'-ATGGACGCAGAAGGTCCGTGACACCATCTGAAGA-3'
3fw3IL23SOE	5'-ATGGTGTCACGGACCTTCTGCGTCCATCATT-3'
4re4IL23SOE	5'-CCCTCAGCCTCAGGAGCAGG-3'
mIL23R pF3	5'-GCAAGCTTGCCACCATGAGTCACCTCACACTTCAGC-3'
mIL23R-D2-L RP	5'-TCTGCGGCCGCAGATCCGGAGCCAGAACCTATATCATCCAGATG-3'

2.1.8 Plasmide

Eine Auflistung aller Ausgangsplasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Alle Mutationen, die im Laufe dieser Arbeit generiert wurden und deren Klonierungsstrategien finden sich im Anhang 7.3.

p409-YFP	Expressionsplasmid für die Expression von YFP, welches eine starke Fluoreszenz in Säugetierzellen zeigt (AG Scheller).
pcDNA3.1 (+)	Vektor für transiente und stabile Proteinexpression in Säugetierzellen (Invitrogen, Carlsbad, California, USA)
p409	Vektor für transiente und stabile Proteinexpression in Säugetierzellen
pcDNA3.1-hIL-6R	pcDNA3.1 (+) dessen Insert für humanen IL-6R kodiert (Garbers et al. 2011)
pcDNA3.1-sap97-YFP	Expressionsvektor, dessen Insert für sap97 aus der Ratte kodiert, das C-Terminal mit YFP fusioniert ist (AG Scheller).
pcDNA3.1-mTACE-GFP	Expressionsvektor, dessen Insert für murines ADAM17 kodiert, das C-Terminal mit grün-fluoreszierendem Protein (GFP) fusioniert ist (AG Scheller).
pcDNA3.1-Toso-GFP	Expressionsplasmid, dessen Insert für humanes Toso Protein und GFP kodiert.

2 Material & Methoden

pcDNA3.1-Toso	Expressionsplasmid, dessen Insert für humanes Toso Protein kodiert. Toso DNA synthetisiert bei Life Technologies
pcDNA3.1-Toso-2A-GFP	Expressionsplasmid, dessen Insert für humanes Toso kodiert, welches an ein 2A Peptid und GFP fusioniert ist.
pcDNA3.1-mIL-23R	Expressionsplasmid, dessen Insert für den mIL-23R kodiert (AG Scheller).
pcDNA3.1-hIL-23R + Stalkdeletionsvarianten	Expressionsplasmid, dessen Insert für eine Variante des hIL-23R kodiert (AG Scheller)
pcDNA3.1-HmIL-23Fc	Expressionsplasmid, dessen Insert für ein Fc getagtes Fusionsprotein aus p19 und p40 kodiert (AG Scheller).
p409-smIL23R + Deletionsvarianten der Domänen	Expressionsplasmid, dessen Insert für eine lösliche Variante des mIL-23R kodiert. Kloniert von D. Floss, J. Schröder und M. Franke (AG Scheller).
p409-hIL-23R-(stalk hIL-6R)	Expressionsplasmid, dessen Insert für einen hIL-23R kodiert, bei dem die Stalkregion durch die Stalkregion des hIL-6R ersetzt wurde (AG Scheller).
pMOWS-Plasmid	Expressionsplasmid für die retrovirale Transduktion in murine Zelllinien. Kodiert für das entsprechende Gen und das Resistenzgene für die Selektion mittels Ampicilin und Puromycin bzw. Hygromycin
pMOWS-mIL-23R + Stalkdeletionsvarianten/-mutationen	Expressionsplasmid, dessen Insert für eine Variante des mIL-23R kodiert (AG Scheller/ diese Arbeit).

2.1.9 Puffer und Lösungen

Blocking Puffer (Western Blot)	5% Milchpulver in TBS-T
Blocking Puffer (ELISA)	5% Succrose 1% BSA in PBS
FACS-Puffer	0,5% BSA in PBS
IP-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 2,5 mM Natriumpyrophosphat 1 mM β -Glycerophosphat 1 mM Na_3VO_4
IP- Lyse-Puffer	IP-Puffer + 1% Triton X-100
Laemmli-Puffer (5x)	10% (m/V) SDS 5% (m/V) β -Mercaptoethanol 50% (m/V) Glycerol 125 mM Tris-HCL (pH 6,8) 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Nanotrap Dilution Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 1 Complete Tablette auf 50 ml

2 Material & Methoden

Nanotrap Lysis Puffer	Nanotrap Dilution Puffer + 0,5% NP40
<i>Mild Lysis Buffer</i>	150 mM NaCl 2 mM EDTA 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1% (m/V) Triton X-100 1% (m/V) NP-40 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM NaF 1 Complete Tablette auf 50 ml
PBS	150 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4) 1,7 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
PBS-T	0,05% (V/V) Tween-20 in PBS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 0,4% SDS
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,3) 192 mM Glycin 0,1% SDS
Solution 1 (S1)	25 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 50 mM Glucose 100 µg/ml RNaseA

2 Material & Methoden

Solution 2 (S2)	200 mM NaOH 1% SDS
Solution 3 (S3)	2,8 mM Kaliumacetat (pH 5,1)
Stripping Puffer	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2% (m/V) SDS 0,1% β -Mercaptoethanol
TAE Puffer	40 mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,1% Essigsäure 10 mM EDTA
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,5) 192 mM Glycin 20% Methanol
Trenngelbuffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 0,4% SDS
TBS	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl
TBS-T	0,05% (V/V) Tween-20 in TBS

2.1.10 Rekombinante Zytokine und Inhibitoren

Hyper-IL-6 (10 μ g/ml)	Fusionsprotein aus humanem IL-6 und humanem löslichen IL-6-Rezeptor, verbunden mit einem kurzen Peptidlinker.
----------------------------	---

2 Material & Methoden

HmIL-23-Fc (5 µg/ml)	Hergestellt wie in (Fischer et al. 1997; Schroers et al. 2005). Fusionsprotein aus p19 und p40, verbunden mit einem kurzen Peptidlinker, mit einem Fc Tag eines humanen IgG. Konditionierter Überstand aus COS7-Zellen, per p40 ELISA quantifiziert.
GI254023X	Spezifischer Inhibitor gegen ADAM10. Iris Biotech, Marktredwitz, Deutschland
GW280264X	Inhibitor gegen ADAM10 und ADAM17. Iris Biotech, Marktredwitz, Deutschland
Marimastat	Breitband Metalloproteinase Inhibitor. Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

BD Flacon 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Bioscience Discovery Labware, Bedford, MA, USA
Einmalspitzen	B.Braun, Melsungen
Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Röhrchen (15 und 50 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Handschuhe Nitra Tex	Ansell Healthcare, Brüssel, Belgien
Handschuhe Sempercare® Premium	SATRA TC, Northamptonshire, UK
Kryoröhrchen	VWR, Randor, USA
PCR Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
PVDF-Membran	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Sterilpipetten Costra Stripette	Coming Incorporated, Coming, USA
TC 10 System Counting Slides	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten (6, 12, 96-Well-Platten)	TPP, Trasadingen, Schweiz

Whatman-Papier VWR, International GmbH, Darmstadt

2.1.12 Zellkulturmedien

DMEM ^{-/-}	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), Life Technologies, Darmstadt
DMEM ^{+/+}	DMEM ^{-/-} , + 10% fötales Kälberserum (FCS) und 1% Penicilin (60 mg/l)/Streptomycin (100 mg/l)
RPMI ^{+/+}	RPMI 1640 (1x), Life Technologies, Darmstadt, + 10% fötales Kälberserum (FCS) und 1% Penicilin/Streptomycin
Fötales Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Darmstadt
Penicilin (6 mg/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
Trypsin/EDTA	Life Technologies, Darmstadt
TurboFect Transfection Reagent	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.13 Zelllinien

Ba/F3-gp130	Murine prä B-Zelllinie, wächst in Abhängigkeit von Hyper-IL-6. Sie wurde stabil mit cDNA für humanes gp130 transduziert (Fischer et al. 1997).
Ba/F3-gp130-Toso-2A-GFP	Ba/F3-gp130-Zellen, in dieser Arbeit stabil mit cDNA für humanes Toso transduziert. Können in Abhängigkeit von Hyper-IL-6 wachsen.

2 Material & Methoden

Ba/F3-gp130-Toso Δ IG-2A-GFP	Ba/F3-gp130-Zellen, in dieser Arbeit stabil mit cDNA für humanes Toso Δ IG transduziert. Können in Abhängigkeit von Hyper-IL-6 wachsen.
Ba/F3-gp130-Toso Δ 50-2A-GFP	Ba/F3-gp130-Zellen, in dieser Arbeit stabil mit cDNA für humanes Toso Δ 50 transduziert. Können in Abhängigkeit von Hyper-IL-6 wachsen.
Ba/F3-gp130-TIL6R-2A-GFP	Ba/F3-gp130-Zellen, stabil mit cDNA für ein Fusionsprotein (TM, ICD humaner IL-6R, Rest humanes Toso) transduziert. Wachsem in Abhängigkeit von Hyper-IL-6.
Ba/F3-gp130-IL-12R β 1	Ba/F3-gp130-Zellen, stabil mit cDNA für humanen bzw. murinen IL-12R β 1 transduziert. Wachsen in Abhängigkeit von Hyper IL-6 (AG Scheller).
Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-mIL-23R Varianten: mSD1-4	Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-Zellen, stabil mit cDNA für murinen IL-23R transduziert. Wachsen in Abhängigkeit von Hyper IL-6 und IL-23 (AG Scheller).
Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-hIL-23R	Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-Zellen, stabil mit cDNA für humanen IL-23R transduziert. Wachsen in Abhängigkeit von Hyper IL-6 und IL-23 (AG Scheller).
COS7	SV40-transformierte Nierenfibroblasten aus der grünen Meerkatze (ATCC-Nummer: CRL-1651).
HEK293	Immortalisierte humane embryonale Nierenzellen (ATCC-Nummer: CRL-1573).

2 Material & Methoden

HEK293-hIL-6R-GFP	HEK293-Zellen, stabil transduziert mit cDNA für hIL-6R-GFP (AG Scheller).
HEK293-Toso-2A-GFP	Immortalisierte humane embryonale Nierenzellen, stabil transduziert mit cDNA für humanes Toso-2A-GFP Peptid.
HEK293-Toso Δ IG-2A-GFP	Immortalisierte humane embryonale Nierenzellen, stabil transduziert mit cDNA für humanes Toso Δ IG-2A-GFP Peptid.
HEK293-Toso Δ 50-2A-GFP	Immortalisierte humane embryonale Nierenzellen, stabil transduziert mit cDNA für humanes Toso Δ 50-2A-GFP Peptid.
HEK293-Toso Δ ICD-2A-GFP	Immortalisierte humane embryonale Nierenzellen, stabil transduziert mit cDNA für humanes Toso Δ ICD-2A-GFP Peptid.
HEK293-TIL6R-2A-GFP	Immortalisierte humane embryonale Nierenzellen, stabil transduziert mit cDNA für humanes TIL6R-2A-GFP Peptid.
HEK293T-ADAM17 ^{-/-}	Immortalisierte humane embryonale Nierenzellen, in denen die ADAM-Proteasen durch ein CRISPR-Cas System (Ran et al. 2013) ausgeknockt wurden. Zur Verfügung gestellt vom Institut für Biochemie, Kiel, Deutschland (Riethmueller et al. 2016)
HEK293T-ADAM10 ^{-/-}	
HEK293T-ADAM10 ^{-/-} ,ADAM17 ^{-/-}	
Phoenix-Eco	Verpackungszelllinie (HEK293T), stabil mit cDNA transfiziert, die für Antigen, Polymerase und Hüllproteine für ecotrophe murine Retroviren kodiert (Ketteler et al. 2002). Zur Verfügung gestellt von Garry P. Nolan (Stanford University, CA, USA).

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Konzentration der DNA wurde spektrometrisch mit Hilfe eines NanoDrop 2000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Die Reinheit der DNA wurde durch das Absorptionsverhältnis A260/A280 ermittelt, dieses sollte für reine DNA über 1,8 liegen.

2.2.1.2 DNA-Gelelektrophorese

Die Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese in horizontalen Elektrophoresekammern (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Hierfür wurde Agarose (1-2%ig, je nach Größe der Fragmente) in TAE Puffer aufgekocht und in Schlitten gegossen. Die flüssige Agarose wurde mit 0,001% Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Aushärten wurde das Gel mit Proben, die vorher mit 6x Ladepuffer versetzt wurden, beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V. Das Bandenmuster wurde mit Hilfe des INTAS iX Imager (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) dokumentiert.

2.2.1.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Größentrennung von DNA-Fragmenten, die durch Restriktionsendonukleasen (siehe Abschnitt 2.2.1.5) erzeugt wurden, erfolgt mittels Gelelektrophorese, wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben. Die Fragmente wurden auf einem UV-Tisch (Bio-Budget Technologies GmbH) bei einer Wellenlänge von 365 nm visualisiert. Die gewünschten Fragmente wurden mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die anschließende Isolation erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Kit Nucleospin Extract II (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren).

2.2.1.4 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Nach dem Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen (siehe Abschnitt 2.2.1.5) soll vermieden werden, dass es zu einer Religierung des 5'- und 3'-Endes kommt. Dazu wird 1 U Fast-AP (Thermo Fischer Scientific, St. Leon, Deutschland) zum Restriktionsansatz gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von DNA-Probenpuffer wurde die Reaktion gestoppt.

2.2.1.5 Enzymatische Spaltung von DNA

Die Spaltung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten erfolgte mit Restriktionsenzymen. Für präparative Arbeiten wurde 10 µg Plasmid-DNA mit 10 U des entsprechenden Restriktionsenzym, im passenden Puffer, in einem Gesamtvolumen von 50 µl über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl DNA-Ladepuffer (6x) gestoppt. Die Fragmente wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt und das gewünschte Fragment aus dem Gel isoliert (siehe Abschnitt 2.2.1.2 und 2.2.1.3). Mit PCR-Produkten, die für eine Ligation in Expressionsvektoren vorgesehen waren, wurde analog verfahren.

Für analytische Arbeiten wurde 1 µg Plasmid-DNA aus einer Mini-Präparation in einem Gesamtvolumen von 20 µl geschnitten. Die Reaktion erfolgte für mindestens 2 h oder über Nacht bei 37°C.

Für Reaktionen mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen, wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet, bei dem die Restriktionsenzyme die gleiche und höchste Aktivität aufwiesen.

2.2.1.6 Herstellung eines pMOWS-Vektors für retrovirale Transduktion

Für eine retrovirale Transduktion in Ba/F3-gp130-Zellen muss die gewünschten cDNA in pMOWS-Vektoren subkloniert werden. Hierfür wurde 10 µg des Ausgangsplasmids (pMOWS-(Puromycin)-GFP, oder pMOWS-(Hygromycin)-GFP (Ketteler et al. 2002)) mit 5 U *Bam*HI und 5 U *Eco*NI mit 10 µl *Bam*HI-Puffer in 50 µl Wasser für 3 h bei 37°C

inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme bei 95°C für 20 min. Die entstandenen Fragmente wurden in einem 1%igen Agarosegel voneinander getrennt und die gewünschte Bande mit einer Größe von 5721 bp isoliert und gereinigt. Das isolierte Fragment wurde mit 3 µl 10x Klenow-Puffer, 0,5 µl 2 mM dNTP-Mix und 5 U Klenow-Fragment versetzt, um glatte Vektorenden zu erhalten. Die Reaktion wurde für 10 min bei 37°C inkubiert und im Anschluss bei 95°C für 10 min gestoppt. Um eine Religation des Vektors zu verhindern, erfolgte eine Dephosphorylierung, wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben. Die entsprechenden Inserts für die Subklonierungen wurden mit *PmeI* (*MssI*) enzymatisch gespalten, durch eine Gelelektrophorese voneinander getrennt und gereinigt. Die Inserts wurden im Anschluss in den vorbereiteten pMOWS-Vektor ligiert. Zur Überprüfung der richtigen Orientierung des Inserts, wurde eine Testspaltung mit einem Restriktionsenzym durchgeführt, das mindestens einmal im Insert und einmal im Vektor schneidet. Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte bei GATC Biotech, Düsseldorf oder Seqlab-Sequence Laboratories Göttingen GmbH.

2.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für eine Ligation von *sticky-end*-Klonierungen wurde das geschnittene Insert und der geschnittene, dephosphorylierte Vektor im Verhältnis 2:1 zusammen mit 1 U T4 Ligase und 2 µl Ligase-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für *blunt-end*-Klonierungen wurden 2 U T4 Ligase und zusätzlich 2 µl einer 50%igen (m/V) PEG4000-Lösung eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C.

2.2.1.8 Plasmid-DNA Mini-Präparation

Zur Isolation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab, wurde 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Das Medium wurde mit einer einzelnen Kolonie einer LB-Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 1100 rpm (Thermoblock, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Bakterienpellet, nach einer Zentrifugation (20.000 g, 10 min, 4°C), in 100 µl kalten S1-Puffer resuspendiert und mit 200 µl S2-Puffer versetzt. Nach mehrmaligem Invertieren erfolgte die Zugabe von 150 µl eiskaltem S3-Puffer.

2 Material & Methoden

Die Suspension wurde für 10 min auf Eis inkubiert und im Anschluss zentrifugiert (18.000 g, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µl eiskaltem 100%igen Ethanol versetzt und gevortext. Nach einer weiteren Inkubationszeit auf Eis (5 min) wurde die DNA pelletiert (18.000 g, 15 min, 4°C) und mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach der abschließenden Zentrifugation (5 min, 18.000 g, 4°C) wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 20 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.1.9 Plasmid-DNA Midi-Präparation

Zur Isolation von Plasmid-DNA in großen Mengen wurden 100 ml LB-Medium, welches mit dem entsprechendem Antibiotikum versetzt wurde, mit einer Einzelkolonie einer LB-Platte angeimpft und in einem Schüttler (INFORS AG, Schweiz, Bottmingen) über Nacht bei 37°C und 120 rpm inkubiert. Die Bakterienkultur wurde am nächsten Tag pelletiert (4000 g, 4°C, 15 min). Der Überstand wurde verworfen und das Plasmid aus dem Pellet mit Hilfe des Kits NucleoBond Xtra Midi (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Herstellerangaben isoliert. Die gewonnene DNA wurde in 100 µl ddH₂O gelöst und die Konzentration, wie in 2.2.1.1 beschrieben, bestimmt.

2.2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde verwendet um spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Für Klonierungen wurde die Phusion Polymerase verwendet, weil diese über eine 3′–5′ Korrekturlesefunktion (*proof-reading*) verfügt und außerdem sehr lange Fragmente amplifiziert. Die Reaktion wurde im Thermal Cycler (Pepqab, VWR, Erlangen) durchgeführt. Der folgende Ansatz wurde für alle PCRs verwendet:

Template	100 ng Plasmid
5′-Primer	10 μM
3′-Primer	10 μM
dNTP-Mix	10 mM
HF-Puffer (10x)	5 μl
Phusion Polymerase	1 U
ddH ₂ O	ad 50 μl

Das folgende Temperaturprogramm wurde für alle PCRs verwendet:

	98°C	30 sec	
Denaturierung	98°C	30 sec	} 35x
Annealing	64°C	20 sec	
Elongation	72°C	15 sec/kb	
	72°C	10 min	
	4°C	∞	

Die Elongationszeit wurde entsprechend der Länge des Fragmentes variiert. Hierbei wurde für 1 kb eine Elongationszeit von 15 Sekunden verwendet. Eine sogenannte *Splicing by Overlapping Extension PCR (SOE-PCR)* wurde durchgeführt um gezielte Mutationen in die kodierende Sequenzen einzufügen. Hierfür wurde für die abschließende PCR jeweils 1 μl der einzelnen PCR-Ansätze als Template verwendet.

2.2.1.11 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Um die Sequenzabfolge der selbst erstellten Plasmide zu überprüfen, wurden die Plasmide von der Firma GATC Biotech, Düsseldorf oder SeqLab-Sequence Laboratories Göttingen GmbH sequenziert. Hierfür wurden die firmeneigenen Primer T7, BGH-rev und WHV-sr eingesetzt. Falls keiner der firmeneigenen Primer nutzbar war, wurde ein eigener erstellt. Selbst erstellte Primer, die für die Sequenzierungen hergestellt wurden, finden sich im Abschnitt 2.1.7 mit einem Kürzel seq.

2.2.1.12 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E.coli*

Für die Transformation wurden 30 µl chemische kompetente *Escherichia coli* XL-1 Blue für 20 min auf Eis aufgetaut und mit 10 µg Plasmid-DNA oder 20 µl eines Ligationsansatzes versetzt. Die Zellen wurden zusammen mit der DNA für 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit folgte die Hitzeschocktransformation für 30 sec bei 42°C. Danach wurden die Zellen für 30 sec auf Eis inkubiert, gefolgt von 5 min bei RT. Nach diesen Inkubationsschritten wurden die Bakterien in 500 µl vorgewärmten LB-Medium resuspendiert und für 1 h inkubiert (37°C, 1100 rpm) (Thermoblock, Eppendorf, Hamburg). 50-500 µl (je nach Effizienz der Ligation) der Bakteriensuspension wurden auf eine LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.13 Linkerligation

Zur Phosphorylierung der Oligonukleotide wurde 1 µl der unverdünnten Oligonukleotide (pro Oligonukleotid ein Ansatz) mit 5 µl Ligase-Puffer, 1 µl PNK und 42 µl H₂O gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden beide Ansätze gemischt, für 5 min bei 95°C aufgekocht und dann für 30 min auf Eis hybridisiert. 1 µl dieses Ansatzes diente als Insert für die anschließende Ligation. Falls die Oligonukleotide mit der vollständigen Restriktionssequenz erstellt wurden, erfolgt nach der Inkubation auf Eis eine Behandlung mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (2.2.1.5).

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Durchflusszytometrie

Die Expression von Proteinen auf der Zelloberfläche wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen. Adhärente Zellen wurden mit PBS abgelöst, pelletiert (1200 g, RT) und in PBS resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellzahl pro Milliliter bestimmt. 1×10^6 Zellen wurden pelletiert (300 g, 4°C, 4 min) und zweimal in 500 µl FACS-Puffer (0,5% BSA in PBS) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert, mit dem Primärantikörper versetzt (Konzentrationsangaben siehe Abschnitt 2.1.2.1) und 1 h auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen wieder dreimal mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen (300 g, 4°C, 4 min) um restlichen Primärantikörper zu entfernen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen wieder in 100 µl Puffer resuspendiert und mit dem Sekundärantikörper versetzt. Die Zellen wurden, nach zweimaligem Waschen, in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen (BD Falcon 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, BD Bioscience Discovery Labware, Bedford, MA, USA) überführt. Die behandelten Zellen wurden im FACS Canto II (BD Biosciences, Heidelberg) analysiert und die gewonnenen Daten mit der FCS Express 4 Flow Software ausgewertet (De Novo Software, beides von BD Biosciences, Heidelberg).

2.2.2.2 Konzentrierung von Proteinen mit der Vakuumentrifuge

Eine Möglichkeit die Proteinkonzentration im Überstand zu erhöhen ist, das Volumen des Überstandes zu reduzieren. Daher wurde in diesem Fall der gewonnene Überstand in einer Vakuumentrifuge (Eppendorf Concentrator plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für 2 h und 20 min bei 45°C unter ständigem Vakuum zentrifugiert. Auf diese Weise wurde das Volumen des Überstandes um rund 50% reduziert.

2.2.2.3 Präzipitation von Proteinen aus Zellkulturüberstand (Immunopräzipitation)

Zur Gewinnung des sIL-23R aus den Überständen stimulierter Zellen (siehe Abschnitt 2.2.3.6) wurde 1 ml des Überstandes mit 1 ml HmIL-23-Fc (Überstand aus COS7 transfizierten Zellen) gemischt und über Nacht bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Zur gleichen Zeit wurden Agarose A Beads (Roche, Mannheim, Deutschland) zweimal mit 500 µl IP-Puffer gewaschen (800 g, 4°C, 5 min) und ebenfalls über Nacht bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Beads wieder zweimal mit 500 µl IP-Puffer gewaschen und je 50 µl der Beads auf die Überstände gegeben. Die Beads wurden zusammen mit den Proben für 4 h bei 4°C rotiert und im Anschluss bei 800 g, 4°C pelletiert. Nach zwei weiteren Waschschritten, wurde der Überstand vollständig entfernt und die Beads in 100 µl 5x Laemmli-Puffer resuspendiert. Die gebundenen und pelletierten Proteine wurden bei 95°C für 10 min denaturiert.

2.2.2.4 Herstellung des GFP-Nanobodies

Für die Präzipitation von GFP-getaggten Proteinen, wie es im Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben ist, wurden anti-GFP-V_HH-Nanobodies hergestellt. Dieses 13 kDa GFP-Bindungs-Protein (GBP) von einem Einzeldomänenantikörper wurde nach der Vorlage von U. Rothbauer hergestellt (Rothbauer et al. 2008).

Escherichia coli BL-21 wurden mit pET23a-PelB-nGFP-myc-his transformiert und auf eine LB-Amp Platte ausgestrichen. Eine 50 ml Vorkultur wurde mit einem einzelnen Klon angeimpft. Die gesamte Vorkultur wurde dazu verwendet eine 2 L Kultur anzupflanzen, welche bei 37°C bis zu einer OD von 0,6-0,8 wachsen durfte. Nach dem Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Bakterien mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) über Nacht bei 30°C induziert. Die Bakterien wurden am nächsten Tag in 50 ml Reaktionsgefäßen pelletiert (3000 g, 1 h, 4°C) und der Überstand vereinigt. Dieser wurde entweder bei -80°C gelagert oder für die Reinigung verwendet. Vor der Reinigung wurde der Überstand durch einen 0,45 µM SFCA NALGENE® Rapid-Flow™ *Bottle-Top-Filter* filtriert, mit PP-Puffer (500 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,4) im Verhältnis 1:1 gemischt und auf eine

äquilibriumierte Ni-NTA Säule (His-Trap FF GE, Healthcare) geladen. Das His-getaggte Protein wurde durch PP-Puffer mit 500 mM Imidazol eluiert. Durch Konzentratoren (Amicon[®] Ultra-15 10K, Merk Millipore) wurde das Imidazol entfernt und das Protein aufkonzentriert und bei -80°C gelagert.

2.2.2.5 Kopplung der GFP-Nanobodies an Sepharose Beads

Für die Immunopräzipitation, die im Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben wird, müssen die gereinigten Nanobodies (s. 2.2.2.4) an Sepharose gekoppelt werden. Hierfür wurde 1 µg Protein an 2 µl NHS-aktivierte Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) gekoppelt. Die benötigte Menge Sepharose wurde in ein entsprechendes Reaktionsgefäß (z.B.: 50 ml) pipettiert. Die doppelte Menge eiskalter 1 mM HCl wurde zu der Sepharose gegeben, gemischt und abzentrifugiert (2 min, 3000 g, 4°C). Der Überstand wurde entfernt und der Waschschrift zweimal wiederholt. Die Nanobodies wurden hinzugegeben und die Mischung für 2 h in einem Überkoprotator bei Raumtemperatur inkubiert. Die Beads wurden wieder abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Freie Bindestellen an den Beads wurden durch die Zugabe von Blocking Puffer (0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl pH 8,3) für 30 min im Rotator bei Raumtemperatur blockiert. Die Beads wurden wieder abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Reaktion wiederholt. Als letztes wurden die Beads zweimal in Waschpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 4) gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Beads in 20% Ethanol aufgenommen, aliquotiert und bei 4°C gelagert.

2.2.2.6 Immunopräzipitation von GFP-Fusions Proteinen (Nanotrap)

Um die Interaktion eines GFP-Fusionsproteins mit einem anderen Protein nachzuweisen, wurden beide Proteine in Zellen co-transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.3.3). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit kaltem PBS von der Platte gewaschen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (14.000 g, 4°C, 10 sec). Das Pellet wurde in 200 µl Nanotrap Lysis Puffer resuspendiert und für 1 h bei 4°C rotiert. Während der Lyse wurden, an NHS-Sepharose gekoppelte, GFP-Nanobodies dreimal mit 500 µl Nanotrap Dilution Puffer gewaschen (2700 g, 4°C, 2 min). Die Zelllysate wurden bei 20.000 g, 4°C für 15 min

abzentrifugiert und der Überstand in ein neues, gekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wurde mit 300 µl Dilution Puffer aufgefüllt, wobei 50 µl dieser Lösung mit 5x Laemmli Puffer gemischt (*Input*) und der Rest mit 50 µl der gewaschenen Beads versetzt wurde. Die Beads inkubierten für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Rotator und wurden im Anschluss abzentrifugiert (2700 g, 4°C, 2 min). 50 µl des Überstandes wurde für die *Non-Bound* Fraktion mit 50 µl 2x Laemmli-Puffer versetzt und der restliche Überstand verworfen. Die Beads wurden zweimal mit 500 µl eiskaltem Dilution Puffer gewaschen, in 100 µl 2x Laemmli-Puffer resuspendiert und bei 95°C für 10 min aufgeköcht. Der nach einem letzten Zentrifugationsschritt gewonnene Überstand entsprach der *Bound* Fraktion.

2.2.2.7 Bestimmung des Proteingehalts (BCA-Assay)

Die Konzentration des Gesamtproteingehaltes von Zelllysaten wurde mit dem BCA Protein Kit von Thermo Fischer Scientific nach Herstellerangaben bestimmt. Die Lysate wurden im Verhältnis 1:10 in PBS verdünnt. Pro Loch einer 96-Well-Platte (Greiner BioOne, Solingen, Deutschland) wurde 25 µl der Lysatlösung und BSA in verschiedenen Konzentrationen, zur Bestimmung einer Eichgerade, in Doppelwerten aufgetragen. Nach Zugabe des Reaktionsgemisches wurde die Platte bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Absorption wurde bei 562 nm am Infinite M200 PRO Microplate Reader von TECAN (Maennedorf, Schweiz) gemessen.

2.2.2.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Mit Hilfe einer diskontinuierlichen SDS-PAGE, wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht voneinander getrennt. 50 µg der Zelllysate wurden nach der Konzentrationsbestimmung (2.2.2.7) in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit Wasser und 5 µl Laemmli-Puffer (5x) gemischt und für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Von den Überständen wurden 50 µl mit 10 µl Laemmli-Puffer aufgeköcht. Von den Lysaten, die direkt in Laemmli-Puffer aufgeköcht wurden, als auch von den IP-Proben wurden 25 µl aufgetragen. Es wurden selbst gegossene Gele mit einer Dicke von 1,5 mm und 10 oder 15 Probentaschen verwendet, welche aus einem 1 cm hohem Sammelgel und einem Trenngel von 6 cm Höhe bestanden.

Die Größentrennung erfolgte mit dem Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei einer Spannung von 85 – 110 V und einer konstanten Ampere-Zahl. Die Trennung wurde gestoppt, sobald die Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.

2.2.2.9 Western Blot

Um die getrennten Proteine mittels Western Blot nachzuweisen, wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Carl Roth GmbH + Co, KG, Karlsruhe) transferiert. Dies erfolgte mit Hilfe des Trans-Blot-Turbo semidry Transfer Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Die zugeschnittene Membran wurde zunächst für 1 min in Methanol aktiviert und im Anschluss jeweils einmal in Wasser und einmal in Transferpuffer für je eine Minute gewaschen. Das Whatman-Papier (acht Stück pro Blot) wurde ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Der Transfer erfolgte nach Herstellerangaben, indem vier Lagen Whatman-Papier, PVDF-Membran, SDS Gel und wieder vier Lagen Whatman-Papier übereinander geschichtet in ein Transfergerät gelegt wurden. Die Proteine wurden elektrophoretisch bei konstanter Spannung (25 V, 1 A, 40 min) auf die Membran transferiert. Im Anschluss wurde die Membran in einem 50 ml Falcon-Röhrchen mit 5% Milchpulver, gelöst in TBS-T, bei Raumtemperatur für 1,5 h blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBS-T gewaschen und für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für je 10 min und einem Waschschrift in TBS wurde die Membran mit Hilfe des ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, München) nach Herstellerangaben entwickelt. Die Detektion erfolgte am INTAS Chemo Cam Imager (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) und die Auswertung mit Hilfe der Software ChemoStar Professional (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen).

2.2.2.10 Strippen von Western Blot-Membranen

Als Ladekontrolle bei Zellysaten oder zum Nachweis von einem weiteren Protein nach einer Immunopräzipitation, wurde die Membran mit einem weiteren Antikörper inkubiert. Dafür musste der Antikörper des ersten Detektionsverfahrens entfernt werden. Hierfür wurde die Membran in Stripping-Puffer für 20 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert, dreimal mit TBS-T gewaschen und erneut mit Milchpulver blockiert. Der neue Primärantikörper wurde wiederum über Nacht bei 4°C rollend inkubiert. Die Detektion erfolgte wie im Abschnitt 2.2.2.9 beschrieben.

2.2.2.11 Zellyse

Adhärente, eukaryotische Zellen wurden mit 1 ml PBS abgekratzt oder abgespült, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (14.000 g, 10 sec, 4°C). Das entstandene Pellet wurde in *Mild Lysis Buffer* resuspendiert (6-Well-Platte: 75 µl, 10 cm-Schale: 250 µl) und für 1 h bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Nach einer abschließenden Zentrifugation (14.000 g, 4°C, 15 min) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Für schwach exprimierte Proteine wurden die Zellen nach dem ersten Zentrifugationsschritt in Laemmli-Puffer (6-Well-Platte: 75 µl, 10 cm-Schale: 250 µl) resuspendiert und für 10 min bei 95°C aufgekocht.

2.2.2.12 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur quantitativen Konzentrationsbestimmung des sIL-6R wurde ein Sandwich ELISA verwendet. Im ersten Schritt wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) mit dem Primärantikörper (4-11, 1 µg/ml, je 50 µl pro Well) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde nicht gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit je 200 µl PBS-T entfernt und freie Bindestellen mit einem Blocking-Puffer (200 µl pro Well, 2 h, Raumtemperatur) besetzt. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden je 50 µl der Proben, die in 1% BSA/PBS verdünnt wurden, auf die Platte aufgetragen. Für die spätere Erstellung einer Standardgerade wurde eine Verdünnungsreihe mit rekombinantem Hyper-IL-6

(Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R) aufgetragen. Die Proben wurden für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und ungebundenes Protein durch dreimaliges Waschen wieder entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation (2 h, Raumtemperatur) mit dem Detektionsantikörper Baf227 (0,5 µg/ml, 50 µl pro Well), gefolgt von drei Waschschritten. In jedes Well wurden 100 µl Streptavidin-POD-Lösung (von R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, verdünnt 1:200 in 1% BSA/PBS) pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Nach dem letzten Waschschriff (dreimal 200 µl PBS-T) erfolgte die Zugabe von 75 µl POD-Substrat (Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen) für 20 min bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch die Zugaben von 75 µl 1,8 M H₂SO₄ gestoppt und an einem Tecan Infinite M200 PRO Reader (Tecan, Maennedorf, Schweiz) bei 450 nm ausgewertet.

2.2.2.13 Konfokalmikroskopie

7x10⁵ HEK293-Zellen wurden in einer 12-Well-Platte auf Coverslips ausgesät, transfiziert und nach 48 h weiter bearbeitet. Hierfür wurden die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen und für 20 min bei RT mit 4% PFA inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff erfolgte die Inkubation in 0,25% Triton-X/PBS für 20 min bei RT. Im Anschluss wurden die Zellen nach dem Waschen in 1% BSA/ 0,25% Triton-X/PBS für 1 h bei RT auf einem Shaker geblockt. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper in 200 µl 1% BSA/PBS (Konzentrationsangaben s. Abschnitt 2.1.2) erfolgte über Nacht bei 4°C unter ständiger Bewegung.

Am nächsten Tag wurden die Zellen drei Mal mit PBS für je 5 min auf einem Shaker bei RT gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (s. Abschnitt 2.1.2) in 200 µl 1% BSA/PBS erfolgte unter ständiger Agitation bei RT für 1 h. Nach dem Entfernen des überschüssigen Antikörpers durch drei Waschschriffe wurde auf einen Objektträger ein Tropfen *Mounting Solution* (ProLong Gold *antifade reagent with DAPI*, Life Technologies, Eugene, USA) gegeben und die Coverslips mit den Zellen nach unten auf die Objektträger aufgebracht. Die Lösung trocknete für 24 h bei RT unter Ausschluss einer Lichtquelle.

2.2.3 Kultur von Säugetierzellen

2.2.3.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Alle adhärenenten Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden (HEK293, HEK293T-KO, Phoenix-Eco und COS7) wuchsen in 10 cm Kulturschalen in 10 ml DMEM^{+/+}. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ in einer gesättigten Wasserdampfatmosphäre. Die Zellen wurden zweimal in der Woche subkultiviert indem sie nach dem Waschen mit PBS durch 2 ml Trypsin/EDTA (Life Technologies, Darmstadt) von der Platte gelöst wurden (5 min, 37°C). Die abgelösten Zellen wurden pelletiert (1200 g, 5 min) und in DMEM^{+/+} resuspendiert. Alle Zellen wurden 1:10 verdünnt.

2.2.3.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Ba/F3-gp130-Zellen und alle stabil transduzierten Subtypen wuchsen in 10 cm Petrischalen in 10 ml DMEM^{+/+}, das mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 versetzt wurde. Analog zu den adhärenenten Zellen wurden die Suspensionszellen bei 37°C mit 5% CO₂ in einem Binder CO₂-Inkubator 150 (E2) Brutschrank (Binder, GmbH, Tuttlingen) kultiviert. Standardmäßig wurden die Zellen alle sechs bis sieben Tage im Verhältnis 1: 10.000 passagiert.

2.2.3.3 Transfektion von adhärenenten Zellen

Für die Transfektion adhärenenter Zellen wurden 2x10⁶ HEK293 (HEK293T-KO), 2x10⁶ Phoenix-Eco oder 5x10⁵ COS7 in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Die Transfektion erfolgte am nächsten Tag nach Herstellerangaben. Hierzu wurde in 1 ml DMEM ohne Zusätze 5 µg Plasmid-DNA gemischt und 10 µl Turbofect (Thermo Fischer Scientific, St.Leon-Rot, Deutschland) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde die Lösung auf die Zellen getropft. Für die Transfektion der COS7-Zellen folgte ein Mediumwechsel nach 6 h. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit p409-YFP transfiziert. Die Effizienz lag zwischen 50% und 70%.

2 Material & Methoden

Phoenix-Eco-Zellen wurden mit 8×10^5 Zellen/ Well in eine 6-Well-Platte mit 2 ml DMEM^{+/+} ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit einer Mischung aus 1 µg Plasmid-DNA und 2 µl Turbofect in 200 µl DMEM^{-/-} transfiziert. Nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel gegen 2 ml DMEM mit 30% FCS und 1% Penicilin/Streptomycin. Dieser Überstand wurde am nächsten Tag für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, verwendet.

2.2.3.4 Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen

Für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen wurde der Überstand von transfizierten Phoenix-Eco-Zellen verwendet (siehe Abschnitt 2.2.3.3). 250 µl Überstand wurde mit 1×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen in 50 µl Medium gemischt. Nach der Zugabe von 3 µl Polybrene (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, finale Konzentration 8 µg/ml) wurde die Mischung bei Raumtemperatur für 2 h bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 ml DMEM^{+/+}, mit 10 ng/ml Hyper-IL-6, in einer 6-Well-Platte für 48 h kultiviert. Die Zellen wurden durch die Zugabe von Puromycin (1,5 µg/ml) für mindestens 2 Wochen selektiert.

2.2.3.5 Proliferationsassay

Stabil transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen wurden dreimal mit sterilem PBS gewaschen, in DMEM^{+/+} resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Es wurden Zellsuspensionen mit 5×10^3 Zellen/100 µl hergestellt. Die Suspensionen wurden mit dem entsprechenden Zytokinen versetzt. Als Kontrolle diente eine Zellsuspension ohne Zytokin. In jedes Well einer 96-Well-Platte wurde 100 µl dieser Suspension pipettiert und für 48 h inkubiert. Die Proliferation wurde mit Hilfe des CellTiter-Blue Viability Assay (Promega GmbH, Mannheim) an einem Tecan Infinite M200 PRO Reader (ex-Filter 530/25, em-Filter 590/35, Tecan, Maennedorf, Schweiz) gemessen. Von den höchsten noch messbaren Werten wurden die Messwerte zum Zeitpunkt 0 subtrahiert und diese Werte als „relative light units“ (RLU) angegeben. Alle Messwerte wurden in einer Dreifachbestimmung ermittelt.

2.2.3.6 Induziertes *Shedding*

Stabil transduzierte HEK293-Zellen oder transfizierte Zellen 24 h nach der Transfektion, wurden mit 2 ml Trypsin/EDTA von der Platte gelöst, abzentrifugiert (1200 g, 5 min, Raumtemperatur), in 6 ml DMEM^{+/+} resuspendiert und gleichmäßig auf eine 6-Well-Platte verteilt. Nach weiteren 24 h wurde das Medium gegen 1 ml DMEM^{-/-} ausgetauscht und die Zellen für 30 min mit Inhibitoren (3 μ M GI254023X [ADAM10] und 3 μ M GW280264X [ADAM10 und ADAM17]) inkubiert. Für die Stimulation von ADAM17 wurde Phorbol-12-myrsitat-13-acetat (PMA, von Calbiochem, Merck, KGaA, Darmstadt) mit einer Konzentration von 100 nM für 2 h eingesetzt. Für die Stimulation von ADAM10 wurde 1 μ M Ionomycin (Sigma-Aldrich, Steinheim) für eine Stunde verwendet.

Suspensionszellen wurden auf die gleiche Weise behandelt, nur dass diese erst kurz vor der Stimulation mit einer Konzentration von $1,2 \times 10^6$ Zellen pro Well ausgesät wurden.

Der Überstand wurde anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5 min, 15.000 g), um Zelltrümmer zu entfernen. Die so gewonnen Überstände wurden weiter aufkonzentriert (2.2.2.2, 2.2.2.3) oder direkt für die Analyse im ELISA (2.2.2.12) verwendet.

2.2.3.7 Konstitutives *Shedding*

Zur Analyse der Aktivität von ADAM10 bezüglich des konstitutiven *Shedding*, wurden die Suspensionszellen mit einer Zelldichte von $0,6 \times 10^6$ Zellen/ml auf eine 12-Well-Platte in 1 ml DMEM^{+/+} ausgesät und mit dem entsprechenden Zytokin stimuliert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert. Die Überstände wurden wie in Abschnitt 2.2.3.6 beschrieben abgenommen und für die weiteren Analysen vorbereitet.

2.2.3.8 Nachweis des *Sheddings* mit Hilfe der Durchflusszytometrie

2×10^6 stabil transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, pelletiert (300 g, 4°C, 5 min) und in FACS-Puffer (0,5% BSA in PBS) resuspendiert. Die Zellen wurden mit dem Primärantikörper (Toso, 1:50 Stock: 0,5 μ g/ μ l) für

1 h auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen in warmem DMEM^{+/+}, welches mit Zytokin versetzt war, resuspendiert und auf eine 24-Well-Platte aufgeteilt. Das *Shedding* wurde durch PMA und Ionomycin, wie in Abschnitt 2.2.3.6 beschrieben durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen wieder in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, einmal mit FACS-Puffer gewaschen (300 g, 4°C, 5 min) und in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Unter Lichtausschluss erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (maus anti APC) für 1 h auf Eis. Im Anschluss folgten die Waschschritte und die Analyse am BD FACS Canto II, wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben.

2.2.3.9 Internalisierung

Die Internalisierung der Rezeptoren wurde durch eine Analyse am FACS Canto II ermittelt. Hierfür wurden 2×10^6 stabil transduzierter Ba/F3-gp130-Zellen mit GI254023X (3 µM), GW280264X (3 µM), Marimastat (10 µM) oder DMSO für 30 min inkubiert, mit FACS Puffer (0,5% BSA/PBS) gewaschen und dem entsprechenden Primärantikörper (mIL-23R, hIL-23R, Toso s.2.1.2) auf Eis für 1 h inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal in FACS-Puffer gewaschen (300 g, 5 min, 4°C). Im Anschluss wurden die Zellen im warmen Medium resuspendiert (DMEM^{+/+}), auf verschiedene Wells einer 12-Well-Platte ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ für die angegebene Zeit inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit HmIL-23 (0,2% konditionierter Überstand), Marimastat, GI254023X, GW280264X oder DMSO inkubiert. Zu den spezifischen Zeitpunkten wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt, pelletiert und in FACS-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen so lange auf Eis gelagert, bis die Zellen aller Zeitpunkte geerntet waren. Jetzt wurde der auf der Oberfläche verbliebende Rezeptor, der noch mit dem Primärantikörper versehen war, durch einen Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Die verbliebende Rezeptorexpression wurde wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben am FACS Canto II analysiert.

2.2.4 Statistische Analysen

Alle angegebenen Messwerte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). Mit Hilfe des *Student's t-test* wurden die statistischen Analysen durchgeführt. Ab einem p-Wert kleiner als 0,05 wurden die Effekte als signifikant angesehen. Hierbei gilt:

* = $p \leq 0,05$

** = $p \leq 0,01$

*** = $p \leq 0,001$

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von SAP97 auf das ADAM-vermittelte *Shedding* des IL-6R

Die Prozessierung des IL-6R bildet einen löslichen IL-6R (sIL-6R), was eine Signalweiterleitung des IL-6 auf allen Zellen ermöglicht. Dieser Signalweg wird auch als *Transsignaling* bezeichnet, welcher pro-inflammatorische Signale auslöst, die T-Zell-Apoptose inhibiert und für eine maligne Proliferation sorgt (Chalaris et al. 2011; Scheller et al. 2011b). Die Regulation der Prozessierung des IL-6R ist noch weitestgehendst unbekannt. Aus diesem Grund soll untersucht werden, welchen Einfluss die Interaktion zwischen den ADAM-Proteasen und der PDZ3-Domäne des SAP97 auf das *Shedding* des IL-6R hat. Dafür sollen Mutanten des SAP97 Proteins erstellt werden, die nicht mehr mit den ADAM-Proteasen interagieren (SAP97- Δ PDZ3) oder nur aus der Interaktionsdomäne bestehen (SAP97-PDZ3-only). Des Weiteren soll untersucht werden, ob SAP97 die Reifung und Oberflächenexpression der entsprechenden Protease beeinflusst.

3.1.1 Generierung der SAP97 Mutanten zur Untersuchung der Interaktion mit ADAM17 und dem IL-6R

Bei dem SAP97 Protein, das in dieser Arbeit untersucht wurde, handelt es sich um β -SAP97 aus der Ratte. Es ist das entsprechende Protein, für welches schon die Interaktion und der Transport von Glutamat-Rezeptoren GluR1 gezeigt wurden (Leonard et al. 1998). Diese Variante von SAP97 wird hauptsächlich im Gehirn in perisynaptischen Regionen exprimiert (Schlüter et al. 2006; Waites et al. 2009). Durch Sequenzanalysen wurde festgestellt, dass die in dieser Arbeit verwendete Variante des SAP97 eine Sequenzidentität von 89% mit der humanen und von 92% mit der murinen SAP97 Variante aufweist. In allen drei Spezies ist die PDZ3 Domäne, welche für die Interaktion von SAP97 mit anderen Proteinen verantwortlich ist, konserviert.

3 Ergebnisse

Peiretti *et al.* zeigten auf, dass durch die Interaktion zwischen humanem ADAM17 und der PDZ3 Domäne des humanen SAP97 die Proteolyse von TNF, TNFR1 und TNFR2 reduziert wird (Peiretti et al. 2003b). Auch ADAM10 wird durch die Interaktion mit SAP97 beeinflusst, wodurch die Protease besser an die Membran transportiert und die Freisetzung von APP (*amyloid precursor protein*) erhöht wird (Saraceno et al. 2014).

Um zu kontrollieren, welchen Effekt SAP97 auf die Proteolyse des humanen IL-6R hat und für den Beweis, dass dieser Effekt wirklich durch SAP97 reguliert wird, wurde eine Deletionsvariante der PDZ3 Domäne im Protein erstellt, die nicht mehr an ADAM17 bindet.

Für diese Deletion wurde eine SOE-PCR durchgeführt (2.2.1.10). In einer ersten PCR wurde der Anfang des SAP97 von einer *AccI*-Schnittstelle ausgehend, bis zur PDZ3 Domäne amplifiziert (Primer „PDZ3-del-1“ und „PDZ3-del-3“). In einer zweiten PCR wurde der Bereich des SAP97 Proteins hinter der PDZ3 Domäne bis zu einer *BstEII*-Schnittstelle amplifiziert (Primer „PDZ3-del-2“ und „PDZ3-del-4“). Als Template diente der Vektor p409-SAP97-YFP.

3 Ergebnisse

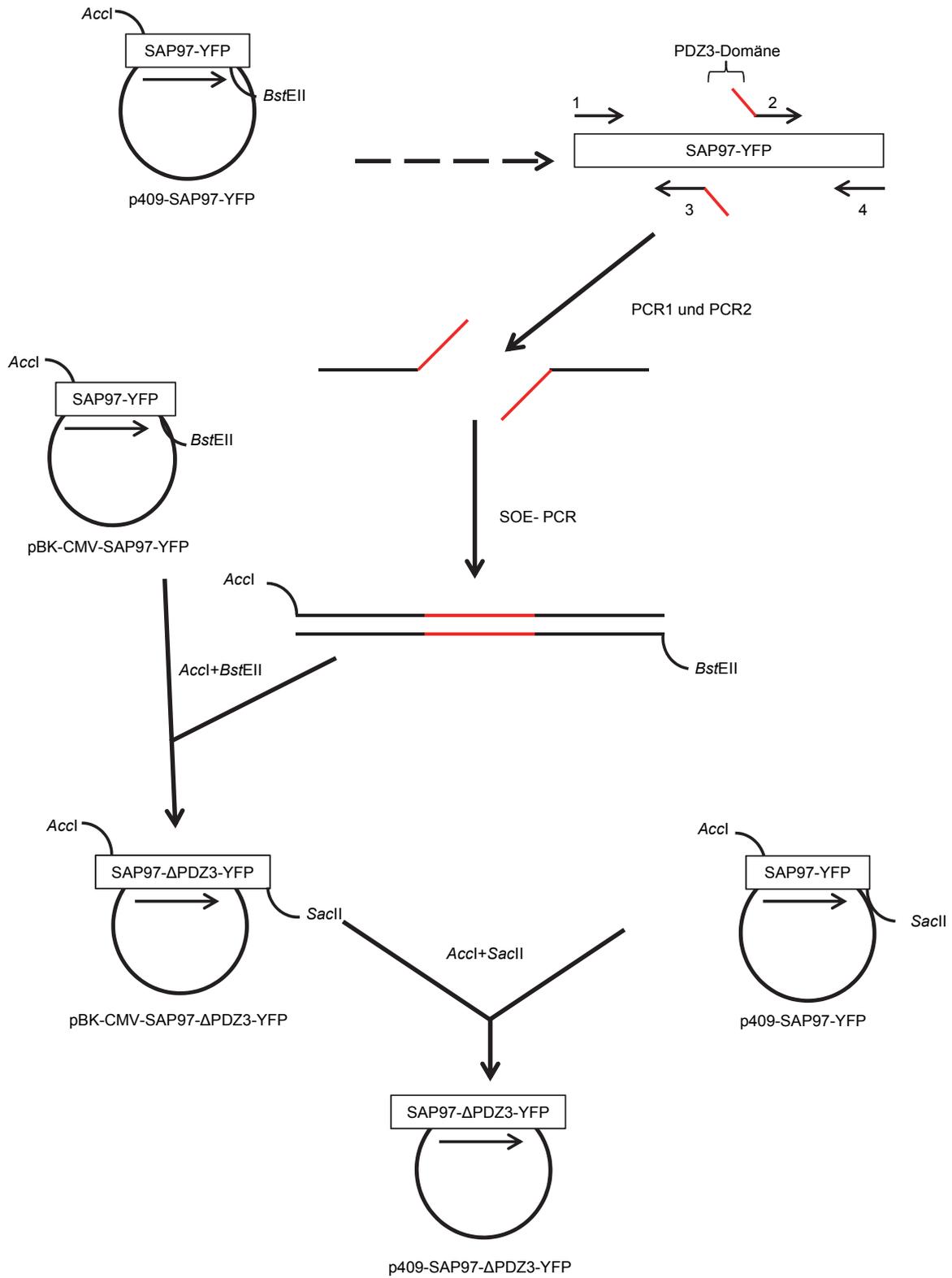


Abbildung 3.1: Klonierung von p409-SAP97-ΔPDZ3-YFP. Detaillierte Beschreibung der Klonierung in Abschnitt 3.1.1.

3 Ergebnisse

In einer abschließenden dritten PCR (SOE) (Primer „PDZ3-del-1“ und „PDZ3-del-4“) wurden die beiden ersten PCR-Fragmente miteinander verbunden, da die beiden Primer „PDZ3-del-2“ und „PDZ3-del-3“ der initialen PCR zueinander komplementäre Sequenzen besitzen. Nach der Reinigung des finalen PCR-Produktes und der anschließenden Behandlung mit den Restriktionsenzymen *AccI* und *BstEII*, wurde der Vektor pBK-CMV-SAP97-YFP mit den gleichen Enzymen geschnitten, dephosphoryliert, gereinigt und ligiert (2.2.1.2 – 2.2.1.5). In einem letzten Schritt erfolgte die Umklonierung der gewünschten SAP97- Δ PDZ3-Variante in den p409-Vektor. Hierfür wurden die Vektoren p409-SAP97-YFP und pBK-CMV-SAP97- Δ PDZ3-YFP jeweils mit den Restriktionsendonukleasen *AccI* und *SacII* geschnitten, im Falle von p409-SAP97-YFP dephosphoryliert, aufgereinigt und ligiert (s. Abbildung 3.1). Der erhaltene Vektor erhielt die Bezeichnung p409-SAP97- Δ PDZ3-YFP. Als eine weitere Kontrolle der Funktion des SAP97 wurde die PDZ3 Domäne mit Hilfe einer PCR amplifiziert und in den pcDNA3.1 Vektor in das Leseraster eines GFP Proteins ligiert. Dieser Vektor erhielt die Bezeichnung pcDNA3.1-PDZ3only-GFP. Das Klonierungsschema ist unter Abschnitt 7.3.1 abgebildet.

3.1.2 SAP97 interagiert mit ADAM17 und dem IL-6R

Für SAP97 wurde bereits eine Interaktion mit ADAM17 über die PDZ3 Domäne gezeigt (Peiretti et al. 2003b). Diese Interaktion wurde auch in dieser Arbeit nachgewiesen. Für die Kontrolle einer Interaktion mit YFP (*yellow fluorescent protein*) oder GFP (*green fluorescent protein*) getaggten Proteinen wurde das Nanotrap-System verwendet. Rothbauer et al entwickelten das Nanotrap-System, bei dem ein Einzeldomänenantikörper, welcher an GFP/YFP bindet, an Sepharose-Beads gekoppelt wurde. Dies ermöglicht die Präzipitation von GFP/YFP gekoppelten Proteinen und deren Interaktionspartnern (Rothbauer et al. 2008). Für die Interaktionsstudien zwischen SAP97 und ADAM17 wurden HEK293-Zellen mit SAP97-YFP aus der Ratte zusammen mit murinem ADAM17 cotransfiziert und 48 h nach der Transfektion lysiert. Die getaggtten Proteine und alle Interaktionspartner wurden mit Hilfe von GFP-Nanobodies, die an Sepharose-Beads gekoppelt wurden, präzipitiert (2.2.2.4 - 2.2.2.6). Auf den Western Blot wurde von der *Bound* (B) Fraktion die fünffache Menge verglichen mit den anderen Fraktionen aufgetragen. Der Nachweis der Interaktion von ADAM17 und SAP97

3 Ergebnisse

erfolgte durch eine Co-Immunopräzipitation. Bei der Co-Transfektion von SAP97-YFP und ADAM17 wurde hierbei ADAM17 nicht nur in der *Input* (I) und *Non-Bound* (NB), sondern auch schwach in der *Bound* (B) Fraktion nachgewiesen. Durch die Deletion der PDZ3-Domäne konnte ADAM17 nicht mehr präzipitiert werden, was beweist, dass die PDZ3-Domäne für die Bindung essentiell ist (Abbildung 3.2 A).

Auf die gleiche Weise erfolgte auch der Nachweis der Interaktion des SAP97 aus der Ratte mit dem humanen IL-6R. Für diese Interaktionsuntersuchung wurde das YFP der SAP97-Varianten deletiert (Klonierungsschema s. Abb. 7.2) und in stabil transduzierte HEK293-hIL-6R-GFP-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden im Anschluss wie oben beschrieben lysiert, die Proteine präzipitiert und im Western Blot analysiert.

Nach der Präzipitation des IL-6R-GFP wurde SAP97 in der *Bound* Fraktion nachgewiesen. Diese Interaktion wird ebenfalls über die PDZ3-Domäne von SAP97 vermittelt (Abbildung 3.2 B), weil durch die Deletion der PDZ3 Domäne das SAP97 nicht mehr in der *Bound* Fraktion nachgewiesen wurde.

Die Expression des SAP97- Δ PDZ3 ist auf dem Blot in Abbildung 3.2 B schwächer als die Expression von SAP97, jedoch konnte auf keinem erstellten Blot das SAP97- Δ PDZ3 in der *Bound* Fraktion nachgewiesen werden. Dadurch erfolgte die Bestätigung, dass auch die Interaktion zwischen SAP97 und dem hIL-6R über die PDZ3 Domäne vermittelt wird.

Die Interaktion der Proteine in den Zellen wurde mit Hilfe des Nanotrap-Systems nachgewiesen. Dies hat keine Aussagekraft über die genaue Lokalisation der Interaktion. Aus diesem Grund wurden Konfokalbilder mit einzel- und doppeltransfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit cDNAs kodierend für SAP97-YFP und dem hIL-6R transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen weiter bearbeitet und im Konfokalmikroskop analysiert (2.2.2.13). Der Nachweis des SAP97-GFP erfolgte über die grüne Fluoreszenz des GFPs. Der hIL-6R wurde mit den Antikörpern 4-11 und Alexa Fluor 546 Ziege anti-Maus IgG (H+L) markiert. Dies wurde in den Abbildungen als rote Fluoreszenz dargestellt (Abbildung 3.2 C). Durch die Verwendung des ProLong Gold *antifade reagent with* DAPI, wurde die DNA und damit der Nukleus durch DAPI markiert. Dies erscheint in der Abbildung als blaue Färbung. In der Abbildung 3.2 C ist gut zu erkennen, dass SAP97-GFP und hIL-6R besonders im Bereich der Membran und teilweise im Zytoplasma kolokalisiert vorliegen, wenn beide Proteine in den HEK293-Zellen überexprimiert werden.

3 Ergebnisse

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass SAP97 ein Interaktionspartner von ADAM17 und dessen Substrat, dem hIL-6R, ist. In dem folgenden Abschnitt wurde der Effekt dieser Interaktion auf die proteolytischen Eigenschaften der Proteasen gegenüber hIL-6R untersucht.

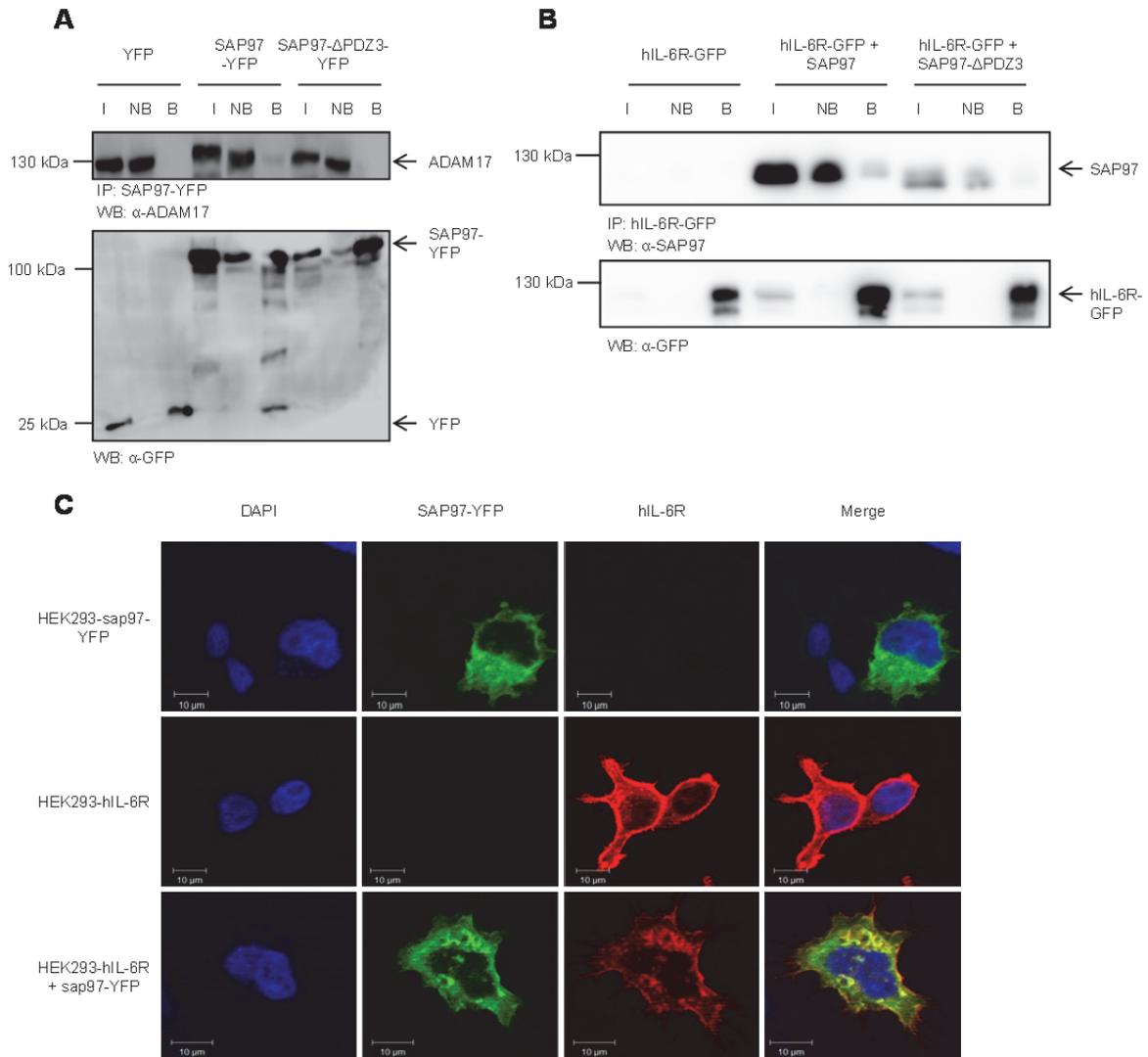


Abbildung 3.2: Interaktion von SAP97, ADAM17 und dem IL-6R. Nachweis der Interaktion von SAP97 und mADAM17 (A) oder hIL-6R (B) mit Hilfe des Nanotrap-Systems. Als Kontrolle wurde immer das GFP/YFP-gekoppelte Protein detektiert. I= Input, NB= Non-Bound, B= Bound, IP= Immunopräzipitation, WB= Western-Blot (verwendeter Antikörper) Die Pfeile zeigen die gesuchten Proteine an. (C) Konfokalbilder von HEK293-Zellen, die mit cDNAs kodierend für SAP97-YFP und hIL-6R transfiziert wurden. SAP97 wurde als Fusionsprotein mit Hilfe des YFPs (grün) nachgewiesen. Der hIL-6R wurde durch den 4-11 AK und Alexa Fluor 546 Ziege anti-Maus IgG (H+L) (rot) detektiert. Der Nukleus wurde mit Hilfe von DAPI blau gefärbt. Gezeigt werden repräsentative Bilder und Western Blots aus 3 biologisch unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Einfluss von SAP97 auf das ADAM10- und ADAM17-vermittelte *Shedding* des IL-6R

Um den Einfluss der Interaktion von SAP97 und ADAM17 auf das ADAM10 und ADAM17-vermittelte *Shedding* zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen, die den humanen IL-6R stabil exprimieren, mit dem Plasmid pcDNA3.1-SAP97-YFP transfiziert und 24 h nach der Transfektion auf 6-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden daraufhin mit PMA (2 h, 100 nM), Ionomycin (1 h, 1 μ M) oder Anisomycin (1 h, 10 μ M) stimuliert. PMA und Anisomycin aktivieren ADAM17 und die Stimulation mit Ionomycin aktiviert hauptsächlich ADAM10 (Müllberg et al. 1993; Hundhausen et al. 2007; Schwarz et al. 2013). Die Überstände wurden nach der Inkubationszeit abgenommen und zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen (2.2.3.6). Die Bestimmung der Konzentration des löslichen IL-6R (sIL-6R), im Zellkulturüberstand, erfolgte mit Hilfe eines ELISAs (2.2.2.12). Für eine Analyse des Anstiegs der Menge an löslichem IL-6R im Überstand wurde der Messwert der jeweiligen DMSO Kontrolle auf 1 gesetzt und der x-fache Anstieg an löslichem IL-6R zur Kontrolle berechnet.

In der Abbildung 3.3 A ist zu erkennen, dass in den YFP transfizierten Zellen durch die Stimulation mit PMA die 14 fache Menge an löslichem IL-6R gebildet wurde. Durch die Transfektion mit SAP97-YFP wird durch die Stimulation mit PMA nur noch die 8 fache Menge des löslichen IL-6R (sIL-6R) gebildet. Die Überexpression von SAP97 hat daher einen reduzierenden Effekt auf das PMA-induzierte *Shedding* des IL-6R. SAP97 hat keinen Einfluss auf das Ionomycin-induzierte, ADAM10-vermittelte *Shedding* des IL-6R (3.3 B), weil der Anstieg des löslichen IL-6R in den SAP97 transfizierten Zellen nach der Stimulation mit Ionomycin nicht signifikant verändert wurde im Vergleich zu den YFP transfizierten Zellen. Anisomycin aktiviert zwar auch ADAM17, jedoch verläuft diese Aktivierung nicht über die Protein Kinase C, sondern über die p38 MAPK, welche wiederum ADAM17 durch Phosphorylierung von Thr₇₃₅ aktiviert (Xu and Derynck 2010). Auf diesem Stimulationsweg beeinflusst SAP97 das ADAM17 vermittelte *Shedding* des hIL-6R nicht (3.3 C). PMA ist im Vergleich zu Ionomycin und Anisomycin ein starker Aktivator der Protease. Aus diesem Grund wird durch die Stimulation mit PMA mehr sIL-6R gebildet, als bei der Stimulation mit Ionomycin oder Anisomycin.

3 Ergebnisse

Somit scheint SAP97 hauptsächlich die ADAM17-vermittelte Prozessierung des IL-6R nach einer PMA-Stimulation zu reduzieren (Müllberg et al. 1993). Dies kann daran liegen, dass durch die Interaktion zwischen ADAM17 und SAP97 notwendige Interaktionspartner nicht mehr an ADAM17 binden können oder das Enzym nicht richtig aktiviert wird. Außerdem kann SAP97 an PKC binden und vielleicht dadurch die Aktivität von ADAM17 indirekt beeinflussen (O'Neill et al. 2011). Die Interaktion zwischen SAP97 und hIL-6R hat vielleicht keinen Effekt auf die Proteolyse, weil durch die Stimulation mit Ionomycin oder Anisomycin das *Shedding* nicht beeinflusst wurde.

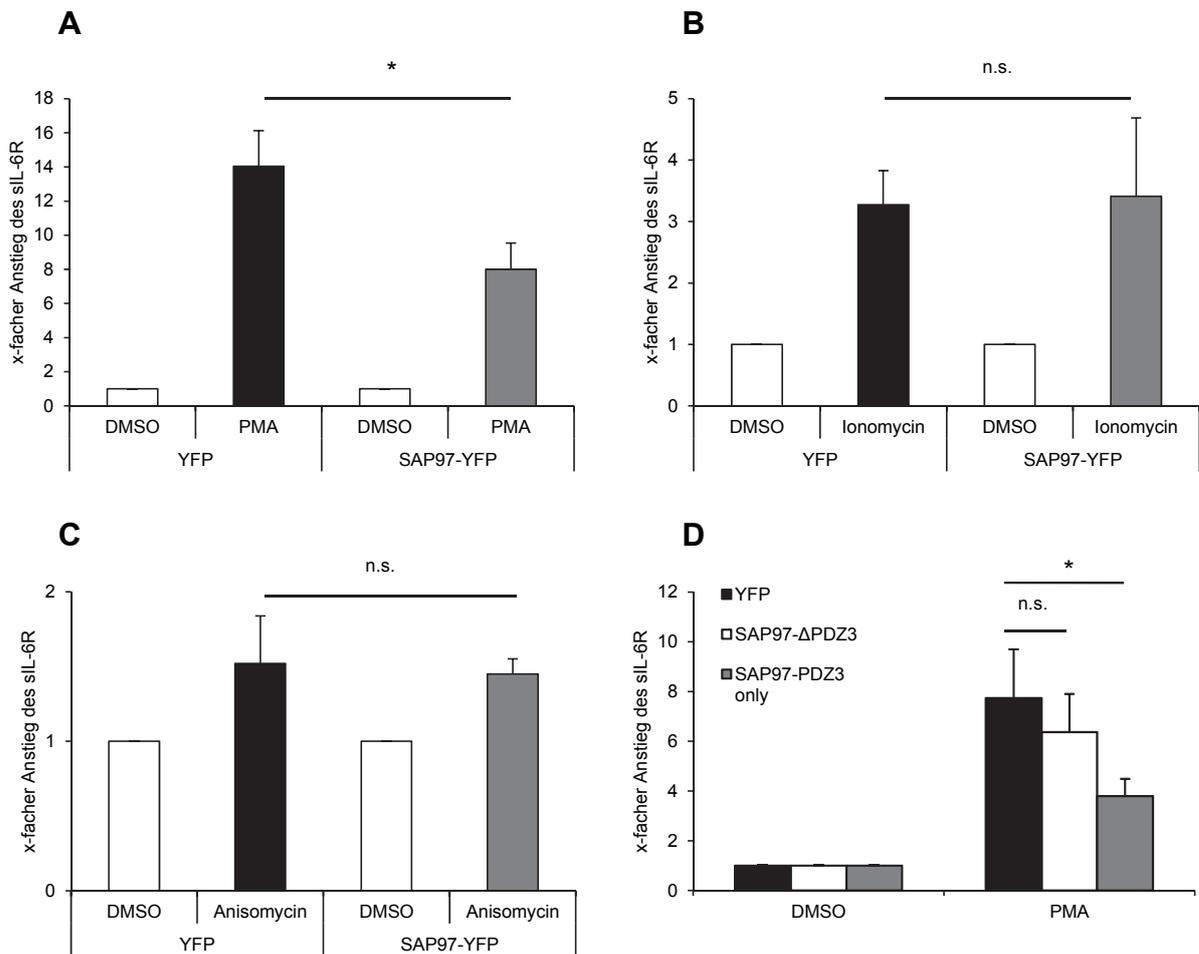


Abbildung 3.3: Einfluss von SAP97 auf die induzierte Proteolyse des IL-6 Rezeptors. HEK293-Zellen, die den hIL-6R stabil exprimieren wurden mit cDNAs kodierend für SAP97 aus der Ratte oder YFP transfiziert und mit DMSO, PMA, Ionomycin oder Anisomycin stimuliert. Der lösliche IL-6R wurde mit Hilfe eines ELISAs bestimmt und der Messwert der jeweiligen DMSO Kontrolle als 1 gesetzt. Der Anstieg des sIL-6R wurde nach der Stimulation von PMA (A), Ionomycin (B) oder Anisomycin (C) entsprechend berechnet. (D) Effekt der Mutationen des SAP97 (SAP97 Δ PDZ3, SAP97-PDZ3 only) auf die PMA-induzierte Proteolyse. Zusammengefasste Daten aus mindestens 3 biologisch unabhängigen Experimenten. n.s.: nicht signifikant.

3 Ergebnisse

Durch die Transfektion der HEK293-hIL-6R-Zellen mit cDNAs kodierend für die SAP97 Mutanten (s.3.1.1) wurde kontrolliert, ob die Reduktion des *Sheddings* durch die Interaktion zwischen ADAM17 und SAP97 erfolgt. Bei diesen Mutanten handelt es sich um SAP97- Δ PDZ3-YFP, welches durch die Deletion der PDZ3-Domäne nicht mehr mit ADAM17 interagieren kann und um SAP97-PDZ3 only-YFP, welches nur noch aus der PDZ3 Domäne und YFP besteht, wodurch die Interaktion mit ADAM17 bestehen bleibt (s. Abschnitt 3.1.1 und 3.1.2). Die transfizierten Zellen wurden für 2 Stunden mit DMSO oder PMA stimuliert und der Überstand im Anschluss abgenommen und zentrifugiert. Die Menge des sIL-6R wurde wieder mit Hilfe eines ELISAs bestimmt und die Menge des sIL-6R in den zugehörigen DMSO Kontrollen als 1 gesetzt. Der prozentuale Anstieg des sIL-6R nach der Stimulation mit PMA wurde entsprechend berechnet.

Die SAP97-Mutante, der die PDZ3-Domäne fehlt, konnte nicht mehr mit ADAM17 interagieren und hatte auch keinen reduzierenden Effekt auf das PMA-induzierte *Shedding* des IL-6R (s. Abb. 3.2 B + 3.3 D). Nach der Transfektion mit der Variante des SAP97 Proteins, das nur aus der PDZ3-Domäne bestand, wurde ebenfalls eine Reduktion der Proteolyse beobachtet (s. Abb. 3.3 D). Somit scheint der Effekt des reduzierten *Sheddings* nur durch die direkte Interaktion der PDZ3 Domäne von SAP97 und ADAM17 ausgelöst zu werden.

Um den physiologischen Effekt des reduzierten *Sheddings* zu analysieren, wurde nun untersucht, ob SAP97 einen Effekt auf die Oberflächenexpression von ADAM17 oder hIL-6R hat.

3.1.4 SAP97 hat keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von ADAM17 und hIL-6R

Für ADAM10 erfolgte schon der Nachweis, dass durch die Interaktion mit SAP97, die Expression der Protease auf der Oberfläche erhöht wird. Dies führt unter anderem zu einer verstärkten Prozessierung des *amyloid precursor protein* (Marcello et al. 2007; Saraceno et al. 2014). SAP97 ist an Transportmechanismen verschiedener Proteine, wie Actin/Spectrin assoziierte Proteine, GKAP, PKA und PKC beteiligt (Colledge et al. 2000; Wu et al. 2000;

3 Ergebnisse

McLaughlin et al. 2002). Aus diesem Grund wurde die Oberflächenexpression der Interaktionspartner von SAP97 (hIL-6R und ADAM17) in HEK293-Zellen nach einer Stimulation mit DMSO (Abb. 3.4 schwarze Linie) oder PMA (Abb. 3.4 graue Linie) untersucht. HEK293-Zellen, die stabil den humanen IL-6R exprimieren, wurden mit p409-SAP97-YFP transfiziert und 48 h später im Durchflusszytometer analysiert. Die im FACS-Puffer (0,5% BSA in PBS) gewaschenen Zellen wurden für 1 h auf Eis mit dem Primärantikörper (4-11 1:100 für hIL-6R, A300E 1:40 für ADAM17) inkubiert. Nach dem Waschen folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-maus-APC 1:100) für ebenfalls 1 h auf Eis. Überschüssiger Antikörper wurde, nach der Markierung der entsprechenden Rezeptoren, durch mehrere Waschschrte entfernt und die Zellen im FACS CantoII analysiert (2.2.2.1). In dem Histogramm in Abbildung 3.4 ist die Oberflächenexpression des hIL-6R (s. Abb. 3.4 A) und von ADAM17 (s. Abb. 3.4 B) nach einer Stimulation mit PMA (graues Histogramm) oder DMSO (schwarzes Histogramm) dargestellt. Als Kontrolle wurde die Oberflächenexpression der entsprechenden Proteine (hIL-6R und ADAM17) in Zellen analysiert, die nicht mit dem Primärantikörper behandelt wurden (s. Abb. 3.4 ausgefülltes Histogramm). Durch den Vergleich der einzelnen Histogramme untereinander wurde festgestellt, dass eine Überexpression von SAP97 die Oberflächenexpression von hIL-6R (3.4 A) und ADAM17 (3.4 B) nicht beeinflusst, weil in allen Ansätzen (mit und ohne SAP97) die gleiche Oberflächenexpression von ADAM17 oder hIL-6R detektiert wurde.

3 Ergebnisse

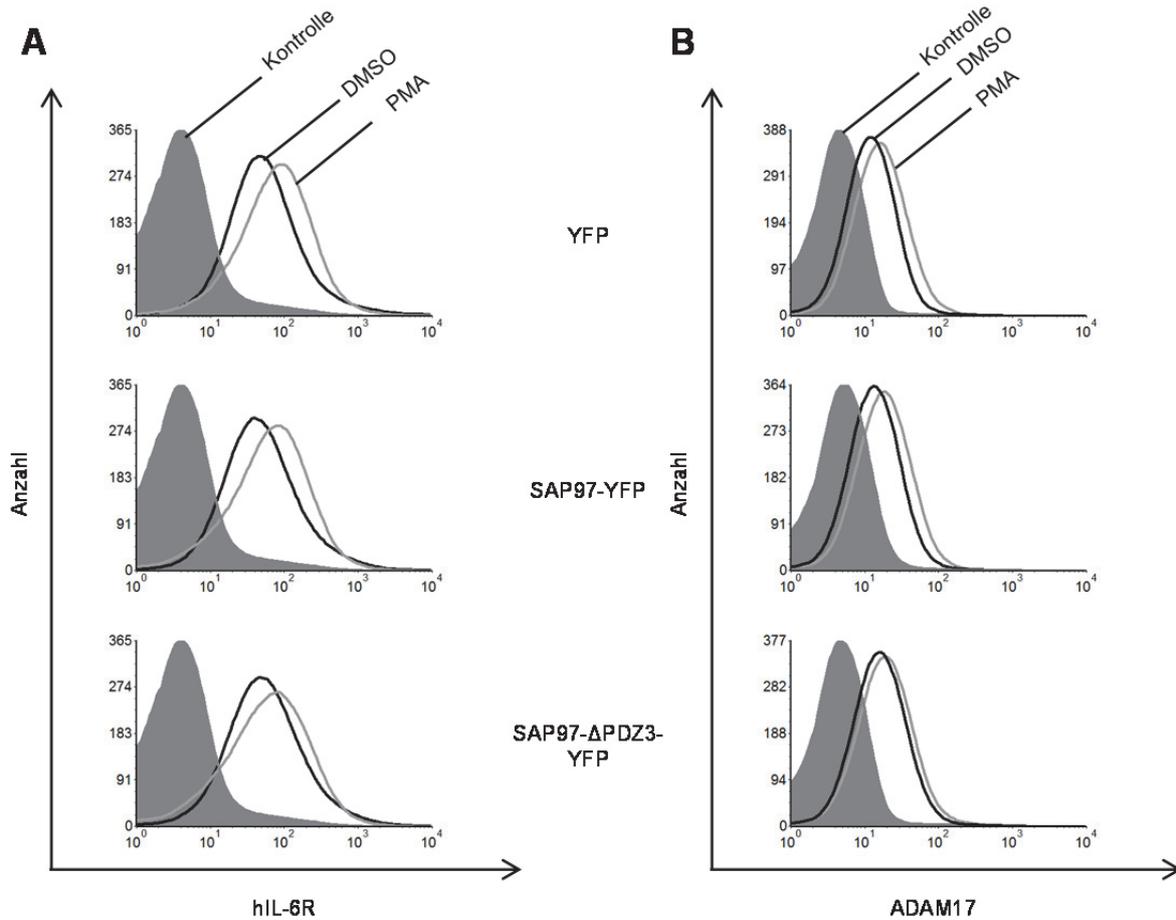


Abbildung 3.4: Oberflächenexpression von hIL-6R und ADAM17. Analyse der Oberflächenexpression von hIL-6R (A) und ADAM17 (B) in HEK293-hIL-6R-Zellen, die mit cDNAs kodierend für YFP, SAP97-YFP oder SAP97- Δ PDZ3-YFP transfiziert wurden. Die Zellen wurden 2 h mit DMSO (schwarze Linie) oder PMA (hellgraue Linie) stimuliert. Als Expressionskontrolle wurden die PMA stimulierten Zellen nur mit dem Sekundärantikörper markiert (ausgefülltes Histogramm). Exemplarische Graphen aus drei unabhängigen Experimenten.

Auch die SAP97-Variante, die nicht mehr mit ADAM17 oder dem hIL-6R interagiert (SAP97- Δ PDZ3), hat keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression dieser Proteine.

Die Stimulation mit PMA (Abb. 3.4 hellgraue Linie) hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von ADAM17, jedoch ist nach der Stimulation etwas mehr hIL-6R auf der Oberfläche vorhanden, welcher während des *Sheddings* ständig neu gebildet wird. Warum die Expression des IL-6R bei der PMA-Stimulation ansteigt, ist bisher nicht geklärt.

Somit scheint der reduzierende Effekt des PMA-induzierten *Sheddings* nicht durch eine reduzierte Oberflächenexpression der Protease oder dessen Substrat ausgelöst zu werden. Vermutlich ist der Aufbau dieses Experimentes nicht optimal geeignet um die gesuchte

Aussage treffen zu können. Daher wäre es besser diesen Versuch als pulse-chase Experiment zu wiederholen. Im folgenden Abschnitt wird der Effekt des SAP97 auf die Reifung von ADAM17 untersucht.

3.1.5 SAP97 ist nicht an der Reifung von ADAM17 beteiligt

Membrangebundene Proteasen reifen beim Transport durch das Golginetzwerk um ihre proteolytische Aktivität zu erhalten. Auf diesem Transportweg zur Membran werden Proteasen aktiviert, indem die entsprechende Prodomäne abgespalten wird. Bei ADAM17 handelt es sich hierbei um eine Domäne, die das aktive Zentrum blockiert und unter anderem durch eine Furin-Protease abgespalten wird (Lum et al. 1998; Howard et al. 2000; Schlomann et al. 2002; Endres et al. 2003; Seals and Courtneidge 2003). SAP97 kann schon während des Transportes zur Membran mit anderen Proteinen interagieren (Saraceno et al. 2014). Daher besteht die Möglichkeit, dass vielleicht die Reifung der ADAM Protease durch SAP97 beeinflusst wird und es dadurch zu dem verminderten *Shedding* des humanen IL-6R nach der PMA Stimulation kommt.

HEK293-Zellen wurden mit kodierenden cDNAs für SAP97-YFP oder YFP transfiziert, auf 6-Well-Platten überführt und mit PMA (P2) bzw. DMSO (D2) für 2 h stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und 50 µg des Lysates mit dem Antikörper A300D auf einem Western Blot analysiert.

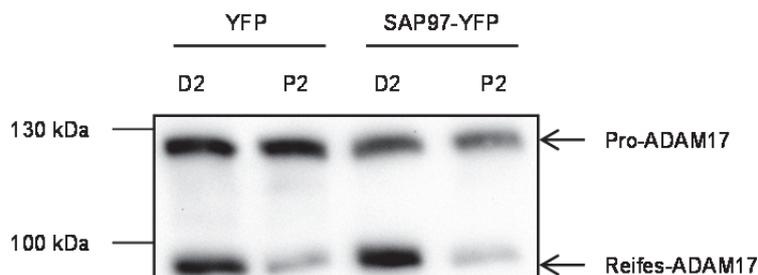


Abbildung 3.5: Reifung des ADAM17 wird nicht durch SAP97 beeinflusst. HEK293-Zellen wurden mit SAP97-YFP oder YFP transfiziert, nach 24 h mit PMA (P2, 2 h) oder DMSO (D2, 2 h) stimuliert, lysiert und auf dem Western Blot mit dem ADAM17 Antikörper (A300D) analysiert. Repräsentativer Blot aus 3 biologisch unabhängigen Experimenten.

3 Ergebnisse

Im Western Blot in der Abbildung 3.5 wurde die Pro-Form von ADAM17 (obere Bande ~ 125 kDa) und die reife Form (untere Bande ~ 93 kDa) nachgewiesen. In den unstimulierten Ansätzen sind beide Formen stark exprimiert.

Die Expression von SAP97 verändert die Expression beider Formen von ADAM17 im Vergleich zu YFP transfizierten Zellen nicht. Durch die Stimulation mit PMA kam es aber zu einer starken Reduktion des reifen ADAM17 (s. Abbildung 3.5). Dieser Effekt wird durch Endozytose von ADAM17 nach der PMA Stimulation vermittelt und wurde schon in vorherigen Arbeiten gezeigt (Doedens and Black 2000; Endres et al. 2003).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass SAP97 über die PDZ3-Domäne sowohl mit ADAM17, als auch mit dem hIL-6R interagiert und dass diese Interaktion das PMA-induzierte *Shedding* reduziert. Ein physiologischer Effekt des reduzierten *Sheddings* konnte nicht gezeigt werden, jedoch erfolgte der Nachweis, dass SAP97 weder die Oberflächenexpression des hIL-6R noch des ADAM17 beeinflusst. Zudem wurde gezeigt, dass SAP97 nicht an der Reifung des ADAM17 beteiligt ist.

3.2 Identifikation des IL-23R als neues Substrat von ADAM10 und ADAM17

Ein löslicher IL-23R konnte schon 2006 nachgewiesen werden. Die SNP (*single nucleotide polymorphism*) Variante rs11209026 (R381Q) bildet durch alternatives Splicing einen löslichen IL-23R (sIL-23R) (Duerr et al. 2006). In dem folgendem Abschnitt wird untersucht, ob ein sIL-23R auch durch eine proteolytische Spaltung generiert werden kann. Hierfür wird das Verhalten von IL-23R-exprimierenden Zellen auf die Stimulation mit PMA und Ionomycin untersucht. Für die Analysen wurden murine Prä-B-Zellen (Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-Zellen) verwendet, die stabil mit dem humanen oder murinen IL-23R transduziert wurden. Diese Zellen exprimieren neben dem IL-12R β 1 auch den IL-23R, der für eine Signalweiterleitung durch das Zytokin IL-23 notwendig ist. Die Expression der Rezeptoren IL-23R und IL-12R β 1 auf der Zelloberfläche wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen (s. Abb. 3.6 A+B). Durch einen Proliferationsassay wurde die Aktivität des Rezeptors bestätigt (Floss et al. 2013).

3 Ergebnisse

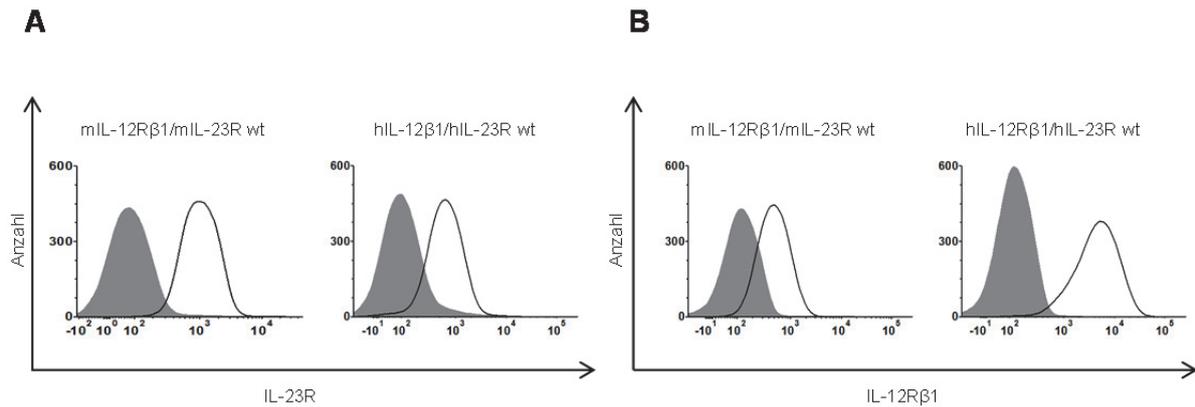


Abbildung 3.6: Expression des IL-23R in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-Zellen. Die Oberflächenexpression des IL-23R (A) und des Co-Rezeptors IL-12R β 1 (B) wurde einmal durch eine Analyse im Durchflusszytometer nachgewiesen (unausgefüllte Histogramme). Als Kontrolle dienten Ba/F3-gp130-Zellen (ausgefüllte Histogramme).

In den *Shedding*-Versuchen wird die Metalloprotease ADAM17 durch PMA und ADAM10 durch Ionomycin aktiviert. Des Weiteren wird der Effekt der Inhibitoren GI254023X (GI), welcher ADAM10 inhibiert und von GW280264X (GW), ein Inhibitor von ADAM10 und ADAM17, analysiert. Durch Deletionen und Punktmutationen in der Stalkregion des IL-23R wird die Schnittstelle der ADAM-Proteasen eingegrenzt. Als letztes wird durch die Expression von Rezeptordomänen die Interaktion zwischen dem Rezeptor und ADAM17 erforscht. Initial wird der Einfluss der verwendeten Inhibitoren auf die Oberflächenexpression des IL-23R nachgewiesen.

3.2.1 Internalisierung des IL-23 Rezeptors

Die Internalisierung beschreibt die Aufnahme von Rezeptoren von der Zelloberfläche in das Zellinnere. Es kann eine rasche Aufnahme der Rezeptoren nach einer starken, anhaltenden Stimulation mit dem entsprechenden Liganden erfolgen (Vire et al. 2011). Es werden aber auch Rezeptoren in Abwesenheit ihres Signalmoleküls in die Zelle endozytiert. Für die Analyse der Internalisierung des IL-23R wurden Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-mIL-23R-Zellen mit einem Primärantikörper, der gegen den murinen IL-23R gerichtet ist, auf Eis inkubiert und im Anschluss für die angegebenen Zeitpunkte (0, 10, 20, 30, 60, 90 min) bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Während dieser Zeit wird eine gewisse Menge der Rezeptoren zusammen mit dem

3 Ergebnisse

gebundenen Antikörper in die Zelle aufgenommen oder durch Proteolyse von der Oberfläche in den Überstand freigesetzt. Als Negativkontrolle wurden Ba/F3-gp130-Zellen mit beiden Antikörpern gekennzeichnet. Um zu untersuchen, ob die Internalisierung des IL-23R von der Stimulation mit dem entsprechenden Zytokin abhängt wurden die Zellen während der Inkubation bei 37°C mit HmIL-23 (Fusionsprotein aus p19 und p40) stimuliert. Eine weitere Möglichkeit, einen Rezeptor von der Oberfläche zu entfernen, ist die Proteolyse. Aus diesem Grund wurden die Zellen vor der Inkubation mit dem Primärantikörper mit dem Inhibitor GI254023X (GI), welcher spezifisch ADAM10 inhibiert, dem Inhibitor GW280264X (GW), der ADAM10 und ADAM17 inhibiert und dem Matrix-Metalloproteinaseinhibitor Marimastat, welcher alle Matrix-Metalloproteinasen inhibiert, für 30 min bei 37°C inkubiert.

Nach den angegebenen Zeitpunkten der Inkubation (0, 10, 20, 30, 60, 90 min) wurden die Zellen in FACS-Puffer (0,5% BSA/PBS) gewaschen und auf Eis gelagert, um alle enzymatischen Vorgänge, wie z.B. Proteolyse und Endozytose zu stoppen. Sobald die Inkubationszeit aller Ansätze abgelaufen war, wurden die auf der Oberfläche markierten, verbliebenden Rezeptoren mit einem Sekundärantikörper markiert (α -Ratte-Alexa Fluor 647). Die endozytierten und proteolytisch gespaltenen Rezeptoren wurden nicht markiert, weil diese nicht in den Kontakt mit dem Sekundärantikörper kamen. Die Analyse der Oberflächenexpression erfolgte im Durchflusszytometer. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression des IL-23R über die Zeit abnahm. Die fehlende Expression des IL-23R auf den Ba/F3-gp130-Zellen (Abb. 3.7 A schwarz) ist bei den Ansätzen mit und ohne Zytokinstimulation bzw. bei den Ansätzen, die mit den Inhibitoren stimuliert wurden, gleich, weil immer die entsprechende Zellsuspension gemessen wurde. Die Zellsuspension des Zeitpunktes 0 bei den Ansätzen mit und ohne Zytokin (Abb. 3.7 A rot) ist ebenfalls gleich, weil die Stimulation mit dem Zytokin erst nach der Stimulation mit dem Primärantikörper erfolgte und daher die gleiche Zellsuspension im Durchflusszytometer analysiert wurde. Sowohl in dem Ansatz, der ohne Zytokin stimuliert wurde, als auch bei dem Ansatz, bei dem eine Stimulation mit IL-23 erfolgte, war schon nach 30 min (Abb. 3.7 A grün) ein großer Teil des IL-23R von der Oberfläche verschwunden. Nach einer Inkubation über 60 min (Abb. 3.7 A pink) konnte so gut wie kein IL-23R mehr auf der Oberfläche detektiert werden. Nur durch die Inkubation mit den Inhibitoren GI254023X, GW280264X und dem Matrix-Metalloprotease-Inhibitor Marimastat, wurde der IL-23R auch nach 90 min (Abb. 3.7 A hellblau) noch auf der Zelloberfläche detektiert.

3 Ergebnisse

Aus den ermittelten Messwerten der durchflusszytometrischen Messungen wurde der arithmetische Mittelwert bestimmt, die Ausgangskonzentration des Rezeptors auf der Oberfläche zum Zeitpunkt 0 auf 100% gesetzt und die Abnahme der Oberflächenexpression entsprechend berechnet. Aus diesen Werten wurden die in Abbildung 3.7 B dargestellten Graphen erstellt. Der Zeitpunkt, an dem nur noch 50% des Rezeptors auf der Oberfläche detektierbar war, wurde durch eine getrichelte Linie beschrieben.

Durch die graphischen Analyse der Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und der Berechnung der Reduktion der Oberflächenexpression mit Hilfe einer Trendlinie wurde ermittelt, dass nach 14 Minuten die Konzentration des mIL-23R auf der Oberfläche von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-mIL-23R-Zellen um 50% abgenommen hat. Die Stimulation mit IL-23 sorgte dafür, dass dieser Wert nicht signifikant auf 18 Minuten anstieg (gestrichelte Linie Abbildung 3.7 B).

Die Inhibition des *Sheddings* durch die Stimulation mit Marimastat verlängert die Oberflächenexpression des IL-23R signifikant auf 37 min ($p=0,03$) (Abbildung 3.7 B). Auch die Inhibition von ADAM10 durch GI254023X oder ADAM10 und ADAM17 durch GW280264X verlängert die Oberflächenexpression auf 28 min bzw. 35 min. Dies zeigt, dass die Abnahme des Rezeptors auf der Oberfläche nicht nur durch die Internalisierung, sondern auch durch die ADAM10/17-vermittelte Proteolyse erfolgte.

Die schnelle Internalisierung des Rezeptors verhindert eine genaue Analyse des *Sheddings* mit Hilfe des Durchflusszytometers. Für eine vollständige Aktivierung von ADAM17 müssen die Zellen für 2 h bei 37°C mit PMA inkubiert werden. In dieser Zeit wäre aber der markierte IL-23R schon allein durch die Endozytose vollständig von der Oberfläche entfernt. Aus diesem Grund wurde das *Shedding* des IL-23R im weiteren Verlauf durch Western Blot Analysen untersucht.

3 Ergebnisse

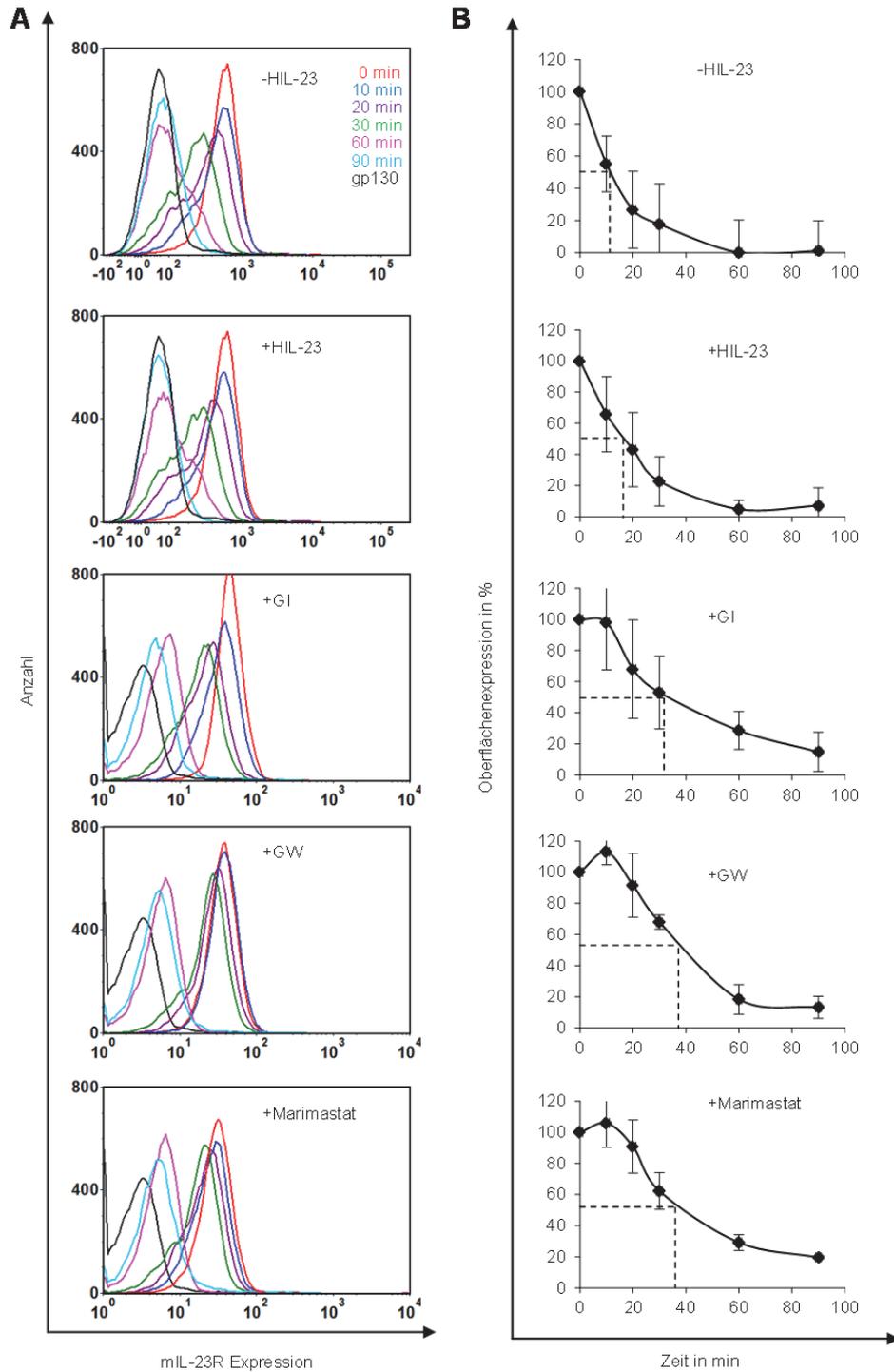


Abbildung 3.7: Internalisierung des IL-23R. (A) Der auf der Oberfläche exprimierte mIL-23R wurde auf Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R-Zellen markiert und die Zellen im Anschluss bei 37°C für 10, 20, 30, 60 und 90 Minuten inkubiert. Nach einer Inkubation mit einem Alexa Fluor 647-markierten Sekundärantikörper wurde die Oberflächenexpression des Rezeptors zum gewählten Zeitpunkt im Durchflusszytometer analysiert. Schwarz: Ba/F3-gp130-Zellen. (B) Aus drei biologisch unabhängigen Experimenten wurde der Mittelwert gebildet und die Rezeptorexpression zum Zeitpunkt 0 auf 100% gesetzt. Die Expression zu den anderen Zeitpunkten wurde entsprechend berechnet. Die gestrichelten Linien, geben den Zeitpunkt an, an dem nur noch 50% des Rezeptors auf der Oberfläche vorhanden war. Analysen aus drei unabhängigen Experimenten. Ansätze mit GI und GW wurden nur zwei Mal analysiert.

3.2.2 Induziertes *Shedding* des humanen und murinen IL-23R

Um näher zu charakterisieren, ob der IL-23R ein Substrat für die Sheddasen ADAM10 und ADAM17 ist, wurden murine Prä-B-Zellen (Ba/F3-gp130-Zellen) verwendet, die stabil mit dem humanen oder murinen IL-23R transduziert wurden. Bisher steht für den Nachweis des IL-23R kein ELISA zur Verfügung, der sensitiv genug ist, um den löslichen IL-23R (sIL-23R) im Zellkulturüberstand nachzuweisen. Daher erfolgte der Nachweis durch Western Blot Analysen.

Für das induzierte *Shedding* wurden, wie in Abschnitt 2.2.3.6 beschrieben, $1,2 \times 10^6$ Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R-Zellen in 1 ml DMEM^{+/+} ausgesät und für 1 h mit Ionomycin (1 μ M, I1) bei 37°C stimuliert, wodurch ADAM10 aktiviert wird (Hundhausen et al. 2007). Die Induktion der ADAM17 Aktivität erfolgte durch eine Stimulation für 2 h mit Phorbol-12-myristat-12-acetat (PMA, 100 nM, P2) (Müllberg et al. 1993). Als Kontrolle diente DMSO (D1, D2), welches für die gleichen Zeitpunkte eingesetzt wurde, weil sowohl Ionomycin, als auch PMA in DMSO gelöst wurden.

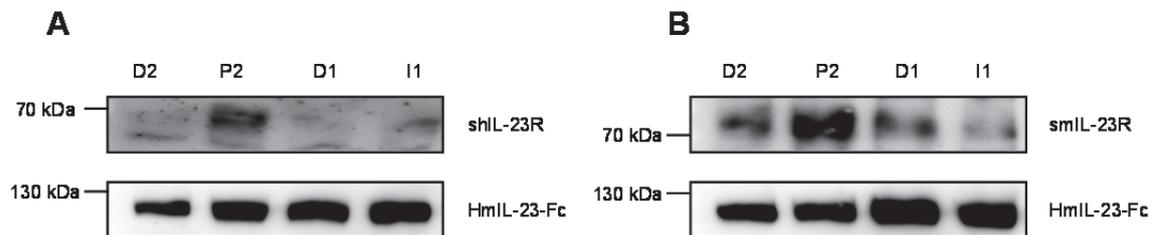


Abbildung 3.8: ADAM17 prozessiert den humanen und murinen IL-23R. BaF3/gp-130-IL-12R β 1, stabil transduziert mit dem humanen (A) oder murinen (B) IL-23R, wurden für 2 h mit PMA (P2) bzw. 1 h mit Ionomycin (I1) stimuliert. Als Kontrolle wurde DMSO (D1, D2) verwendet, weil beide Agenzien in DMSO gelöst waren. Der lösliche Rezeptor wurde mittels Immunopräzipitation aus dem Überstand gewonnen und im Anschluss per Western Blot visualisiert. Die gleichmäßige Beladung und biologische Aktivität des sIL-23R wurde durch den Nachweis von HmIL-23-Fc, welches für die Präzipitation verwendet wurde, sichergestellt. Dargestellt ist jeweils ein exemplarischer Blot aus drei unabhängigen Experimenten.

Um den löslichen IL-23R (sIL-23R) in den Zellkulturüberständen nachzuweisen, wurde dieser mit Hilfe einer Immunopräzipitation konzentriert. Hierzu wurden die Proben mit HmIL-23-Fc versetzt und das Fc-getaggte Protein durch Protein-A Agarose gefällt (siehe Abschnitt 2.2.2.3). Durch den Nachweis mittels IL-23R Antikörper wurde im Western Blot, nach der Stimulation mit PMA (P2), ein Protein bei ungefähr 70 kDa (muriner IL-23R),

3 Ergebnisse

beziehungsweise ein rund 65 kDa großes Protein für den humanen IL-23R im Überstand nachgewiesen, was in etwa dem extrazellulären Bereich des IL-23R entspricht. Die ungeschnittenen Rezeptoren wurden bei einer Größe von knapp 100 kDa (Murin) und 90 kDa (Human) nachgewiesen (nicht gezeigt). Eine erhöhte Konzentration des löslichen IL-23R nach der Stimulation mit PMA (P2) bestätigt, dass durch die Aktivierung von ADAM17 sowohl der humane, als auch der murine IL-23R in den Überstand freigesetzt und folglich *geshededet* werden (Abb. 3.8 A und B). In den Kontrollansätzen, die nur mit DMSO (D2) stimuliert wurden, erfolgte der Nachweis einer geringeren Menge des sIL-23R. Nach der Aktivierung von ADAM10 durch Ionomycin wurde so gut wie keine verstärkte Konzentration des sIL-23R im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle im Überstand nachgewiesen (Abb. 3.8 A und B), was zeigt, dass der IL-23R kein Substrat von ADAM10 nach einer Stimulation mit Ionomycin ist. Aus diesem Grund wurden alle folgenden Experimente in Bezug auf die Aktivierung von ADAM17 durchgeführt, weil die bisherigen Daten zeigten, dass ADAM17 die wichtigere Metalloprotease für das induzierte *Shedding* ist.

Die Detektion des HmIL-23-Fc bestätigt die gleichmäßigen Beladung des Western Blots und die biologische Aktivität des löslichen Rezeptors, weil dieser nur in seiner richtigen Konformation an das Fusionsprotein aus p19 und p40 (HmIL-23-Fc) bindet.

Eine genaue quantitative Analyse des *Sheddings* ist durch die Immunopräzipitation und den Nachweis mittels Western Blot nicht möglich.

Durch die Inhibition der Metalloproteasen soll im folgenden Abschnitt näher untersucht werden, ob ADAM17 die verantwortliche Protease des induzierten *Shedding* des IL-23R ist.

3.2.3 Der IL-23R ist ein Substrat von ADAM17

Zur näheren Analyse ob der IL-23R nach einer Stimulation mit PMA durch ADAM17 prozessiert wird, wurden die stabil transduzierten Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-Zellen wie im Abschnitt 3.2.2 beschrieben ausgesät und mit PMA stimuliert. Vor der Stimulation mit PMA wurden die Zellen mit den Inhibitoren GI254023X (3 μ M [ADAM10]) oder GW280264X (3 μ M [ADAM10 und ADAM17]) (Hundhausen et al. 2003; Ludwig et al. 2005) für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Analyse der Überstände zeigte erneut, dass das PMA-induzierte *Shedding* den humanen und murinen sIL-23R freisetzt.

3 Ergebnisse

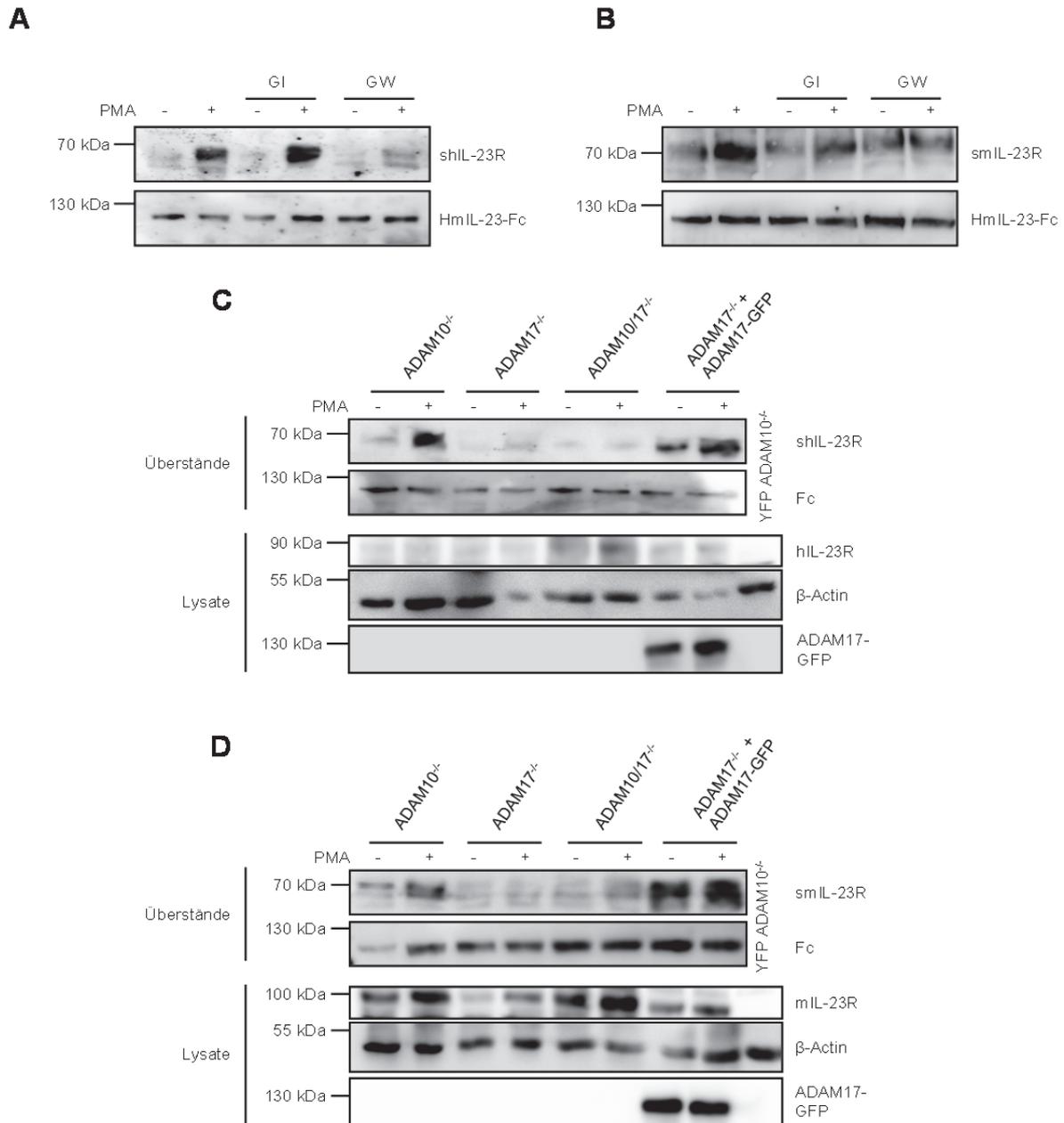


Abbildung 3.9: ADAM17 spaltet den IL-23R nach PMA-Stimulation. Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-Zellen, die den humanen (A) bzw. murinen (B) IL-23R exprimieren, wurden zuerst für 30 min mit den Inhibitoren GI254023X (GI) und GW280264X (GW) inkubiert und im Anschluss für 2 h mit DMSO (-) oder PMA (+) stimuliert. Die Detektion der löslichen Rezeptoren erfolgte wie in Abb. 3.8 beschrieben. hIL-23R (C) oder mL-23R (D) wurde in HEK293T-Zellen, bei denen ADAM10 (ADAM10^{-/-}), ADAM17 (ADAM17^{-/-}) oder beide Proteasen (ADAM10/17^{-/-}) ausgeknockt wurden und zusätzlich in ADAM17 rekonstituierten ADAM17-Ko Zellen (ADAM17^{-/-} + ADAM17-GFP), transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1x10⁶ Zellen/ Well in eine 6-Well-Platte ausgesät. Die Stimulation mit PMA erfolgte nach weiteren 24 h. Die gewonnenen Überstände wurden wie in Abb. 3.8 beschrieben analysiert. HmIL-23-Fc fungierte als Ladekontrolle bei der Analyse der Überstände. Um die gleichmäßige Expression der Rezeptoren in den Zellen nachzuweisen, wurden 50 μ g der Lysate auf einem Western Blot analysiert. Hierbei wurde die Expression des Rezeptors (hIL-23R, mL-23R) und von ADAM17-GFP analysiert. Als Ladekontrolle fungierte β -Actin. HEK293-ADAM10^{-/-} Zellen, die mit p409-YFP transfiziert wurden (YFP ADAM10^{-/-}), dienen als Expressionskontrolle.

3 Ergebnisse

Durch die Prästimulation mit GI wird das *Shedding* nicht beeinflusst. Die Stimulation mit GW vermindert jedoch die Freisetzung des sIL-23R erheblich, so dass nur noch eine geringe Menge des Proteins im Überstand detektiert wurde (s. Abb. 3.9 A + B). Diese gilt sowohl für den hIL-23R als auch den mIL-23R, wenn auch der Effekt für den mIL-23R weniger deutlich zu beobachten war (s. Abb. 3.9 B).

Der Nachweis des HmIL-23-Fc beweist wieder die gleichmäßige Beladung des Blots und die biologische Aktivität des sIL-23R. Dieses deutet darauf hin, dass ADAM17 die verantwortliche Protease für die PMA-induzierte Proteolyse des IL-23R ist, weil das *Shedding* nur durch eine Inkubation des ADAM10/17 Inhibitors GW280264X beeinflusst wurde.

In einem weiteren Experiment wurden HEK293T-Zellen, in denen ADAM10, ADAM17 oder beide Proteasen durch ein CRISPR-Cas System ausgeknockt wurden (Riethmueller et al. 2016), mit hIL-23R (Abb. 3.9 C) oder mIL-23R (Abb. 3.9 D) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen/Well in eine 6-Well-Platte ausgesät und für 2 h mit PMA bzw. DMSO stimuliert. Aus den gewonnenen Überständen wurde der lösliche IL-23R mit Hilfe einer Immunopräzipitation konzentriert und per Western Blot analysiert. Dabei wurde gezeigt, dass nur in den HEK293T-Zellen, die defizient für ADAM10 sind ($ADAM10^{-/-}$), löslicher IL-23R nach einer Stimulation mit PMA detektierbar war. Dieses gilt sowohl für den murinen (Abb. 3.9 C oberster Blot Überstände), als auch den humanen IL-23R (Abb. 3.9 D oberster Blot Überstände).

Außerdem gelang der Nachweis des shIL-23R und des smIL-23R in ADAM17 defizienten HEK293T-Zellen, die mit ADAM17-GFP cDNAs co-transfiziert wurden ($ADAM17^{-/-}$ + ADAM17-GFP). Von diesen Zellen wird eine erhöhte Menge des löslichen IL-23R nach einer DMSO- oder PMA-Stimulation gebildet, verglichen mit den anderen verwendeten KO-Zellen. Dies kann daran liegen, dass sowohl ADAM17, als auch ADAM10 an der Prozessierung des IL-23R beteiligt sind, weil nur in den HEK293T-Zellen, in denen beide Proteasen exprimiert wurden, sIL-23R nach einer DMSO-Stimulation (-) deutlich detektiert wurde (s. Abb. 3.9 C+D oberer Blot Überstände). In den HEK293T-Zellen, in denen ADAM17 ($ADAM17^{-/-}$) oder beide Proteasen ($ADAM10/17^{-/-}$) deletiert wurden, konnte sowohl nach der Stimulation mit DMSO (-), als auch nach der Stimulation mit PMA (+) kein löslicher IL-23R auf dem Western Blot detektiert werden (s. Abb. 3.9 C+D). Die gleichmäßige Beladung und die Bindekapazität des löslichen Rezeptors an IL-23 wurde durch den Nachweis des HmIL-23-Fc gezeigt (s. Abb. 3.9 C+D unterer Blot Überstände).

3 Ergebnisse

Zur Überprüfung, ob die Rezeptoren in allen Ansätzen gleichmäßig exprimiert wurden, wurde ein Gel mit je 50 µg Zelllysate pro Probe beladen und analysiert. Als Expressionskontrolle fungierten HEK293T-ADAM10^{-/-} Zellen, die mit p409-YFP transfiziert wurden. Dadurch wurde die gleichmäßige Expression der Rezeptoren in allen Zellen (s. Abb. 3.9 C+D oberer Blot Lysate) und die Expression von ADAM17-GFP in den rekonstituierten ADAM17^{-/-} Zellen nachgewiesen (s. Abb. 3.9 C+D unterer Blot Lysate). Die Expression des IL-23R ist in den Doppelknockout-Zellen etwas höher als in den anderen Zellen. Dies bestätigt, dass der IL-23R durch den KO der ADAM-Proteasen nicht freigesetzt wurde und die Abwesenheit des sIL-23R nicht an einer verminderten Expression des Rezeptors liegt. β-Actin fungierte bei den Lysaten als Ladekontrolle (Abb. 3.9 C+D mittlerer Blot Lysate). Zusammenfassend wurde in dieser Versuchsreihe gezeigt, dass ADAM17 die verantwortliche Protease für das PMA-induzierte *Shedding* in HEK293T-Zellen ist.

In den DMSO Kontrollen wurde zudem immer eine geringe Menge des sIL-23R nachgewiesen, was durch konstitutives *Shedding* gebildet werden kann. Daher wird im nächsten Abschnitt der Einfluss der konstitutiv aktiven Protease ADAM10 näher untersucht.

3.2.4 ADAM10 vermitteltes *Shedding* des humanen und murinen IL-23R

Die Prozessierung des IL-23R wurde nicht nur auf das induzierte *Shedding* durch ADAM10 und ADAM17, sondern auch auf das ADAM10 vermittelte, konstitutive *Shedding* untersucht, welches schon für den IL-6R gezeigt wurde (Matthews et al. 2003; Garbers et al. 2011). Um den Einfluss des konstitutiven *Sheddings* auf den humanen und murinen IL-23R zu untersuchen, wurden stabil transduzierte Ba/F3-gp130-IL-12Rβ1-Zellen, die den humanen oder murinen IL-23R stabil exprimieren, in DMEM^{+/+} mit dem entsprechendem Zytokin für 24 h bei 37°C inkubiert (2.2.3.7). Die Zellen wurden über die ganze Zeit gar nicht (Mock), mit GI254023X (GI, 3 µM), GW280264X (GW, 3 µM), Marimastat (Mar, 10 µM) oder DMSO stimuliert. DMSO wurde verwendet, weil die Inhibitoren in DMSO gelöst waren und dadurch ein Effekt des DMSOs ausgeschlossen werden sollte. Nach 24 h wurde der lösliche IL-23R, durch das Fusionsprotein aus p19 und p40 (HmIL-23-Fc), aus dem Medium gefällt und mit Hilfe des Western Blots detektiert (2.2.2.3/2.2.2.7).

3 Ergebnisse

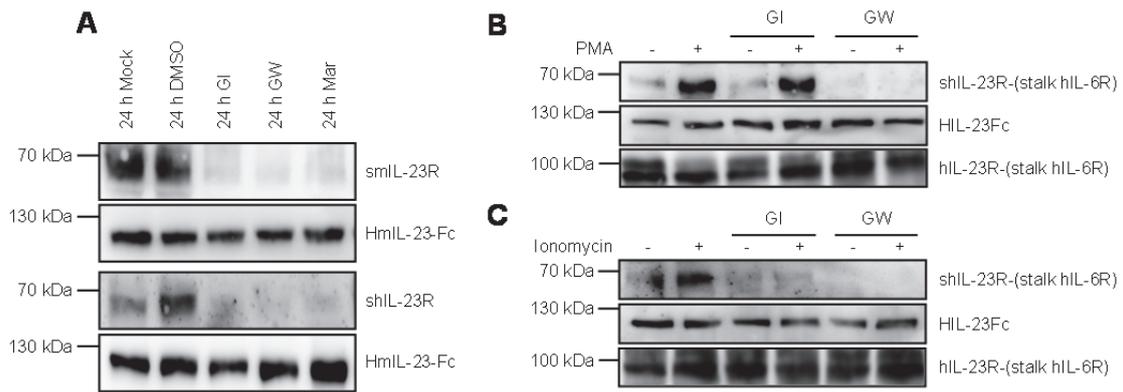


Abbildung 3.10: ADAM10 vermitteltes Shedding des murinen und humanen IL-23R. (A) Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-Zellen, die den murinen bzw. humanen IL-23R exprimieren, wurden ausgesät und für 24 h gar nicht (Mock), mit DMSO, GI254023X (GI), GW280264X (GW) oder Marimastat (Mar) stimuliert. HEK293-Zellen wurden mit einem hIL-23R-(stalk hIL-6R) Expressionsplasmid transfiziert, ausgesät, für 30 min mit GI, GW oder DMSO stimuliert und im Anschluss mit PMA (B) oder Ionomycin (C) inkubiert. Die Überstände wurden wie in Abbildung 3.8 beschrieben gewonnen und analysiert. Ein exemplarischer Blot aus drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Auf dem Western Blot erfolgte nach 24 h in dem unstimulierten Ansatz und dem Ansatz, der mit DMSO versetzt wurde, der Nachweis des löslichen IL-23Rs (s. Abbildung 3.10 A). Das gilt sowohl für den humanen IL-23R, als auch für den murinen IL-23R. Nach erfolgter Stimulation mit den Inhibitoren (GI, GW, Mar) konnte hingegen kein löslicher IL-23R nachgewiesen werden. GI wirkt selektiv gegen ADAM10, wodurch auf diese Art gezeigt wurde, dass ADAM10 den humanen und den murinen IL-23R als konstitutiv aktive Protease prozessiert.

Die Ionomycin-induzierte Proteolyse durch ADAM10 ist für den IL-6 Rezeptor schon beschrieben (Garbers et al. 2011), jedoch wurde durch die Stimulation mit Ionomycin, welches ADAM10 aktiviert, keine nennenswerte Steigerung der Menge des sIL-23R beobachtet. Um zu kontrollieren, ob diese Eigenschaft durch die Stalkregion vermittelt wird, wurde ein synthetischer Hybridrezeptor kloniert. Dieser besteht aus dem humanen IL-23R und der humanen IL-6R Stalkdomäne, die die Stalkregion des IL-23R ersetzt. In transfizierten HEK293-Zellen wurde der IL-23R(stalk-IL-6R) nach einer Stimulation mit PMA durch ADAM17 prozessiert. Die Inhibition von ADAM10 durch GI hatte keinen Effekt auf die PMA-induzierte Proteolyse des Hybridrezeptors. Werden aber sowohl ADAM10, als auch ADAM17 durch GW inhibiert, wird kein IL-23R(stalk-IL-6R) mehr freigesetzt (s. Abb. 3.10 B). Somit ist, wie erwartet, ADAM17 die verantwortliche Protease für das PMA-induziert *Shedding* des IL-23R(stalk-IL-6R). Erstaunlicherweise wurde dieser Hybridrezeptor auch

nach einer Stimulation mit Ionomycin prozessiert, was durch die Stimulation mit GI und GW inhibiert wurde. Somit ermöglicht die Veränderung der Stalkregion das Ionomycin-induzierte, ADAM10-vermittelte *Shedding* des IL-23R (s. Abb. 3.10 C). Dieser lösliche Hybridrezeptor ist weiterhin biologisch aktiv und kann HmIL-23-Fc binden. Die gleichmäßige Expression des Hybridrezeptors wurde durch die Analyse des Lysates bestätigt (Abbildung 3.10 B+C).

Somit konnte in den vorherigen Abschnitten gezeigt werden, dass der IL-23R ein Substrat der PMA-induzierten ADAM17-vermittelten Proteolyse ist. Eine Prozessierung des Rezeptors durch ADAM10 erfolgt nur konstitutiv oder durch eine Stimulation mit Ionomycin, nach der Mutation der Stalkregion. Diese Stalkregion ist essentiell für die Proteolyse von Rezeptoren (Murphy 2008) und wird im folgenden Abschnitt näher analysiert, um die Spaltregion von ADAM17 einzugrenzen.

3.2.5 Generierung von IL-23R Deletionsvarianten zur Eingrenzung der ADAM17-Schnittstelle im IL-23R

Proteolytisch aktive ADAM-Proteasen spalten eine Vielzahl von Membranproteinen nahe der Membran in einer so genannten Stalkregion (Murphy 2008). Für ADAM10, als auch für ADAM17 konnte bisher keine Konsensussequenz der proteolytischen Schnittstelle in den entsprechenden Substraten identifiziert werden (Rawlings and Barrett 1999). Aus diesem Grund muss die Analyse der Schnittstelle für jedes Substrat über molekularbiologische Methoden erfolgen.

3 Ergebnisse

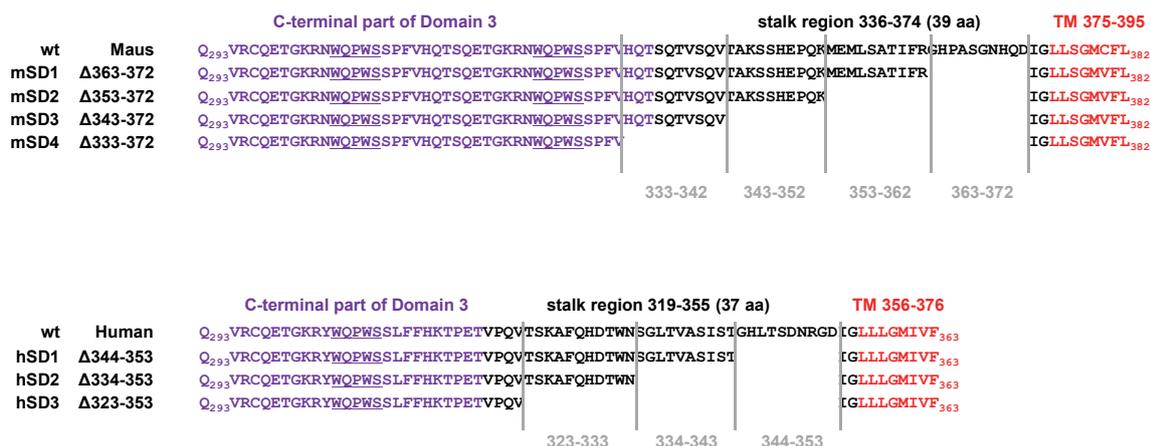


Abbildung 3.11: Stalkdeletionsvarianten des murinen und humanen IL-23R. Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz der Stalkregion des murinen (oben) und des humanen (unten) IL-23R (schwarz markiert). Das Ende der D3-Domäne (lila markiert) und der Anfang der Transmembrandomäne (TM, rot markiert) sind ebenfalls dargestellt. Das WQPWS-Motiv in der D3-Domäne ist unterstrichen. Vor den Aminosäuresequenzen sind die verwendeten Bezeichnungen und der Bereich der entsprechenden Deletion angegeben.

Für die Analyse der Schnittstelle wurden Deletionsvarianten der Stalk-Region generiert, bei denen jeweils 10, 20, und 30 Aminosäuren, ausgehend von der Transmembrandomäne, deletiert wurden (Eine Übersicht der Deletionsvarianten findet sich in Abbildung 3.11). Die entsprechenden pcDNA3.1-Expressionsplasmide wurden in der AG Scheller generiert. Die cDNAs, die für die murinen IL-23 Rezeptorvarianten kodieren, wurden in pMOWS-Vektoren umklontiert und stabil, wie in Abschnitt 2.2.3.4 beschrieben, in Ba/F3-gp130-IL-12Rβ1-Zellen transduziert.

3.2.6 Die IL-23R Deletionsvarianten sind biologisch aktiv

Für den Nachweis der biologischen Aktivität der Deletionsvarianten des murinen IL-23 Rezeptors wurde ein Proliferationsassay der transduzierten Ba/F3-gp130-IL-12Rβ1-IL-23R-Zellen und aller IL-23R-Stalkdeletionsvarianten durchgeführt (2.2.3.5).

Hierfür wurden die Zellen mit 0,2% Hyper-IL-6 (20 ng) (ein Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R) oder 0,2% HmIL-23-Fc (10 ng) (ein Fusionsprotein aus p19 und p40) Überständen aus konditionierten COS7-Zellen stimuliert. Als Negativkontrolle erfolgte die Analyse ohne Zytokinzugabe. Die gemessene Proliferation wurde in *relative light units* (RLU) angegeben. Alle Zellen proliferierten in Anwesenheit von Hyper-IL-6, weil dieses Fusionsprotein, genau

3 Ergebnisse

wie der natürlich vorkommende IL-6/sIL-6R-Komplex eine Signaltransduktion über die Bindung an gp130 auslöst. Eine Proliferation mit dem Zytokin IL-23 ist hingegen nur möglich, wenn die Zellen den IL-12R β 1 und einen funktionsfähigen IL-23R exprimieren.

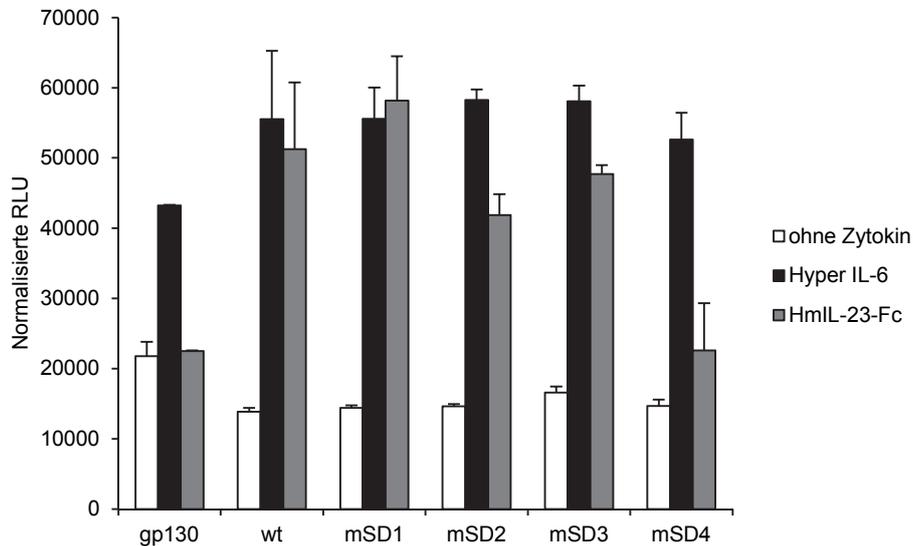


Abbildung 3.12: Proliferationsassay der transduzierten Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R-Zellen und der IL-23R-Stalkdeletionsvarianten. Die Proliferation der transduzierten Zellen wurde, wie in 2.2.3.5 beschrieben, analysiert. Dargestellt sind die gemessenen *relative light units* (RLU) nach der Stimulation von murinen IL-23R Deletionsvarianten mit 0,2% konditionierten Hyper-IL-6 Zellkulturüberstand (schwarz) oder 0,2% HmIL-23-Fc Überstand (grau). Als Kontrolle wurden die Zellen nicht mit Zytokin stimuliert (weiß). Der Proliferationsassay wurde zweimal durchgeführt. Standardabweichung aus drei Werten eines Versuchs.

Alle Zellen, die eine murine Deletionsvariante des IL-23R exprimieren, proliferierten durch die Stimulation mit Hyper-IL-6 und HmIL-23-Fc, wohingegen die Deletionsvariante mSD4 nur noch eine geringe Proliferation durch die Zugabe von HmIL-23-Fc zeigte (s. Abb. 3.12). Dieser Effekt wurde schon für den IL-6R beschrieben. Baran et al. zeigten, dass eine Deletion von 36 Aminosäuren im IL-6R Stalk die IL-6 vermittelte Proliferation vermindert (Baran et al. 2013). Die verminderte Proliferation der Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-mSD4-Zellen wird durch die verkürzte Stalkregion von mSD4 vermittelt und nicht durch eine reduzierte Expression auf der Zelloberfläche (s. 3.13 B).

Die stabil transduzierten Zellen wurden dazu genutzt, um die putative Schnittstelle von ADAM17 im murinen IL-23R zu identifizieren.

3.2.7 Eingrenzung der proteolytischen Schnittstelle des murinen IL-23R durch Deletionsvariante

Um eine Deletionsvariante zu identifizieren, bei der keine proteolytische Spaltung durch ADAM17 mehr erfolgt, wurden die in Abbildung 3.11 beschriebenen Varianten kloniert und stabil in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-Zellen transduziert (AG Scheller). Für die Analyse des *Sheddings* erfolgte eine Stimulation der Zellen mit PMA über 2 h bei 37°C. Nach der Immunopräzipitation des löslichen IL-23R mittels HmIL-23-Fc aus dem Überstand und der Detektion durch einen Western Blot erfolgte der Nachweis, dass alle IL-23R Varianten, außer die Variante mSD4 vergleichbar gut geschnitten wurden, wie der IL-23R-Wildtyp. Bei den Varianten mSD1, mSD2 und mSD3 konnte nach der Stimulation mit PMA eine erhöhte Menge sIL-23R im Überstand detektiert werden. Nur bei der Variante mSD4 konnte weder nach der Stimulation mit DMSO noch nach der Stimulation mit PMA, sIL-23R im Überstand detektiert werden (s. Abb. 3.13 A). Es war zu erwarten, dass die Variante mSD4 nicht mehr prozessiert wird, weil diese keine Stalkregion mehr besitzt. Als Ladekontrolle diente die Detektion des Fc-getaggen HmIL-23 Fusionsproteins, das in gleicher Menge für die Immunopräzipitation zu den Überständen gegeben wurde (siehe Abbildung 3.13 A).

Die mSD3 Deletionsvariante besteht nur noch aus einer Stalkregion mit den Aminosäuren SQTVSQV. Diese Deletionsvariante ist die Variante mit der kürzesten Stalkregion, die noch geschnitten wird. Dadurch kann vermutet werden, dass die Schnittstelle von ADAM17 in der Stalkregion des IL-23R zwischen den Aminosäuren S₃₃₆-V₃₄₂ liegen muss. Dies ist sehr ungewöhnlich, weil die Schnittstelle der ADAM Protease normalerweise nah an der Membran liegt. So befindet sich die Schnittstelle des IL-6R nur 10 Aminosäuren von der Transmembrandomäne entfernt (Müllberg et al. 1993; Baran et al. 2013).

Um auszuschließen, dass die verminderte Detektion des sIL-23R durch eine verringerte Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche ausgelöst wird, wurde die Oberflächenexpression der Deletionsvarianten durch eine durchflusszytometrische Analyse bestätigt. Hierfür wurden die Rezeptoren mit den entsprechenden Antikörpern markiert und im Anschluss analysiert.

3 Ergebnisse

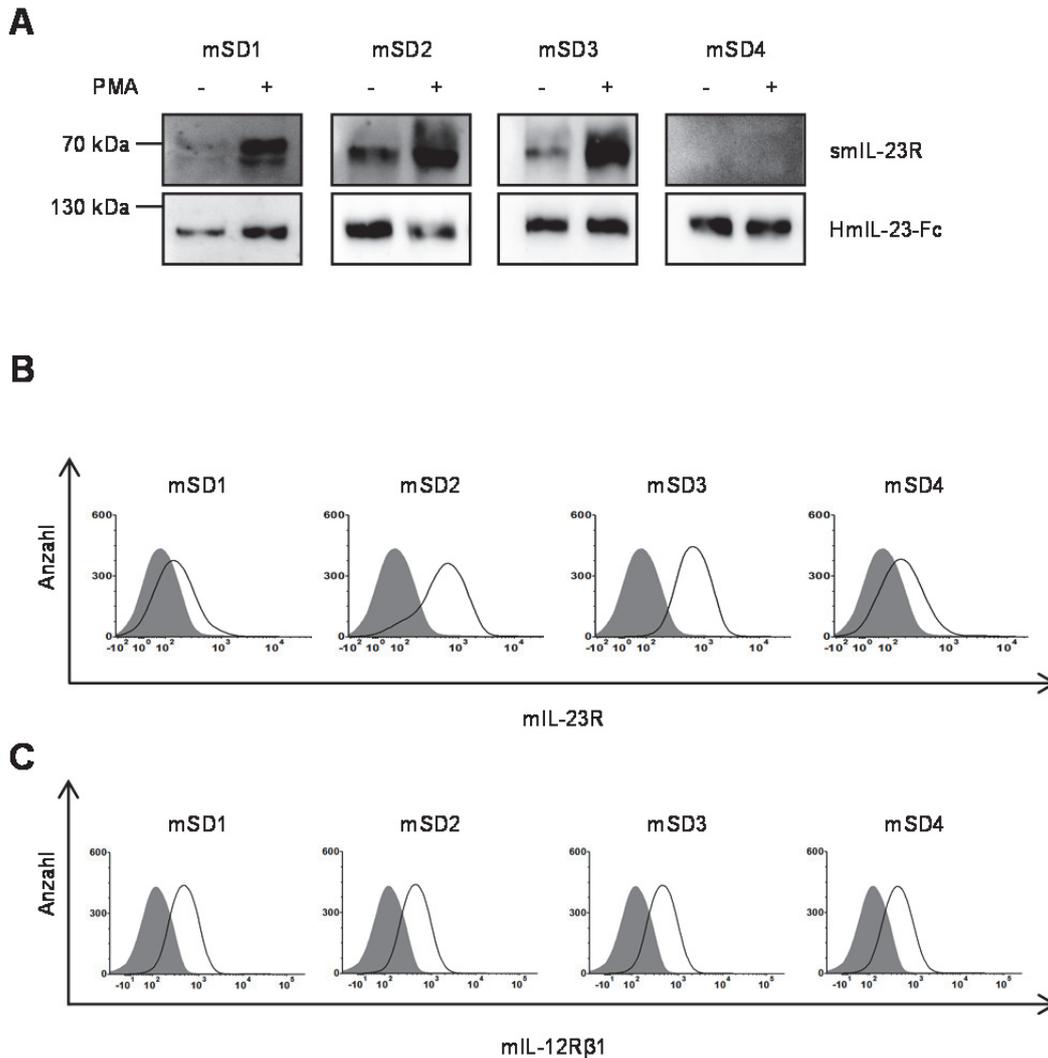


Abbildung 3.13: Identifikation der proteolytischen ADAM17 Schnittstelle im murinen IL-23R. (A) Die Experimente, zur Untersuchung der murinen IL-23R Stalkvarianten (Erläuterung Abbildung 3.11) und die Detektion des sIL-23R wurden wie in Abbildung 3.8 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden für 2 h mit DMSO (-) oder PMA (+) stimuliert. Außerdem ist, wie in Abbildung 3.6 beschrieben, die Oberflächenexpression des IL-23R (B) und des IL-12R β 1 (C) dargestellt. Gezeigt wird je ein repräsentativer Western Blot aus drei unabhängigen Experimenten. Die Analyse der Oberflächenexpression am Durchflusszytometer wurde einmal durchgeführt.

In Abbildung 3.13 B ist die Expression der Rezeptorvarianten (unausgefülltes Histogramm) im Vergleich zu untransfizierten Ba/F3-gp130-Zellen (ausgefülltes Histogramm) zu sehen. Alle Varianten, außer mSD1 und mSD4 werden ähnlich stark auf der Oberfläche exprimiert, wie der Wildtyp (Abb. 3.6). Somit bestätigt die Analyse der Oberflächenexpression, dass die verringerte Menge von sIL-23R im Überstand auf ein reduziertes *Shedding* und nicht auf eine verringerte Proteinexpression auf der Zelloberfläche zurückzuführen ist. Selbst wenn die Expression einer Rezeptorvariante auf der Zelloberfläche

3 Ergebnisse

verringert ist (mSD1), wird der IL-23R trotzdem noch in einer für den Western Blot detektierbaren Menge freigesetzt. Die Expression des Co-Rezeptors IL-12R β 1 ist in Abbildung 3.13 C dargestellt und auf allen Zellen nachweisbar.

Dadurch konnte für den murinen IL-23R die Schnittstelle von ADAM17 auf den Stalkbereich zwischen den Aminosäuren S₃₃₆-V₃₄₂ eingegrenzt werden. Der humane IL-23R wird ebenfalls nach einer Stimulation mit PMA durch ADAM17 prozessiert (s. Abb. 3.8). Daher soll durch ein Alignment zwischen der murinen und humanen IL-23R Stalkregion und mit Hilfe der humanen Stalkdeletionsvarianten die Schnittstelle analysiert werden.

3.2.8 Eingrenzung der proteolytischen Schnittstelle im humanen IL-23R

Ein Alignment der Stalkregion des murinen und humanen Rezeptors zeigt, dass die Stalkregion nur aus 42% identischen und aus 65,8% ähnlichen Aminosäuren aufgebaut ist, wohingegen die Gesamthomologie der Rezeptoren bei 67% liegt. Damit ist die Stalkregion vergleichsweise schlecht konserviert. Interessanterweise hat die Region S₃₃₆-V₃₄₂ des murinen IL-23R, in der die Schnittstelle von ADAM17 eingegrenzt wurde (Pfeile und Klammer Abb. 3.14), eine 71%ige Homologie zum humanen IL-23R. Die hohe Konservierung könnte darin begründet sein, dass das *Shedding* im hIL-23R in der gleichen Region erfolgt (s. Abb. 3.14).

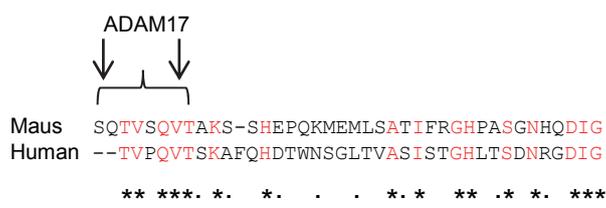


Abbildung 3.14: Alignment der murinen und humanen Stalkregion des IL-23R. Die Stalkregion des murinen und humanen IL-23R besteht aus 42% identischen und 65,8% ähnlichen Aminosäuren. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern markiert (*, rot), ähnliche Aminosäuren, die die gleiche Ladung tragen wurden mit einem Doppelpunkt (:) und ähnliche Aminosäuren unterschiedlicher Ladung mit einem Punkt (.) markiert. Außerdem ist die Schnittregion von ADAM17 im murinen IL-23R markiert (Klammer und Pfeile).

Um diese Vermutung zu überprüfen wurde das Verhalten zwischen dem humanen IL-23R und dem humanen ADAM17 untersucht. Hierfür wurden HEK293-Zellen, die humanes ADAM17 endogen exprimieren, mit Expressionsplasmiden, die die humanen IL-23R

3 Ergebnisse

Stalkdeletionsvarianten (Abb. 3.11) enthalten, transfiziert. Transfizierte HEK293-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit gleicher Zellzahl für 2 h mit PMA stimuliert. Der generierte Überstand wurde wie in 2.2.3.6 beschrieben geerntet und der lösliche Rezeptor mit HmIL-23-Fc präzipitiert.

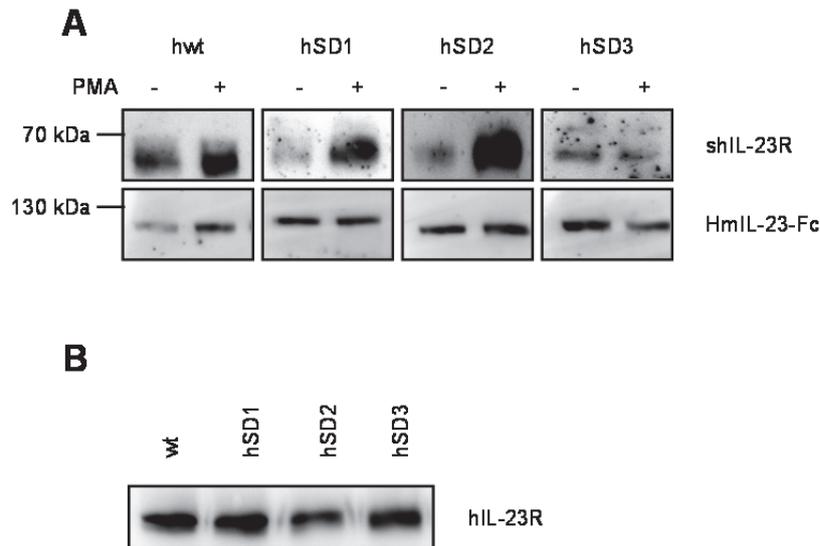


Abbildung 3.15: Proteolytische Spaltung des humanen IL-23R in HEK293-Zellen. (A) HEK293-Zellen wurden mit den verschiedenen Stalkdeletionsvarianten des humanen IL-23R transient transfiziert und nach 48 h bei gleicher Zellzahl mit DMSO (-) oder PMA (+) für 2 h stimuliert. Der lösliche Rezeptor wurde, wie in Abbildung 3.8 beschrieben, aus dem Überstand gewonnen und analysiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis des HmIL-23-Fc. (B) Die Expression des membranständigen Rezeptors wurde für alle Varianten in Zellysaten nachgewiesen. Exemplarische Blots aus drei unabhängigen Experimenten.

In der Abbildung 3.15 A ist zu erkennen, dass durch eine PMA-Stimulation der hIL-23R Wildtyp und die IL-23R-Stalkdeletionsvarianten hSD1 und hSD2 vermehrt in den Überstand freigesetzt werden. Das PMA-induzierte *Shedding* des IL-23R wird durch ADAM17 vermittelt. Deshalb wird gezeigt, dass humanes ADAM17 den hIL-23R Wildtyp und die IL-23R-Stalkdeletionsvarianten hSD1 und hSD2 von der Oberfläche schneidet, aber die Variante hSD3 gar nicht prozessiert. Die detektierten Banden auf dem Blot der hSD3 Varianten sind gleich starke Signale, daher kommt es bei der hSD3 Variante zu keiner erhöhten Konzentration des sIL-23R im Überstand und somit auch nicht zum PMA-induzierten *Shedding*. Als Ladekontrolle und Nachweis der biologischen Aktivität des sIL-23R fungierte wiederum das Fc-getaggte HmIL-23 Protein. Die vergleichbare IL-23

Rezeptorexpression in den transfizierten Zellen, wurde durch eine Analyse der Lysate auf einem separaten Blot bestätigt (s. Abb. 3.15 B).

Zusammenfassend wurde der Nachweis erbracht, dass humanes ADAM17 in transfizierten HEK293-Zellen den Wildtyp und die Deletionen hSD1 und hSD2 schneidet. Somit sollte im humanen IL-23R die Schnittstelle im Bereich T₃₂₃-N₃₃₃ liegen. Durch die große Sequenzhomologie des humanen und murinen IL-23R in der putativen Spaltregion des mIL-23R, liegt die Vermutung nahe, dass auch im hIL-23R die gleiche Schnittstelle wie im murinen IL-23R verwendet wird. Durch den Sequenzvergleich bleiben nur noch die Aminosäuren TV-QVT in der Schnittstelle des mIL-23R übrig, die auch im humanen IL-23R vorhanden sind. Diese Aminosäuren werden im folgenden Abschnitt weiter analysiert.

3.2.9 Mutation der putativen, proteolytischen Schnittstelle im murinen IL-23R

Auch wenn ADAM17 keine Konsensussequenz bezüglich der Spaltregion der Substrate besitzt, bevorzugt es doch eine bestimmte Abfolge von Aminosäuren. Eine Heatmap der bevorzugten Aminosäuren ist in Abbildung 3.16 dargestellt. ADAM17 spaltet bevorzugt in Sequenzabschnitten, in denen nach der Spaltstelle ein Valin folgt (Tucher et al. 2014).

3 Ergebnisse

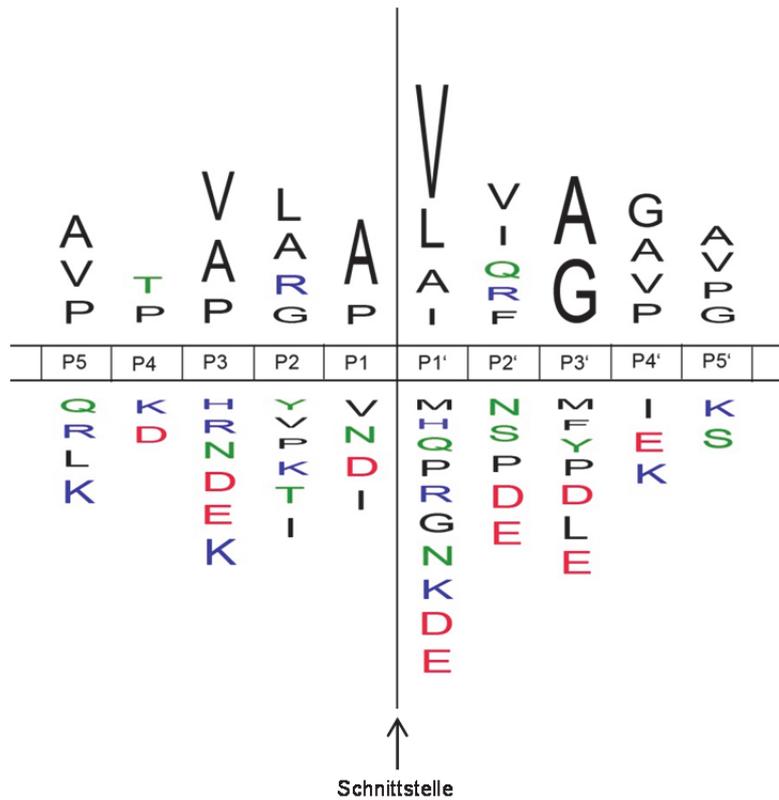


Abbildung 3.16: Heatmap der bevorzugten Spaltungssequenz von ADAM17. Dargestellt sind die Aminosäuren, die vor und hinter einer bevorzugten Schnittstelle von ADAM17 liegen. Die schwarze Linie symbolisiert die Schnittstelle. Je größer der Buchstabe ist, desto eher wird eine Schnittstelle mit dieser Aminosäure bevorzugt (oberhalb der Positionsangabe) oder benachteiligt (unterer Bereich). P1-P5: Positionen vor der Schnittstelle, P1'-P5': Positionen hinter der Schnittstelle. Schwarze Buchstaben: unpolare Aminosäuren, grüne Buchstaben: polare Aminosäuren, rote Buchstaben: saure Aminosäuren, blaue Buchstaben: basische Aminosäuren. Abbildung modifiziert nach (Tucher et al. 2014).

In der Spaltregion des murinen Rezeptors wurden zwischen den Aminosäuren S₃₃₆ und V₃₄₂ zwei Valine identifiziert. Das erste ist V₃₃₉ (TV₃₃₉) und das andere V₃₄₂ (QV₃₄₂). Diese Valine wurden entweder einzeln oder zusammen gegen Asparaginsäure ausgetauscht, welches die unvorteilhafteste Aminosäure in der Position P1' für ADAM17 ist. Durch diesen Austausch sollte das *Shedding* verhindert, aber die Struktur des Rezeptors nicht verändert werden.

Der Aminosäureaustausch erfolgte über eine *site-directed mutagenesis* PCR. Hierbei wurde für den Austausch V339D die Primer „mIL23R TV-TDf“ und „mIL23R TV-TDr“ verwendet. Der Austausch V342D erfolgte durch die Primer „mIL23R QV-QDf“ und „mIL23R QV-QDr“. Im dritten Ansatz wurden beide Aminosäuren gleichzeitig ausgetauscht. Für diese PCR wurden die Primer „IL23R beide fw“ und „IL23R beide re“ verwendet.

3 Ergebnisse

Die PCR wurde wie im Abschnitt 2.2.1.9 beschrieben angesetzt und durchgeführt. Nach der PCR erfolgte eine Behandlung mit *DpnI* über Nacht bei 37°C, wodurch das Template abgebaut wurde.

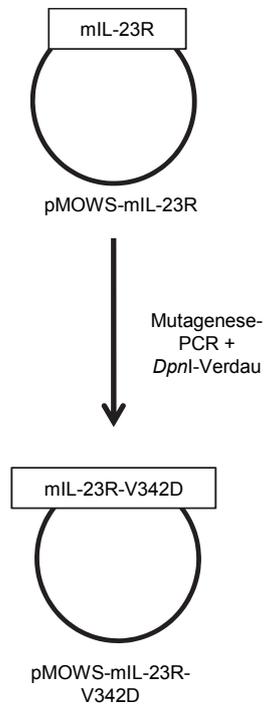


Abbildung 3.17: Klonierung der kodierenden Plasmide, für die IL-23 Rezeptoren mit Mutationen in der putativen Schnittstelle. Weitere Erläuterungen finden sich in 3.2.9. Verwendete Primer: „mIL23R QV-QD f und r“. Der erhaltene Vektor wurde pMOWS-mIL-23R-V342D genannt. Die Mutationen V339D und V339D,V342D wurden analog kloniert und die entsprechenden Vektoren als pMOWS-mIL-23R-V339D bzw. pMOWS-mIL-23R-V342D,V339D bezeichnet.

Die erhaltenen pMOWS-Plasmide wurden in *Escherichia coli* transformiert. Eine schematische Darstellung der Klonierung ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Die entsprechenden Mutationen wurden durch Sequenzierungen der Plasmide pMOWS-mIL-23R-V342D, pMOWS-mIL-23R-V339D und pMOWS-mIL-23R-V342D,V339D bestätigt. Die erstellten Plasmide wurden dafür genutzt um Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-Zellen stabil zu transduzieren.

3.2.10 Durch spezifische Aminosäureaustausche im IL-23R wird das *Shedding* des IL-23R reduziert

Für die Analyse, ob der Austausch der Aminosäuren V339D und V342D einen Effekt auf das *Shedding* des murinen IL-23R hat, wurden Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-Zellen stabil mit den Plasmiden pMOWS-mIL-23R-V342D, pMOWS-mIL-23R-V339D und pMOWS-mIL-23R-V342D,V339D transfiziert (2.2.3.4). Die Oberflächenexpression der mutierten IL-23-Rezeptoren wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers untersucht (2.2.2.1). Die Expression aller IL-23 Rezeptorvarianten und der Co-Rezeptor mIL-12R β 1 wurden auf der Zelloberfläche nachgewiesen (s. Abb. 3.18 A unausgefüllte Histogramme). Als Kontrolle dienten Ba/F3-gp130-Zellen (s. Abb. 3.18 A ausgefüllte Histogramme). Die Funktionalität der IL-23-Rezeptoren wurde durch einen Proliferationsassay untersucht. Durch die Zugabe von Hyper-IL-6 oder HmIL-23-Fc wurden die Zellen stimuliert, so dass diese proliferierten. Die Reaktion der Zellen auf HmIL-23-Fc bestätigt, dass die IL-23 Rezeptoren trotz der Mutationen funktionsfähig sind und die Struktur des IL-23 Rezeptors nicht essentiell gestört wurde (s. Abb. 3.18 B). Die Stimulation mit Hyper-IL-6 diente als Positivkontrolle für den Proliferationsassay. Die stabil transduzierten Ba/F3-gp-130-IL-12R β 1-Zellen exprimieren immer das Protein gp130 und sind dadurch responsiv gegenüber Hyper-IL-6 (Fusionsprotein aus sIL-6R und IL-6).

3 Ergebnisse

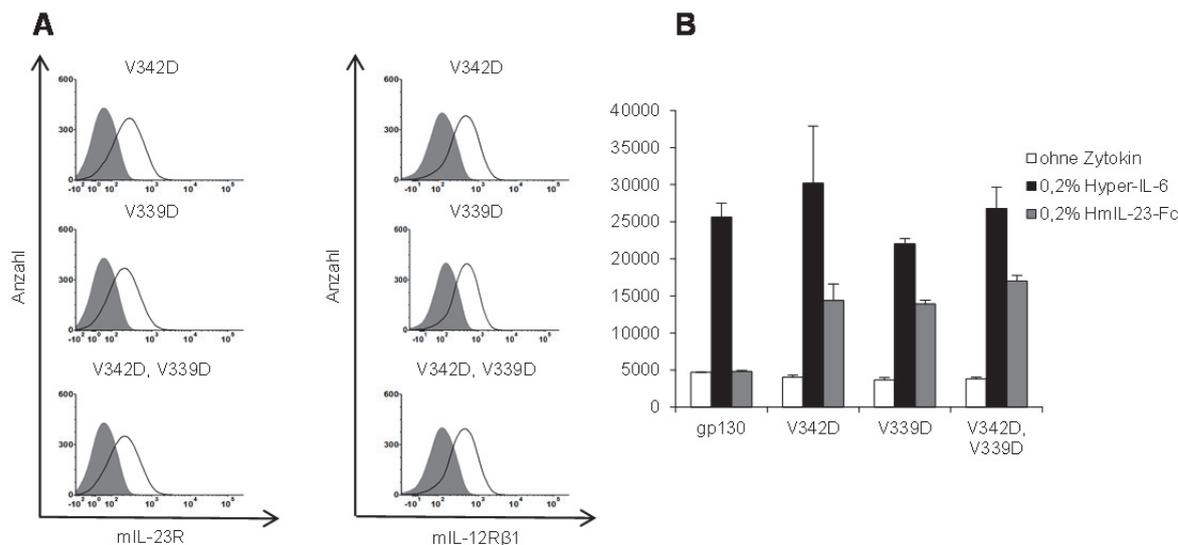


Abbildung 3.18: Analyse der IL-23R-Punktmutation in der putativen ADAM17 Schnittstelle. (A) Die Oberflächenexpression der mutierten IL-23 Rezeptoren (Erläuterung Abschnitt 3.2.9) wurde wie in Abbildung 3.6 beschrieben durchgeführt. Die Oberflächenexpression der mutierten murinen IL-23 Rezeptoren (IL-23R-V342D, IL-23R-V339D, IL-23R-V342D,V339D) wurde durch eine durchflusszytometrische Analyse nachgewiesen. (B) Die biologische Aktivität der mutierten IL-23R wurde durch einen Proliferationsassay bestätigt. Die Zellen wurden mit 0,2% Hyper IL-6 (schwarz), 0,2% HmIL-23-Fc (grau) aus konditionierten Zellkulturüberständen oder ohne Zytokin (weiß) stimuliert. Die Standardabweichung wurde aus drei Werten eines Versuches berechnet.

Um das *Shedding* der mutierten Rezeptoren zu untersuchen wurden $1,2 \cdot 10^6$ Ba/F3-gp-130-IL-12R β 1-Zellen, die einen der mutierten IL-23 Rezeptoren oder den Wildtyp des murinen IL-23R stabil exprimieren, ausgesät und für 2 h mit PMA stimuliert. Die Überstände wurden gleichzeitig geerntet, immunopräzipitiert und im Western Blot analysiert. Hierbei wurde gezeigt, dass die mutierten IL-23R-Varianten zwar noch gespalten werden, aber dass das *Shedding* sowohl bei der Stimulation mit PMA (+), als auch konstitutiv (-), deutlich schwächer war als bei dem Wildtyp IL-23R (s. Abb. 3.19 A). Die analysierten Zellen wurden lysiert, 10 μ l dieses Lysates auf dem gleichen Western Blot aufgetragen und in einer zweiten Reaktion visualisiert. Hierbei wurde bestätigt, dass die Expressionsrate der Rezeptoren in allen Ansätzen vergleichbar war (s. Abb. 3.19 A rechts). Die densitometrische Analyse der Western Blots dreier biologisch unabhängiger Experimente (wie in Abbildung 3.19 A dargestellt) zeigt, dass nach der PMA-Stimulation (P2) der relative Anstieg des löslichen IL-23R im Überstand, verglichen mit der jeweiligen DMSO-Kontrolle (D2), bei allen Mutationen ungefähr gleich ist (graphisch nicht dargestellt). Beim gleichzeitigen Austausch beider Aminosäuren (V339D,V342D D2 zu P2), kommt es zu einem $4,53 \pm 1,85$ fachen

3 Ergebnisse

Anstieg des löslichen IL-23R. Bei dem Austausch einer einzelnen Aminosäure ist der Anstieg etwas geringer (V342D $2,26 \pm 0,56$ facher, V339D $3,02 \pm 2,087$ facher Anstieg).

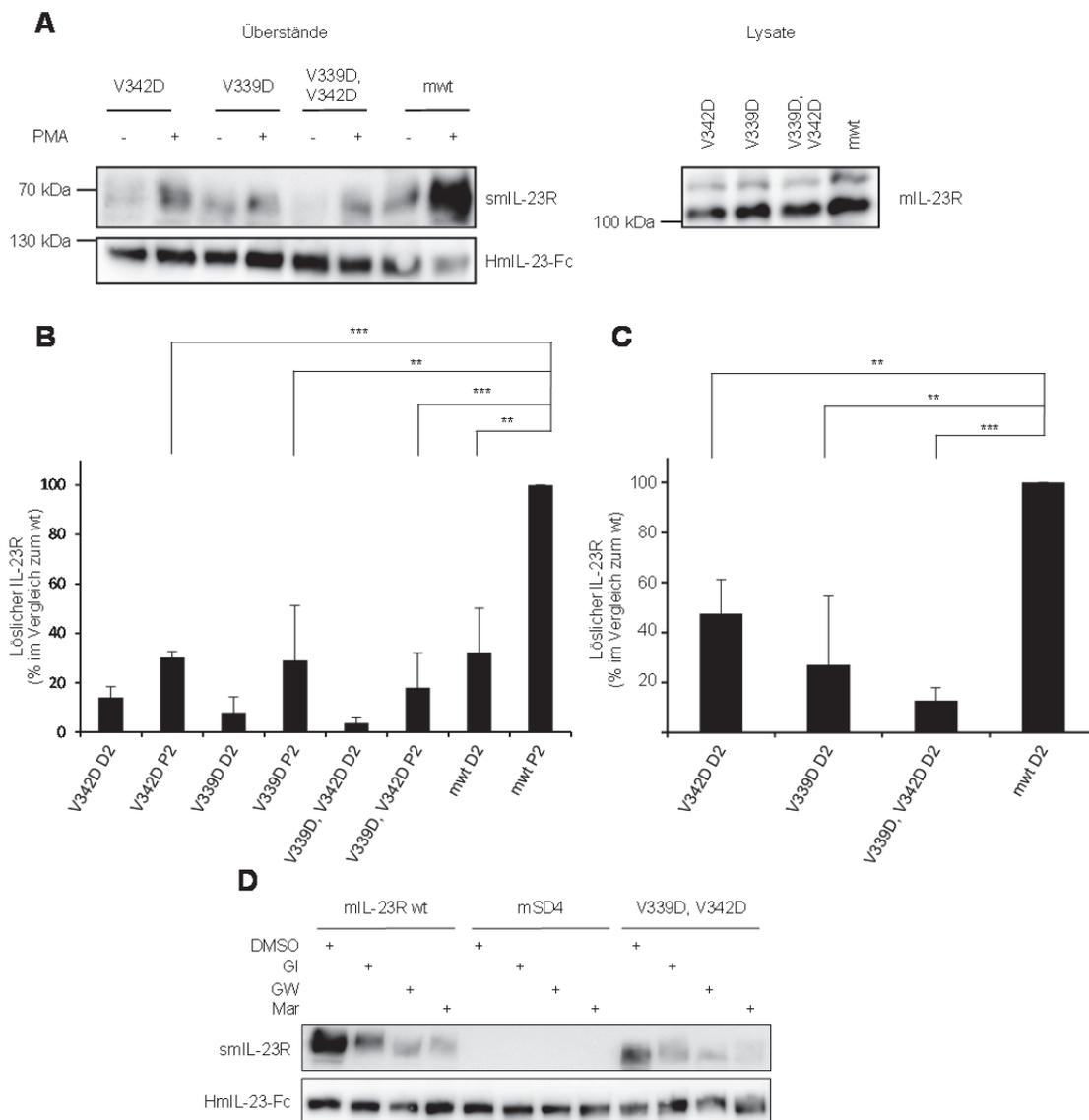


Abbildung 3.19: Reduktion des *Sheddings* durch Mutationen der putativen ADAM17 Schnittstelle im IL-23R. (A) Gleiche Zellzahlen stabil transduzierter Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R (V342D, V339D, V339D,V342D, wt) Zellen wurden für 2 h mit PMA (+) oder DMSO (-) stimuliert. Der Überstand wurde, wie in Abbildung 3.8 beschrieben, präzipitiert und analysiert. Die verwendeten Zellen wurden lysiert und 10 μ l des Lysates auf dem gleichen Western Blot aufgetragen, aber in einer zweiten Reaktion visualisiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus drei biologisch unabhängigen Experimenten. (B) Graphische Darstellung der densitometrischen Analyse der Western Blots aus den drei Wiederholungen. Die Intensität der einzelnen Banden wurde im Verhältnis zur Wildtyp Kontrolle, die nach der Stimulation mit PMA (P2) auf 100% gesetzt wurde, berechnet. (C) Desitometrische Analyse des konstitutiven *Sheddings* im Verhältnis zur Wildtyp Kontrolle (D2). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Die Signifikanz wurde, wie im Abschnitt 2.2.4 beschrieben, bestimmt. (D) Für das konstitutive *Shedding* wurden stabil transduzierte Ba/F3-gp130-mIL-12R β 1-mIL-23R (wt, mSD4, V339D,V342D) für 24 h bei 37°C inkubiert und der Überstand wie in Abbildung 3.8 beschrieben, präzipitiert und analysiert. Das *Shedding* wurde durch GI254023X (3 μ M, GI), GW280264X (3 μ M, GW) und Marimastat (10 μ M, Mar), welche zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 8 h zu den Zellen gegeben wurden, inhibiert.

3 Ergebnisse

Die Wildtyp Variante des IL-23R (mwt D2 zu P2) zeigte nach der Stimulation mit PMA einen Anstieg von $3,71 \pm 1,68$ ($p= 0,003$), der ähnlich stark ist, wie bei den Mutationen.

Zusätzlich wurden die densitometrischen Mittelwerte der Wildtyp-Kontrolle nach der Stimulation mit PMA auf 100% gesetzt und alle anderen Werte entsprechend berechnet (Abbildung 3.19 B). Durch diese Analyse wurde festgestellt, dass der absolute Anstieg des mutierten sIL-23R nach reduziert ist. Die Mutation beider Aminosäuren (V342D und V339D) reduzierte das PMA-induzierte *Shedding* um $82,04 \pm 14,07\%$ ($p= 0,001$). Einzeln für sich verringern beide Mutationen auch das *Shedding*. Die Mutation V342D reduziert das *Shedding* um $69,87 \pm 2,5\%$ ($p< 0,001$) und durch die Mutation V339D wurde das *Shedding* um $70,96 \pm 22,13\%$ ($p= 0,001$) herabgesetzt. Interessanterweise wurde durch die Mutationen nicht nur das PMA-induzierte *Shedding*, sondern auch das konstitutive *Shedding* reduziert (s. Abb. 3.19 C). Durch die Mutation beider Valine wurde das konstitutive *Shedding* um $87,26 \pm 5,17\%$ ($p< 0,001$) vermindert. Das Valin V₃₃₉ scheint einen größeren Einfluss auf das konstitutive *Shedding* zu haben. Hier führte die Mutation zu einer Reduktion um $72,88 \pm 27,40\%$ ($p= 0,01$) im Gegensatz zu V₃₄₂ ($52,41 \pm 13,63\%$ ($p= 0,003$)).

Zur genauen Analyse des konstitutive *Sheddings* wurden $0,6 \cdot 10^6$ Ba/F3-gp-130-IL-12R β 1-IL-23R-Zellen (wt, mSD4, V339D, V342D) in DMEM^{+/+} mit dem entsprechendem Zytokin für 24 h bei 37°C inkubiert (2.2.3.7). Die Zellen wurden über die ganze Zeit mit GI254023X (GI, 3 μ M), GW280264X (GW, 3 μ M), Marimastat (Mar, 10 μ M) oder DMSO inkubiert. Nach 4 h und 8 h wurden die Inhibitoren erneut zu den Zellen gegeben. Die Überstände wurden abgenommen, präzipitiert und im Western Blot analysiert. Dabei wurde gezeigt, dass die Wildtypvariante des mIL-23R und die Doppelmutante (V339D, V342D) konstitutiv geschnitten werden. Die Variante mSD4, die auch bei dem PMA-induziertem *Shedding* nicht gespalten wurde, wird auch nicht konstitutiv prozessiert. Durch die verwendeten Inhibitoren wurde das konstitutive *Shedding* unterdrückt, wodurch der Nachweis erfolgte, dass auch bei den IL-23R-Punktmutanten das konstitutive *Shedding* durch ADAM10 vermittelt wird, weil dieses *Shedding* durch den ADAM10 spezifischen Inhibitor GI254023X inhibiert wurde (s. Abb. 3.19 D).

Die Einflüsse auf das konstitutive *Shedding* lassen vermuten, dass durch die Mutation auch das ADAM10-vermittelte *Shedding* beeinflusst wird. Somit nutzen ADAM10 und ADAM17 vermutlich die gleiche Schnittstelle oder strukturelle Besonderheiten in der Stalkregion, um den IL-23R zu spalten.

Für das *Shedding* ist nicht nur die Stalkregion essentiell, in der das membrangebundene Protein gespalten wird, sondern auch die Domänen, die distal von der Schnittstelle liegen. Daher sollen im folgenden Abschnitt die Regionen des IL-23R detektiert werden, die für die Interaktion mit ADAM17 verantwortlich sind.

3.2.11 Interaktion von ADAM17 und IL-23R

In den bisherigen Abschnitten wurde nachgewiesen, dass sowohl der murine, als auch der humane IL-23R von ADAM17 gespalten wird. Die Interaktion der Protease mit seinen Substraten wurde nachfolgend mit Hilfe des Nanotrap-Systems (s. Abschnitt 2.2.2.6) untersucht. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit dem murinem Fusionsprotein ADAM17-GFP und den IL-23 Rezeptorvarianten co-transfiziert, nach 48 h lysiert und immunopräzipitiert. Je 25 µl der Präzipitate wurden mittels Western Blot analysiert. Durch den Nachweis mit den spezifischen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass sowohl der murine, als auch der humane IL-23R mit murinem ADAM17 interagiert (s. Abbildung 3.20 A und B). Außerdem wurde die Interaktion der proteolytisch, resistenten Variante mSD4 des murinen IL-23R mit ADAM17-GFP nachgewiesen. Die verwendeten Rezeptoren wurden in der präzipitierten Fraktion (B= *Bound*) nur in Anwesenheit mit ADAM17-GFP nachgewiesen (s. Abbildung 3.20 A + B).

Um herauszufinden, welche Region des IL-23R für die Interaktion mit ADAM17 verantwortlich ist, wurden lösliche Rezeptorvarianten (s. Abbildung 3.20 C) des murinen IL-23R, die nur noch aus den einzelnen Domänen und einer Fc Domäne eines humanen IgG Antikörpers bestanden, zusammen mit murinem ADAM17-GFP in HEK293-Zellen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden diese Varianten mit Hilfe des Nanotrap-Systems präzipitiert und analysiert. Die lösliche Rezeptorvariante smIL-23R-Fc (As 24-315) besitzt keine intrazelluläre, Transmembran- oder Stalkregion und besteht nur noch aus den extrazellulären Domänen D1-D3. Ausgehend von dieser Variante wurden die weiteren Varianten, smIL-23R-D1 D2-Fc (As 24-217), smIL-23R-D2 D3-Fc (As 122-315) und smIL-23R-D1-Fc (As 24-123) in der AG Scheller kloniert (Schröder et al. 2015). Die Klonierungsbeschreibung der Varianten smIL-23R-D2-Fc (As 122-217) und smIL-23R-D3-Fc (As 220-315), die für diese Arbeit angefertigt wurden, finden sich im Abschnitt 7.3.2.

3 Ergebnisse

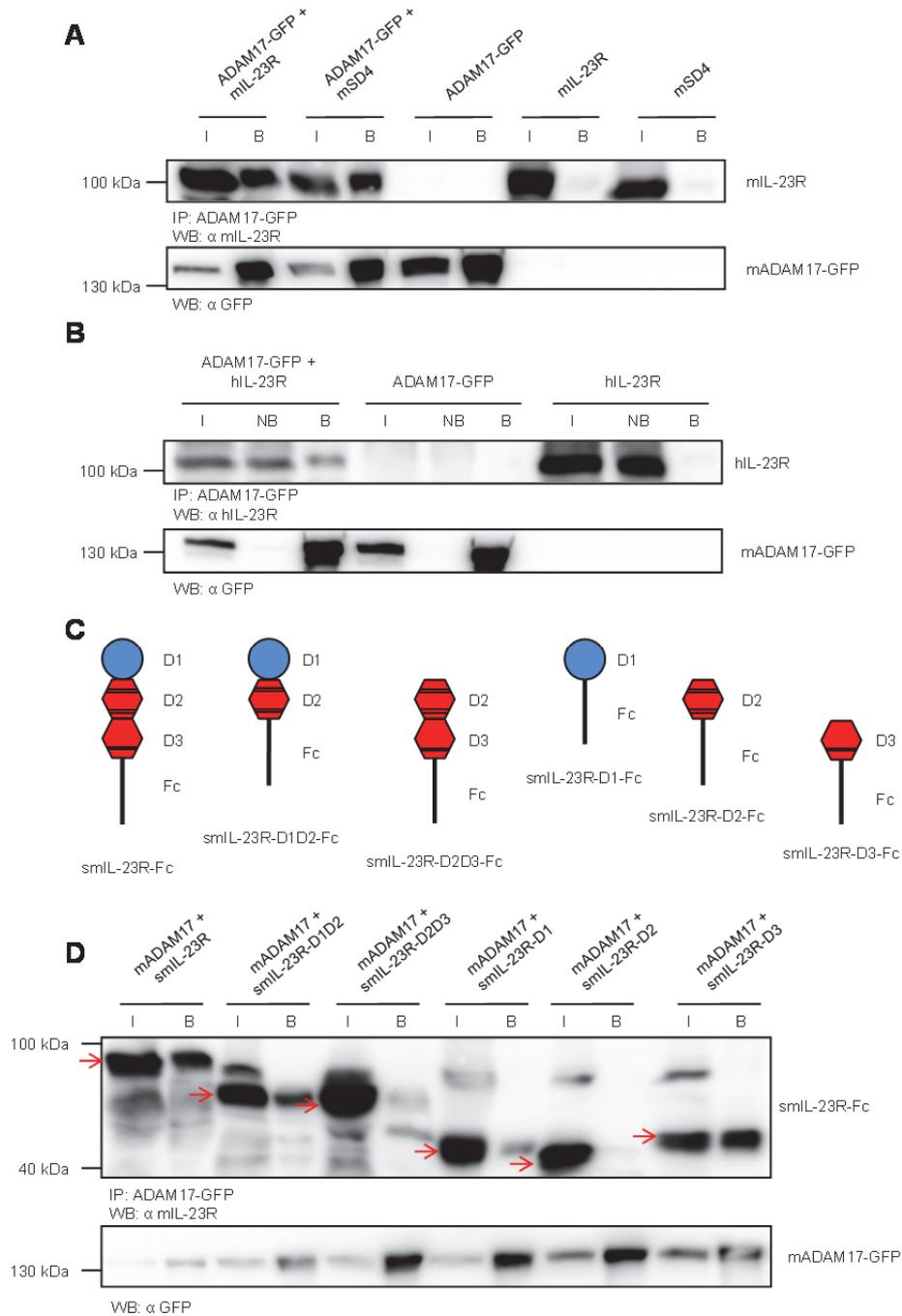


Abbildung 3.20: Interaktion von mADAM17 und IL-23R. (A) Cotransfektion oder Einzeltransfektion von mIL-23R Varianten und ADAM17-GFP in HEK293-Zellen. Die Zellen wurden lysiert und ADAM17-GFP mit dem Nanotrap-System (s.2.2.2.6) präzipitiert. Je 25 µl der Präzipitate wurden aufgetragen und im Western Blot gegen IL-23R und ADAM17-GFP nachgewiesen. (B) Der Nachweis der Interaktion von ADAM17-GFP mit dem humanen IL-23R wurde auf die gleiche Weise durchgeführt. (C) Lösliche Rezeptorvarianten des murinen IL-23R. Hergestellt von D. Floss und J. Schröder. Die Varianten smIL-23R-D2-Fc und smIL-23R-D3-Fc wurden im Laufe dieser Arbeit kloniert. D1-D3: Domänen des IL-23R, der Fc-Tag wird als schwarzer Strich dargestellt. (D) Lösliche Rezeptorvarianten des murinen IL-23R wurden mit ADAM17-GFP in HEK293-Zellen cotransfiziert und die Interaktion mit ADAM17-GFP wie in A beschrieben nachgewiesen. Pfeile zeigen die gesuchten Proteine. Gezeigt sind repräsentative Blots von jeweils drei biologisch, unabhängigen Experimenten. I= Input, NB= Non-Bound B= Bound, IP: Immunopräzipitiert mit GFP, WB: Western Blot und nachgewiesenes Protein.

3 Ergebnisse

Es wurden die *Input* (I) und *Bound* (B)-Fraktion der Immunopräzipitation nach der Transfektion und Präzipitation aller sIL-23R-Varianten auf einem Gel analysiert. Alle Blots wurden, nach der Detektion mit dem spezifischen Antikörper, gestrippt und im Anschluss mit einem GFP-Antikörper analysiert. Dies diente der Ladekontrolle und als Nachweis, dass die Immunopräzipitation funktioniert hat. Dabei wurde eine Co-Immunopräzipitation von smIL-23R-Fc mit ADAM17-GFP nachgewiesen, was beweist, dass die Interaktion zwischen ADAM17-GFP und dem IL-23R durch die extrazellulären Domänen vermittelt wird und dass die restlichen Bereiche des IL-23R (Stalk, Transmembran und ICD) für eine Interaktion nicht notwendig sind. Interessanterweise, wurde für alle Varianten, außer smIL-23R-D2-Fc eine Interaktion mit ADAM17 gezeigt (Abbildung 3.20 D Pfeile). Somit sind die Domänen D1 und D3 des IL-23R für Interaktion mit ADAM17-GFP essentiell.

3.3 Identifikation des IgM Rezeptors Toso als neues Substrat für ADAM10 und ADAM17

2011 wurde in Patienten, die an Chronisch-Lymphatischer Leukämie erkrankt sind, ein lösliches Toso Protein im Serum nachgewiesen (Li et al. 2011b). Aus diesem Grund soll im folgenden Abschnitt untersucht werden, ob der IgM Rezeptor Toso auch ein Substrat für die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 ist. Daher werden verschiedene Deletionsvarianten des Rezeptors erstellt und deren Verhalten gegenüber einer PMA- oder Ionomycin-Stimulation untersucht. Das lösliche Protein soll im Zellkulturüberstand nachgewiesen und die veränderte Oberflächenexpression des IgM-Rezeptors analysiert werden. Als Inhibitoren der ADAM-Proteasen werden wieder GI254023X, welcher ADAM10 inhibiert und GW280264X, ein Inhibitor von ADAM10 und ADAM17, verwendet.

3.3.1 Konstruktion des Toso-Deletionsvarianten

Das Toso Protein (FAIM3/Fc μ R) wird hauptsächlich von Immunzellen, besonders von B- und T-Zellen, in geringen Mengen exprimiert. Initial wurden HEK293-Zellen mit dem Toso Ausgangsplasmid (pcDNA3.1-Toso-YFP) transfiziert, wodurch nur eine schwache Toso-Expression detektierbar war (nicht gezeigt). Um die Expression von Toso zu steigern und den Nachweis im Western Blot zu verbessern, wurde die kodierende DNA von Toso mit einem C-terminalen Myc-Tag und dem Signalpeptid des IL-6R versehen, von der Firma *life Technologies* (Darmstadt, Germany) für humane Zellen Codon optimiert und synthetisiert. Die Toso-kodierende DNA wurde in den pcDNA3.1-Vektor subkloniert. Hinter dem Signalpeptid des IL-6R befindet sich eine *Xba*I Schnittstelle. Diese wurde dafür genutzt um einen Flag-Tag an den N-Terminus von Toso zu klonieren. Hierfür wurden Primer erstellt (Flagtag fw und Flagtag rev), durch eine Linkerligation (s. Abschnitt 2.2.1.12) hybridisiert, im Anschluss mit *Xba*I behandelt und in pcDNA3.1-Toso ligiert.

Zur Untersuchung des *Sheddings* und der Expression des Toso-Proteins wurden verschiedene Toso-Varianten generiert. In einem Ansatz wurde die extrazelluläre Ig-Domäne deletiert (Toso Δ IG), wodurch der Rezeptor seine Funktion als IgM-Rezeptor verlieren sollte. Durch eine Deletionsvarianten (Toso Δ 50) in der Stalkregion, sollte untersucht werden, ob dieser Bereich einen Einfluss auf das *Shedding* hat und somit einen Hinweis liefern in welchem Bereich die proteolytische Schnittstelle liegt. Daher wurden 50 Aminosäuren, ausgehend von der Transmembrandomäne, deletiert. Darüber hinaus wurde im Toso Δ ICD die intrazelluläre Domäne deletiert. Das Fusionsprotein TIL6R besteht aus dem extrazellulären Teil von Toso und der Transmembran- und intrazellulären Domäne des IL-6R. Alle Varianten sind schematisch in Abbildung 3.21 dargestellt.

3 Ergebnisse

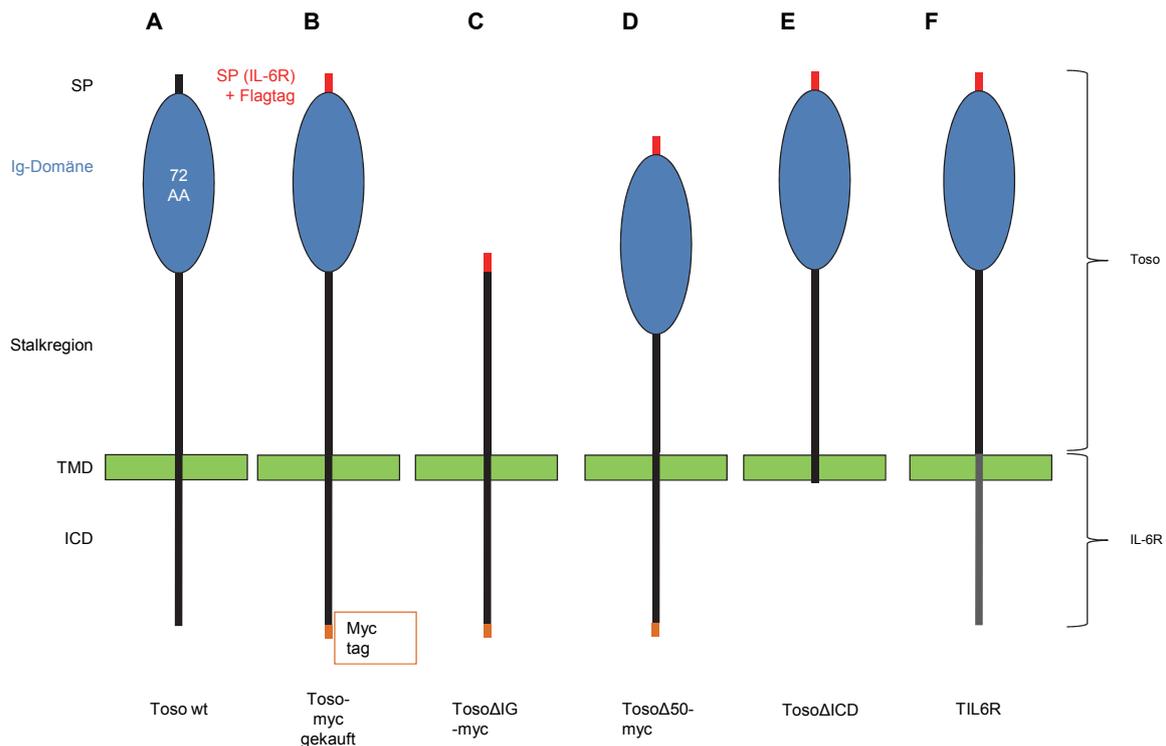


Abbildung 3.21: Struktur von Toso und den generierten Mutationen. (A) Dargestellt ist das natürlich vorkommende Toso/FAIM3/Fc μ R (Toso wt) Protein, mit einer Ig-Domäne (blau) aus 72 Aminosäuren, gefolgt von einer 145 Aminosäuren langen Stalkregion, einer einzelnen Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne (ICD). (B) Das entsprechende Plasmid wurde von *life Technologies* codonoptimiert, hergestellt und mit einem Myc Tag versehen (Toso). In C-F sind die Deletionsvarianten dargestellt, die im Laufe dieser Arbeit hergestellt wurden. (C) Es wurden die Ig-Domäne (Toso Δ IG), (D) 50 Aminosäuren in der Stalkregion, ausgehend von der TM Domäne (Toso Δ 50) und (E) die ICD (Toso Δ ICD) deletiert. (F) Als letztes wurde ein Fusionsprotein erstellt, aus dem extrazellulären Teil des Toso Proteins und der TM und ICD des IL-6R (TIL6R). Der Bereich des IL-6R ist hellgrau und mit einer Klammer markiert.

Die Expressionsplasmide der Deletionsvarianten wurden ausgehend von dem Plasmid pcDNA3.1-Toso konstruiert. Beispielhaft wird hier die Erstellung des Toso Δ IG erläutert. Mittels PCR wurde das Signalpeptid und der Bereich vor der Ig-Domäne des Toso-Proteins amplifiziert (Primer „Toso dIG1“ und „Toso dIG3“). In einer zweiten PCR wurde ein Bereich vom Ende der Ig-Domäne bis hinter einer *Bst*XI Schnittstelle vervielfältigt (Primer „Toso dIG2“ und „Toso dIG4“). Durch eine SOE-PCR (Primer „Toso dIG1“ und „Toso dIG4“) wurden die beiden erhaltenen PCR-Produkte verbunden, weil die Primer „Toso dIG2“ und „Toso dIG3“ so entworfen wurden, dass sie die Ig-Domäne flankieren und zueinander komplementäre Überhänge besitzen. Das finale PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel gereinigt und durch die Restriktionsendonuklease *Bst*XI geschnitten. Der Vektor pcDNA3.1-Toso wurde analog behandelt, dephosphoryliert, gereinigt und anschließend mit dem PCR-

3 Ergebnisse

Produkt ligiert. Der erhaltene Vektor wurde nun als pcDNA3.1-Toso Δ IG bezeichnet (s. Abbildung 3.22).

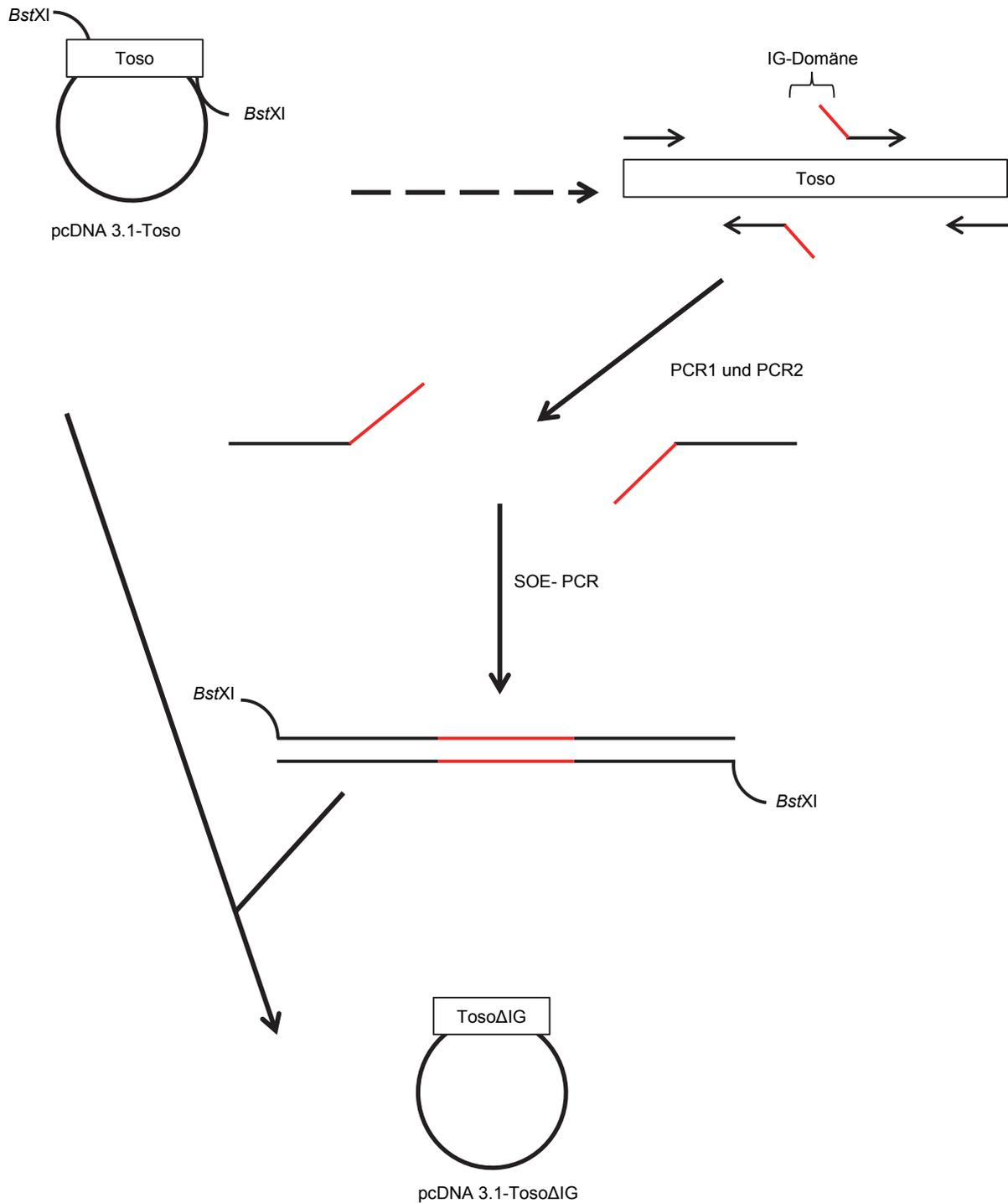


Abbildung 3.22: Klonierung von Toso Δ IG. Detaillierte Klonierungsbeschreibung in Abschnitt 3.3.1.

Für alle anderen Toso-Varianten finden sich im Abschnitt 7.3.3 entsprechende Klonierungsschemata.

3.3.2 Generierung von Toso-2A-GFP Varianten

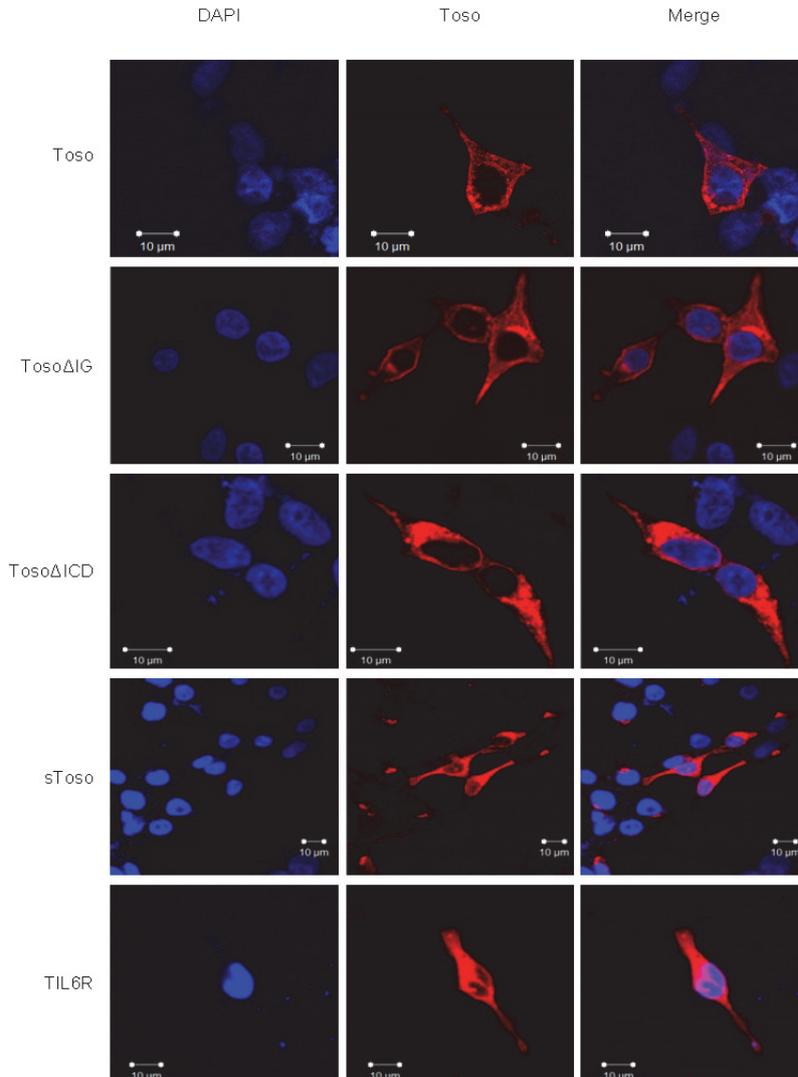
HEK293-Zellen, die mit den Toso Varianten, außer Toso Δ ICD, transient transfiziert wurden, zeigten eine leicht veränderte Morphologie und eine leicht erhöhte Sterblichkeit (nicht gezeigt). Die Expression des Toso Proteins in transfizierten HEK293-Zellen wurde durch Analysen am Durchflusszytometer und Konfokalbildern untersucht. Die Zellen wurden hierfür wie in den Abschnitten 2.2.2.1 und 2.2.2.13 beschrieben behandelt. Auf den Konfokalbildern wurde die Expression des Toso-Proteins rot und der Nukleus blau dargestellt (s. Abb. 3.23 A). In dem Histogramm des Durchflusszytometers ist die Oberflächenexpression des Toso-Proteins (schwarzes unausgefülltes Histogramm) und der Variante Toso Δ ICD (graues unausgefülltes Histogramm) dargestellt. Als Kontrolle dienen untransfizierte HEK293-Zellen (graues ausgefülltes Histogramm) (s. Abb. 3.23 B). Bei beiden Methoden wurde gezeigt, dass bei einer Transfektion von HEK293-Zellen, der Toso Rezeptor nur in einer geringen Menge auf der Oberfläche vorhanden ist, bzw. dass nicht alle Zellen das Protein gleich stark exprimieren (s. Abbildung 3.23 A + B). Auch in endogen exprimierenden Zellen ist nur ein kleiner Teil des Toso-Proteins auf der Oberfläche. Ein großer Teil befindet sich im Transgolginetzwerk (TGN) (Vire et al. 2011). In stabil transduzierten Zellen sollte die Expression höher und im Durchflusszytometer ein einzelner Peak und nicht ein Doppelpeak (s. Abbildung 3.25 B) nachweisbar sein.

Um eine höhere und gleich intensive Oberflächenexpression auf allen Zellen zu erreichen, wurden HEK293-Zellen und Ba/F3-gp130-Zellen stabil mit den Toso-Varianten transfiziert. Für eine erleichterte Detektion der Expression und Selektion stabil transfizierter Zellen wurden die Toso-Varianten in ein sich selbst spaltendes virales 2A-Peptid eingefügt (Kim et al. 2011). Die 2A-Peptidsequenz (D-V/P-E-X-N-P-G-P) wurde in Picornaviren entdeckt und erlaubt eine Spaltung von Polyproteinen in Einzelproteinen. Die 2-A-Peptide wirken co-translational und verhindern eine Peptidbindung zwischen dem letztem Glycin und Prolin, was zu einem Ribosom-Skipping und einer Peptidspaltung zwischen diesen Aminosäuren führt (Trichas et al. 2008). Der Einbau der 2A-Peptidsequenz erlaubt eine gleichmäßige Toso-

3 Ergebnisse

und GFP-Synthese, ohne einen GFP-Tag an Toso anzubringen, welches die Expression des Toso Rezeptors stören könnte.

A



B

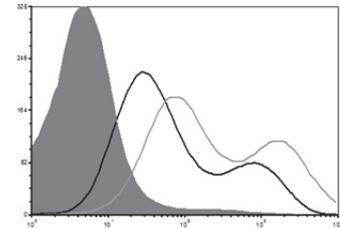


Abbildung 3.23: Oberflächenexpression der Toso-Varianten in HEK293-Zellen. (A) Bestimmung der Toso-Expression in HEK293-Zellen. Die Zellen wurden auf Coverslips ausgesät, transfiziert und nach 48 h wie in 2.2.13 beschrieben mit dem Toso Antikörper markiert. Toso ist rot und der Nukleus durch die DAPI-Färbung blau dargestellt. Exemplarische Konfokalbilder aus 2 biologisch unabhängigen Experimenten. (B) Transfizierte HEK293-Zellen wurden nach 48 h von der Platte gewaschen, mit Antikörpern markiert (Toso AK, α -maus-APC) und mit dem FACS Canto II analysiert. YFP transfizierte Zellen dienten als Kontrolle (grau ausgefülltes Histogramm). Die Expression von Toso ist als schwarzes Histogramm und Toso Δ ICD als graues Histogramm dargestellt. Die Durchflusszytometrie wurde einmal durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurde GFP mit Hilfe einer PCR aus pEGFP mit den Primern „GFP 2a ampl fw“ und „GFP 2a ampl re“ amplifiziert, gereinigt und mit den beiden Restriktionsendonukleasen *NheI* und *SacI* geschnitten. Das mIL-23R-2A-mIL-12R β 1-Plasmid

3 Ergebnisse

(AG Scheller) wurde analog behandelt, dephosphoryliert und mit dem GFP-PCR-Produkt ligiert. Das dadurch entstandene mIL-23R-2A-GFP Fusionsgen wurde durch eine Spaltung mit *EcoRV* in einen analog geschnittenen und dephosphorylierten pBluescript Vektor ligiert. Die kodierende Sequenz des IL-23R, die sich noch in dem 2A-Plasmid befand wurde anschließend durch die Toso-Varianten mit Hilfe zweier Methoden ersetzt. Einerseits wurden einige Toso-Varianten (Toso Δ ICD und TIL6R) über eine PCR (Primer: „TIL6R 486 fw“, „TIL6R 486 rev neu“ und „TdICD 486 rev neu“) amplifiziert, mit *NcoI* und *HindIII* behandelt und in den ebenfalls geschnittenen pBluescript Vektor ligiert. Andererseits wurden die Toso-Varianten (Toso, Toso Δ IG, Toso Δ 50) direkt mit *NcoI* und *HindIII* geschnitten und ligiert.

Die Toso-2A-GFP Varianten wurden mit Hilfe des Restriktionsenzym *EcoRV* geschnitten und in den mit *PmeI* behandelten und dephosphorylierten pcDNA3.1-Vektor subkloniert (s. Abbildung 3.24). Die entstandenen Plasmide wurden pcDNA3.1-Toso-2A-GFP, pcDNA3.1-Toso Δ IG-2A-GFP, pcDNA3.1-Toso Δ ICD-2A-GFP, pcDNA3.1-Toso Δ 50-2A-GFP und pcDNA3.1-TIL6R-2A-GFP genannt.

Für die retrovirale Transduktion muriner Ba/F3-gp130-Zellen, wurden die Toso-2A-GFP Varianten in pMOWS Vektoren umkloniert (Ketteler et al. 2002). Hierfür wurden die pBluescript Vektoren, die die Toso-2A-GFP Varianten enthielten, mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* geschnitten, um das gewünschte Insert mit *blunt ends* zu erhalten.

Der pMOWS-Vektor wurde wie in Abschnitt 2.2.1.6 beschrieben mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *EcoNI* behandelt und die Überhänge mit Klenow Fragment aufgefüllt. Um eine Religation zu verhindern, wurden die Enden dephosphoryliert. Nach der Ligation des Inserts mit dem Vektor wurden die entsprechenden pMOWS-Vektoren verwendet, um stabil transfizierte Ba/F3-gp130-Zellen herzustellen (s. Abschnitt 2.2.3.4). HEK293-Zellen wurden mit den entsprechenden pcDNA3.1-Vektoren transfiziert und stabil exprimierende Klone selektiert (s. Abschnitt 2.2.3.3).

3 Ergebnisse

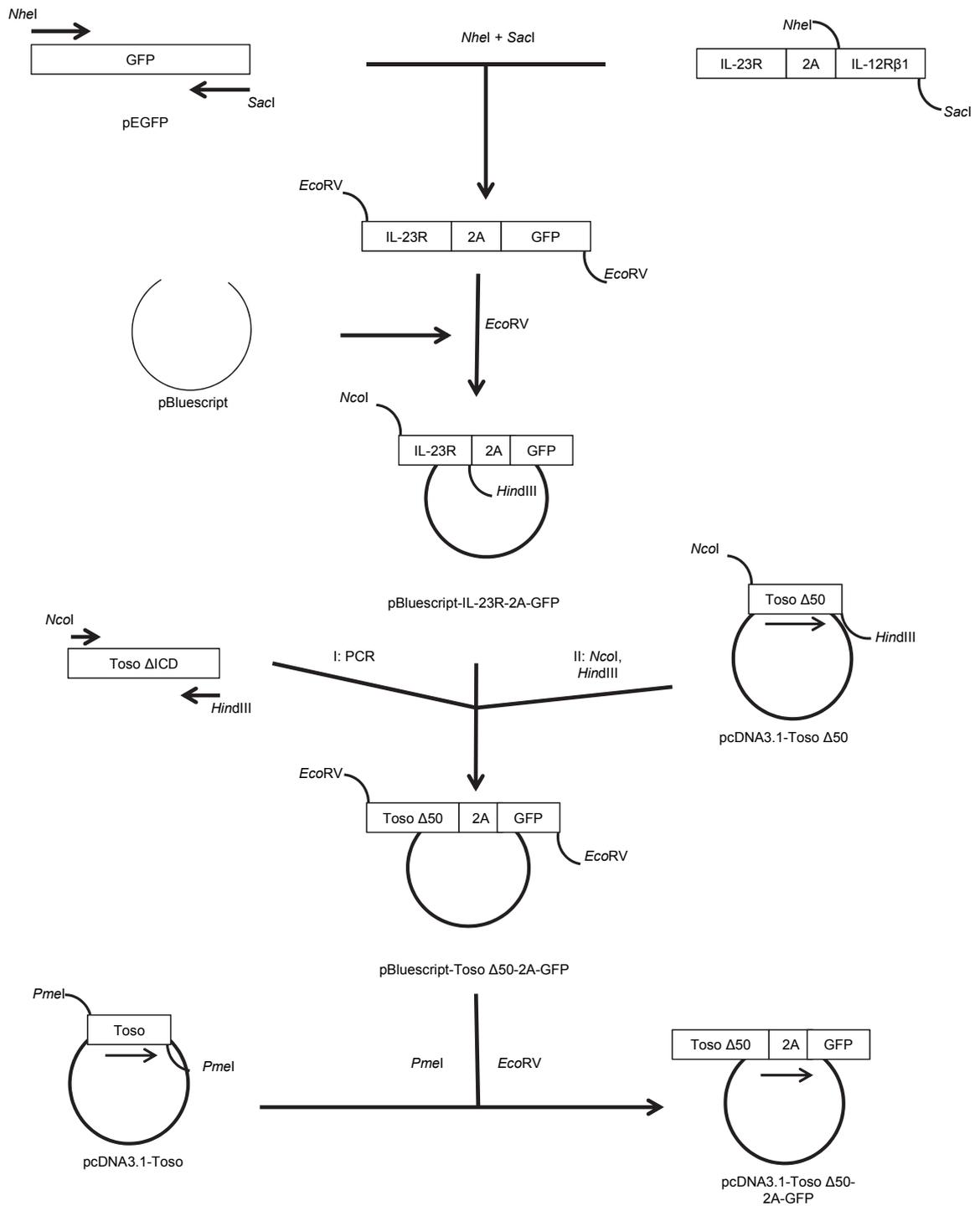


Abbildung 3.24: Klonierung der Toso-2A-GFP Varianten am Beispiel des pcDNA3.1-TosoΔ50-2A-GFP. Beschreibung der Klonierung findet sich im Abschnitt 3.3.2.

3.3.3 Generierung von stabil transfizierten Ba/F3-gp130 und HEK293-Zellen mit Toso-2A-GFP Varianten

Die erfolgreiche stabile Transfektion der verschiedenen Toso-2A-GFP Varianten in HEK293- und Ba/F3-gp130-Zellen (s. Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2) wurde auf zwei verschiedene Arten kontrolliert. Einerseits wurden stabil transfizierte Zellen bei 95°C für 10 min in Laemmli-Puffer lysiert und das erhaltene Lysat im Western Blot analysiert. Dabei wurde auf verschiedenen Blots die Expression der entsprechenden Toso-Variante in allen Zellen, bei einer Größe von 60 kDa nachgewiesen. Für die Variante Toso Δ 50 erfolgte der Nachweis des Toso-Proteins bei 50 kDa (3.25 A). Der Nachweis erfolgte auf verschiedenen Blots, weil die unterschiedlichen Toso-Varianten nicht gleich stark exprimiert wurden.

Zum anderen wurde die Oberflächenexpression der verschiedenen Rezeptorvarianten sowohl in Ba/F3-gp130- als auch in HEK293-Zellen nachgewiesen. Hierfür wurde der entsprechende Rezeptor auf den Zellen mit dem Toso spezifischen Antikörper (1:50 s. 2.1.2.1) markiert. Als Sekundärantikörper wurde ein goat anti-maus-APC Antikörper (1:100, s. 2.1.2.1) verwendet. Die Analyse bestätigte, dass alle Varianten auf der Oberfläche von Ba/F3-gp130-Zellen (s. Abb. 3.25 B unausgefülltes Histogramm) und HEK293-Zellen (s. Abb. 3.25 C unausgefülltes Histogramm) exprimiert wurden. Außerdem zeigten alle Zellen eine grüne Fluoreszenz. Als Kontrolle dienten untransfizierte Ba/F3-gp130- bzw. HEK293-Zellen (s. Abb. 3.25 B + C ausgefülltes Histogramm).

3 Ergebnisse

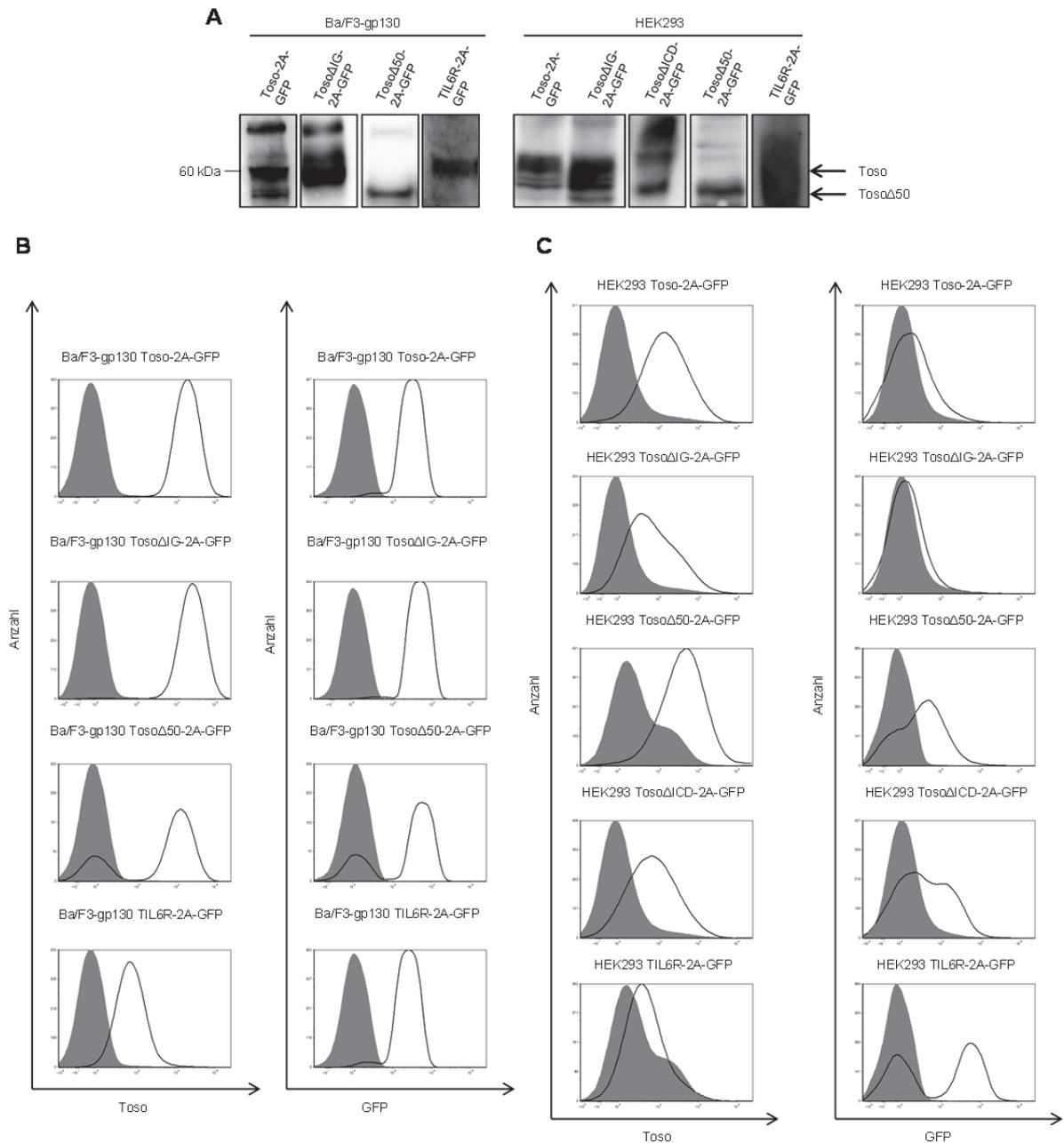


Abbildung 3.25: Expression von Toso-2A-GFP-Varianten in Ba/F3-gp130- und HEK293-Zellen. (A) Nachweis der Expression in Zelllysaten. Stabil transfizierte Zellen wurden in Laemmli-Puffer bei 95°C lysiert und die Lysate im Western Blot analysiert. Für alle Varianten wurde eine Expression auf unterschiedlichen Blots nachgewiesen. Ba/F3-gp130-Zellen (B) und HEK293-Zellen (C) wurden stabil mit den Toso-2A-GFP Varianten transfiziert und selektiert. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben für die Durchflusszytometrie vorbereitet. Als Primärantikörper wurde ein spezifischer Toso Antikörper verwendet (s. 2.1.2.1), der Sekundärantikörper war anti-Maus-APC (s. 2.1.2.1). Beide Nachweise wurden einmal durchgeführt.

Einige Zelllinien bestanden aus Mischklonen und zeigten somit Doppelpicks, besonders in der Expression des GFP (Ba/F3-gp130-TosoΔ50-2A-GFP, HEK293-TIL6R-2A-GFP). Durch

diesen Versuch wurde bestätigt, dass die stabile Transduktion der Rezeptoren sowohl bei den Ba/F3-gp130-, als auch bei den HEK293-Zellen funktionierte und durch das 2A-Peptid eine gleichzeitige Expression von Toso und GFP ermöglicht wird. Bei den folgenden Analysen am Durchflusszytometer wurden nur grün fluoreszierende und somit Toso exprimierende Zellen analysiert.

3.3.4 ADAM17 spaltet den IgM Rezeptor Toso

Um herauszufinden, ob die Toso-Varianten durch die Protease ADAM17 gespalten wird, wurde die Abnahme der Oberflächenexpression des Rezeptors nach der Stimulation mit PMA oder Ionomycin analysiert. Hierfür wurden Ba/F3-gp130-Toso-2A-GFP-Zellen mit dem Toso Antikörper markiert (1:50, 1 h, Eis). Im Anschluss wurden die Zellen in DMEM^{+/+} resuspendiert und in eine 12-Well-Platte aufgeteilt. Ein Ansatz wurde wieder direkt auf Eis gelagert und diente als Ausgangswert der Toso Expression (s. Abb. 3.26 A schwarze durchgezogene Linie). Nach der Stimulation mit GI254023X, GW280264X (3 μ M, 30 min vor PMA Zugabe) und PMA (100 nM, 2 h, s. Abb. 3.26 A graue gestrichelte Linie) oder DMSO (2 h, s. Abb. 3.26 A graue durchgezogene Linie) wurden die Zellen gewaschen und für 1 h auf Eis mit dem Sekundärantikörper inkubiert (rabbit anti-maus-APC). Dadurch wurden nur noch die Rezeptoren markiert, die anfangs mit dem Primärantikörper markiert wurden und jetzt immer noch auf der Oberfläche vorhanden waren. Endozytierte und durch Proteolyse freigesetzte Rezeptoren wurden nicht mehr markiert. Als Kontrolle dienten untransfizierte Ba/F3-gp130-Zellen (s. Abb. 3.26 A ausgefülltes Histogramm). Die Analyse des GFPs und somit Toso exprimierenden Zellen erfolgte im FACS Canto II und die Daten wurden mit Hilfe der FCS4Express Software ausgewertet.

3 Ergebnisse

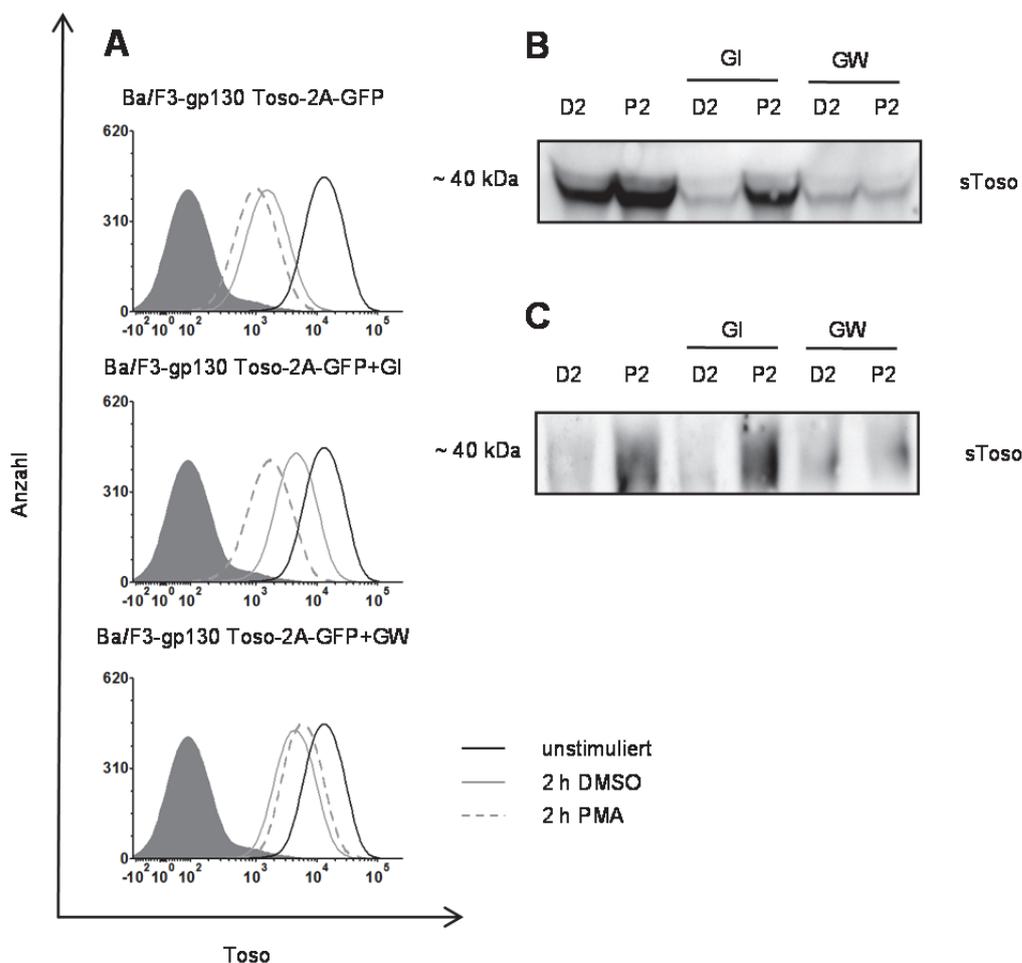


Abbildung 3.26: PMA-induziertes *Shedding* von Toso. (A) Stabil transduzierte Ba/F3-gp130-Toso-2A-GFP-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.3.8 beschrieben mit dem Primärantikörper markiert und mit PMA (gestrichelte Linie) oder DMSO (graue durchgezogene Linie) für 2 h stimuliert. Vor dieser Stimulation erfolgte eine Inkubation mit den Inhibitoren GI und GW. Im Anschluss wurde der auf der Oberfläche verbliebende Rezeptor mit Hilfe des Sekundärantikörpers mit APC gelabelt. PMA-induziertes *Shedding* der Zelllinien ohne Zugabe eines Inhibitors ist in der ersten Reihe dargestellt. In der Mitte sind die Ergebnisse nach einer Stimulation mit GI gezeigt und ganz unten die nach einer Stimulation mit GW. Die Ausgangskonzentration vor der Stimulation mit DMSO oder PMA ist durch den schwarzen unausgefüllten Graphen dargestellt. Als Kontrolle dienten untransfizierte Ba/F3-gp130-Zellen (ausgefülltes Histogramm). Dargestellt ist eine durchflusszytometrische Analyse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. (B) Ba/F3-gp130-Toso-2A-GFP-Zellen wurden ausgesät, direkt mit den Inhibitoren GI und GW behandelt und im Anschluss mit DMSO (D2) oder PMA (P2) für 2 h stimuliert. Der Überstand wurde abgenommen, abzentrifugiert und in einer Vakuumzentrifuge aufkonzentriert. In jede Geltasche wurden 50 μ l aufgetragen. (C) Genau wie für B beschrieben, wurde das *Shedding* in stabil transfizierten HEK293-Zellen untersucht. Hier erfolgte die Stimulation erst 24 h nach dem Aussähen der Zellen. Je ein exemplarischer Blot aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Stimulation mit PMA (gestrichelte graue Linie) und die daraus folgende Aktivierung von ADAM17 führte zu einer Reduktion des Toso-Rezeptors auf der Oberfläche, was auf das *Shedding* von Toso hindeutet (Abbildung 3.26 A oberster Graph). Die Graphen in der Mitte der Abbildung 3.26 A stellen die Ergebnisse nach der Stimulation mit GI254023X dar.

3 Ergebnisse

Hierbei wird gezeigt, dass nach der Inhibition von ADAM10 durch GI254023X die Expression des Toso-Rezeptors auf der Oberfläche größer ist, als in den Zellen, die ohne Inhibitor behandelt wurden. Der Einfluss des ADAM10-Inhibitors auf die PMA-Stimulation (gestrichelte graue Linie) ist nicht so stark, wie auf die DMSO-Stimulation. Dies liegt daran, dass hier nicht das ADAM17-vermittelte PMA-induzierte *Shedding* inhibiert wird, sondern das konstitutive *Shedding*, welches von ADAM10 vermittelt wird. In den DMSO Kontrollen (durchgezogene graue Linie), welche die Internalisierung und das konstitutive *Shedding* widerspiegeln, wurde nach der Stimulation mit GI254023X etwas mehr Toso auf der Oberfläche detektiert, als in den unstimulierten DMSO-Ansätzen (s. Abb. 3.26 A mittlere Graphen). Dadurch wurde gezeigt, dass GI das PMA-induzierte *Shedding* nicht inhibiert, aber das konstitutive *Shedding* unterdrückt. Zur Untersuchung ob ADAM17 das PMA-induzierte *Shedding* vermittelt, wurden die Zellen mit dem ADAM10/17-Inhibitor GW280264X (GW) behandelt. Hierbei wurde nachgewiesen, dass GW sowohl das PMA-induzierte, als auch das konstitutive *Shedding* von Toso reduziert (Abbildung 3.26 A untere Graphen). Diese Ergebnisse wurden sowohl in Ba/F3-gp130-Toso-2A-GFP-Zellen (3.26 B), als auch in HEK293-Toso-2A-GFP-Zellen (3.26 C) durch eine Western Blot Analyse bestätigt. Hierfür wurde die Zellen ausgesät und direkt (Ba/F3-gp130-Zellen) oder am nächsten Tag (HEK293-Zellen) erst für 30 min mit den Inhibitoren GI und GW inkubiert und im Anschluss für 2 h mit PMA (P2) bzw. DMSO (D2) stimuliert. Der Überstand wurde abgenommen, in einer Vakuumzentrifuge aufkonzentriert (2.2.2.2) und im Western Blot analysiert.

Das lösliche Toso wurde durch eine Bande von ungefähr 40 kDa nachgewiesen. Die Proteine wurden nach einer PMA-Induktion (P2) in erhöhter Konzentration im Überstand dokumentiert. Nach der Inhibition von ADAM10 durch GI, konnte weiterhin lösliches Toso im Überstand detektiert werden. Nur in den Ansätzen, in denen ADAM10 und ADAM17 durch eine Stimulation mit GW inhibiert wurden, erfolgte kein Nachweis des löslichen Toso. In Ba/F3-gp130-Toso-2A-GFP-Zellen wurde lösliches Toso auch in der DMSO-Kontrolle (D2), die ohne Inhibitoren behandelt wurde, detektiert.

Die Ba/F3-gp130-Zellen, die die anderen Varianten des Toso-Proteins (s. Abb. 3.21) exprimieren, wurden auf die gleiche Art wie die Ba/F3-gp130-Toso-2A-GFP-Zellen im Durchflusszytometer analysiert (s. Abb. 3.27). Genau wie bei dem Toso wt, wurde hier gezeigt, dass bei den Toso-Varianten die Oberflächenexpression nach einer Stimulation mit PMA geringer war als bei der entsprechenden DMSO-Kontrolle und dem Ausgangswert. Dies

3 Ergebnisse

deutet darauf hin, dass auch die Toso-Varianten durch ADAM17 gespalten werden können. Die Inhibition von ADAM10 durch GI254023X (s. Abb. 3.27 A-C Mitte) sorgt zwar genau wie beim Toso wt für eine etwas erhöhte Oberflächenexpression des entsprechenden Rezeptors. Dies liegt aber nicht an dem Einfluss auf die PMA-Induktion, sondern an der Inhibition von ADAM10 und dem konstitutivem *Shedding*. Die DMSO Kontrolle nach der Stimulation mit GI254023X zeigt bei allen Varianten eine höhere Oberflächenexpression als in dem Ansatz, der ohne Inhibitor behandelt wurde.

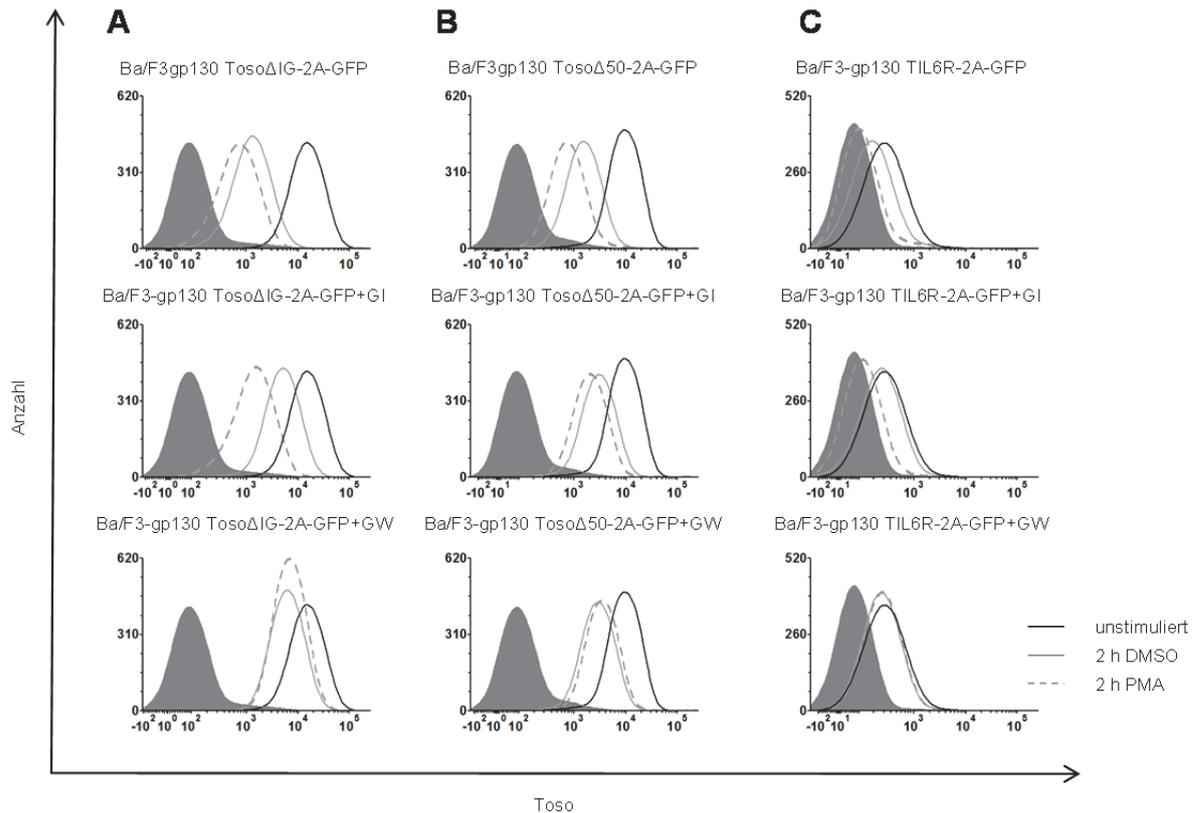


Abbildung 3.27: PMA-induziertes *Shedding* der Toso-Varianten. Stabil transduzierte Ba/F3-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.3.8 beschrieben mit dem Primärantikörper markiert und mit PMA (gestrichelte Linie) oder DMSO (graue durchgezogene Linie) für 2 h stimuliert. Vor dieser Stimulation erfolgte eine Inkubation mit den Inhibitoren GI und GW. Im Anschluss wurde der auf der Oberfläche verbliebende Rezeptor mit Hilfe des Sekundärantikörpers mit APC gelabelt. PMA-induziertes *Shedding* der Zelllinien Ba/F3-gp130-TosoΔIG-2A-GFP (A), Ba/F3-gp130-TosoΔ50-2A-GFP (B), Ba/F3-gp130-TIL6R-2A-GFP (C) ohne Zugabe eines Inhibitors ist in der ersten Reihe dargestellt. In der Mitte sind die Ergebnisse nach einer Stimulation mit GI gezeigt und ganz unten die nach einer Stimulation mit GW. Die Ausgangskonzentration vor der Stimulation mit DMSO oder PMA ist durch den schwarzen unausgefüllten Graphen dargestellt. Als Kontrolle dienten untransfizierte Ba/F3-gp130-Zellen (ausgefülltes Histogramm). Dargestellt ist eine durchflusszytometrische Analyse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Werden die Zellen vorher mit dem Inhibitor GW280264X behandelt, wodurch ADAM10 und ADAM17 inhibiert werden, dann ist die Oberflächenexpression der Rezeptoren sowohl nach

3 Ergebnisse

der Stimulation mit PMA, als auch mit DMSO wesentlich größer als bei den Ansätzen, die ohne Inhibitor stimuliert wurden (s. Abb. 3.27 A-C unten). Die Analyse der Variante Toso Δ IG-2A-GFP zeigt, dass dieser Rezeptor sowohl PMA-induziert von ADAM17, als auch konstitutiv von ADAM10 gespalten werden kann (s. Abb. 3.27 A). Daher scheint die Ig-Domäne von Toso nicht für das *Shedding* essentiell zu sein. Auch die ersten 50 Aminosäuren der Stalkregion ausgehend von der Transmembrandomäne sind nicht essentiell für das *Shedding*, weil auch diese Variante durch ADAM17 und ADAM10 gespalten wird (s. Abb. 3.27 B). Die oben beschriebenen Effekte konnten auch beim TIL6R beobachtet werden, jedoch nicht ganz so eindeutig, weil die Oberflächenexpression wesentlich geringer war. Die Stimulation mit GI254023X unterdrückt das konstitutive *Shedding* vollständig, so dass auch nach der zweistündigen DMSO-Behandlung genau so viel Rezeptor auf der Oberfläche vorhanden war wie anfangs. Das PMA-induzierte *Shedding* wurde durch den ADAM10-Inhibitor nur minimal beeinflusst. Jedoch wird durch die Stimulation mit GW280264X sowohl das konstitutive als auch das PMA-induzierte *Shedding* vollständig inhibiert. Dadurch erfolgte der Nachweis, dass die intrazelluläre Domäne von Toso nicht für das *Shedding* des Toso Rezeptors essentiell ist.

Durch diese Analysen wurde gezeigt, dass der Toso Rezeptor sowohl durch murines als auch humanes ADAM17 nach einer Stimulation mit PMA, als auch konstitutiv durch ADAM10 prozessiert wird. Aus diesem Grund wurde im Anschluss der Einfluss von ADAM10 durch die Stimulation mit Ionomycin auf die Prozessierung des Toso-Rezeptors untersucht.

3.3.5 ADAM10 spaltet den IgM-Rezeptor Toso

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass ADAM17 nach einer Stimulation mit PMA den Toso-Rezeptor prozessiert. Außerdem deuten die Experimente mit den Inhibitoren GI und GW darauf hin, dass es auch ein ADAM10-vermitteltes, konstitutives *Shedding* von Toso gibt. Daher soll in diesem Abschnitt näher untersucht werden, ob die Stimulation von ADAM10 durch Ionomycin auch zu einer Prozessierung des Toso-Rezeptors führt. Die Versuche wurden, wie im Abschnitt 3.3.4 beschrieben, durchgeführt und analysiert, mit dem Unterschied, dass die Zellen an Stelle von PMA mit Ionomycin (1 μ M, 1 h, I1) stimuliert wurden. In Abbildung 3.28 wird gezeigt, dass es sowohl durch die Stimulation mit Ionomycin, als auch DMSO, zu einer geringen Abnahme der Toso Oberflächenexpression kam (Abb. 3.28 A graue Linien). Die Stimulation mit dem ADAM10 spezifischen Inhibitor GI254023X (GI) blockierte das induzierte und das konstitutive *Shedding* (s. Abb. 3.28 A Mitte). Hierbei konnte nur eine geringe Abnahme der Oberflächenexpression des Toso-Rezeptors, nach einer Stimulation mit DMSO oder Ionomycin, ermittelt werden. Die gleichen Ergebnisse konnten durch eine Inhibition von ADAM10 und ADAM17 mit dem Inhibitor GW280264X (GW) erzielt werden. Auch in diesem Fall kam es nur zu einer geringen Abnahme der Oberflächenexpression von Toso. Diese Ergebnisse wurden durch die Analyse von konzentrierten Überständen aus stimulierten Ba/F3-gp130-Toso-2A-GFP (s. Abbildung 3.28 B) und aus HEK293-Toso-2A-GFP-Zellen bestätigt (Abbildung 3.28 C). Hierbei konnte nur in den Ansätzen, die ohne Inhibitoren inkubiert wurden, eine erhöhte Menge des löslichen Rezeptors detektiert werden. Durch die Stimulation mit Ionomycin (I1) wird etwas mehr Rezeptor in den Überstand freigesetzt, als bei der DMSO (D1) Kontrolle. Die Stimulation mit DMSO zeigte ebenfalls einen deutlichen Nachweis des löslichen Tosos im Überstand. Daher kann festgehalten werden, dass Toso auch durch ADAM10 sowohl nach einer Stimulation mit Ionomycin, als auch konstitutiv *gesheddet* wird. Hierbei wurde auch gezeigt, dass das ADAM10-vermittelte *Shedding* durch eine Stimulation mit Ionomycin nicht so effektiv ist, wie das PMA-induzierte ADAM17-vermittelte *Shedding* von Toso.

3 Ergebnisse

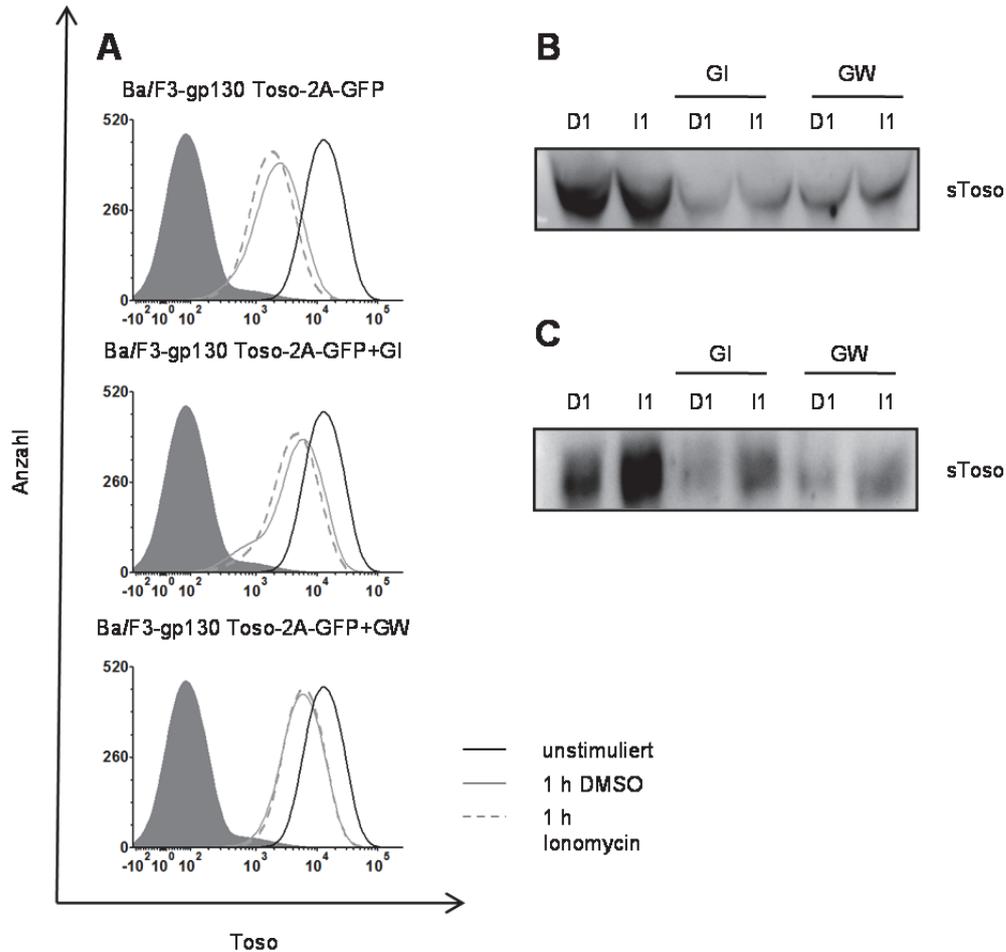


Abbildung 3.28: Ionomycin-induziertes Shedding des Toso-Rezeptors. (A) Stabil transduzierte Ba/F3-gp130-Toso-2A-GFP-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.3.8 beschrieben mit dem Primärantikörper markiert und mit Ionomycin (gestrichelte Linie) oder DMSO (graue durchgezogene Linie) für 1 h stimuliert. Vor dieser Stimulation erfolgte eine Inkubation mit den Inhibitoren GI und GW. Im Anschluss wurde der auf der Oberfläche verbliebende Rezeptor mit Hilfe des Sekundärantikörpers mit APC gelabelt. Ionomycin-induziertes Shedding der Zelllinien ohne Zugabe eines Inhibitors ist in der ersten Reihe dargestellt. In der Mitte sind die Ergebnisse nach einer Stimulation mit GI gezeigt und ganz unten die nach einer Stimulation mit GW. Die Ausgangskonzentration vor der Stimulation mit DMSO oder Ionomycin ist durch den schwarzen unausgefüllten Graphen dargestellt. Als Kontrolle dienten untransfizierte Ba/F3-gp130-Zellen (ausgefülltes Histogramm). Dargestellt ist eine durchflusszytometrische Analyse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. (B) Ba/F3-gp130-Toso-2A-GFP-Zellen wurden ausgesät, direkt mit den Inhibitoren GI und GW behandelt und im Anschluss mit DMSO (D1) oder Ionomycin (I1) für 1 h stimuliert. Der Überstand wurde abgenommen, abzentrifugiert und in einer Vakuumzentrifuge aufkonzentriert. In jede Geltasche wurden 50 μ l aufgetragen. (C) Genau wie für B beschrieben, wurde das Shedding in stabil transfizierten HEK293-Zellen untersucht. Hier erfolgte die Stimulation erst 24 h nach dem Aussähen der Zellen. Je ein exemplarischer Blot aus drei unabhängigen Experimenten.

Auch die anderen Varianten des Toso, die in den Ba/F3-gp130-Zellen exprimiert werden, wurden im Durchflusszytometer auf die gleiche Weise analysiert (s. Abb. 3.29). Die Rezeptorvariante, bei der die Ig-Domäne des Toso deletiert wurde, zeigt den gleichen Effekt, wie Toso wt. Auch in diesem Fall wird durch die Stimulation mit Ionomycin oder DMSO die

3 Ergebnisse

Oberflächenexpression von Toso reduziert. Sowohl GI, als auch der Inhibitor GW verringern die Abnahme der Oberflächenexpression und hemmen dadurch das Ionomycin-induzierte und das konstitutive *Shedding* (s. Abb. 3.29 A).

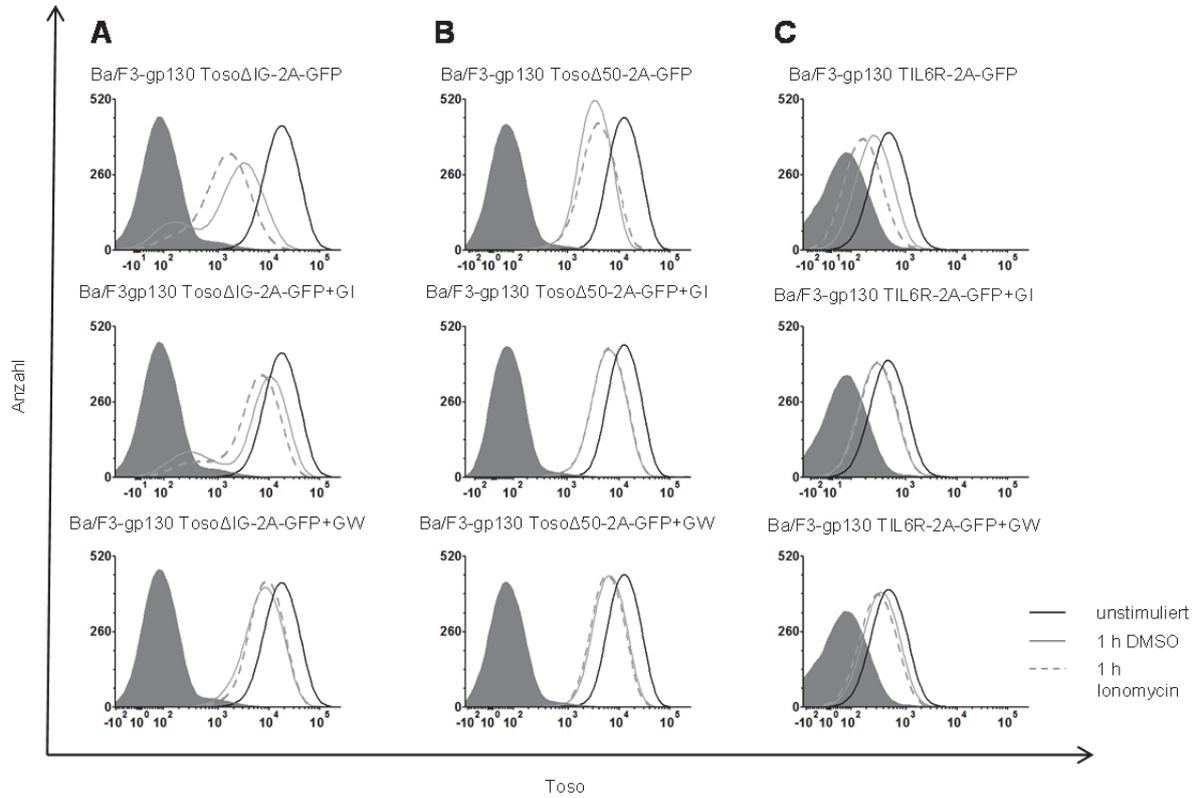


Abbildung 3.29: Ionomycin-induziertes *Shedding* der Toso-Varianten. Stabil transduzierte Ba/F3-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.3.8 beschrieben mit dem Primärantikörper markiert und mit Ionomycin (gestrichelte Linie) oder DMSO (graue durchgezogene Linie) für 1 h stimuliert. Vor dieser Stimulation erfolgte eine Inkubation mit den Inhibitoren GI und GW. Im Anschluss wurde der auf der Oberfläche verbliebende Rezeptor mit Hilfe des Sekundärantikörpers mit APC gelabelt. Ionomycin-induziertes *Shedding* der Zelllinien Ba/F3-gp130-TosoΔIG-2A-GFP (A), Ba/F3-gp130-TosoΔ50-2A-GFP (B), Ba/F3-gp130-TIL6R-2A-GFP (C) ohne Zugabe eines Inhibitors ist in der ersten Reihe dargestellt. In der Mitte sind die Ergebnisse nach einer Stimulation mit GI gezeigt und ganz unten die nach einer Stimulation mit GW. Die Ausgangskonzentration vor der Stimulation mit DMSO oder Ionomycin ist durch den schwarzen unausgefüllten Graphen dargestellt. Als Kontrolle dienten untransfizierte Ba/F3-gp130-Zellen (ausgefülltes Histogramm). Dargestellt ist eine durchflusszytometrische Analyse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

TosoΔ50 zeigte nach einer Stimulation mit Ionomycin eine gleich starke Abnahme der Toso-Oberflächenexpression wie in der DMSO-Kontrolle. Die Abnahme der Oberflächenexpression wird durch die Inhibitoren GI und GW, wodurch ADAM10 und ADAM17 inhibiert werden, etwas verringert (s. Abb. 3.29 B). Ein Ionomycin-induziertes *Shedding* konnte hierbei nicht festgestellt werden. Die Toso-Variante TIL6R zeigt genau wie TosoΔIG

und Toso wt eine stärkere Abnahme der Oberflächenexpression nach der Stimulation mit Ionomycin, als nach der Stimulation mit DMSO (s. Abb. 3.29 C). Die Inkubation mit den Inhibitoren GI und GW hemmt auch in diesem Fall die Abnahme der Oberflächenexpression. Dadurch kann gezeigt werden, dass die Toso-Rezeptorvarianten sowohl Ionomycin-induziert, als auch konstitutiv von ADAM10 prozessiert werden können. Nur die Variante Toso Δ 50 zeigte keinen Effekt durch die Stimulation mit Ionomycin.

3.3.6 Zusammenfassung der ADAM10- und ADAM17-vermittelten Prozessierung des Toso-Rezeptors

Von den Daten der Durchflusszytometrie, die in den vorherigen Abschnitten 3.3.4 und 3.3.5 beschrieben wurden, folgte die Ermittlung der arithmetischen Mittelwerte. Die Ausgangsexpression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche (schwarze Balken) wurde für jeden einzelnen Versuch auf 100% gesetzt und die entsprechende Abnahme der Expression in den anderen Ansätzen dazu berechnet. In Abbildung 3.30 sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei biologisch unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Die Wildtypvariante des Toso-Rezeptors wurde sowohl nach der Stimulation mit PMA (P2, weiße Balken) und Ionomycin (I1, weiße Balken) geschnitten. Durch die Internalisierung und das konstitutive *Shedding* reduzierte sich in den DMSO Kontrollen die Expression des Rezeptors um 82,62% (D2, graue Balken) bzw. 79,18% (D1, graue Balken). Wurden die Proteasen ADAM17 und ADAM10 durch PMA oder Ionomycin aktiviert, reduzierte sich die Rezeptorexpression um weitere 8,52% (PMA, $p_{D2 \text{ zu } P2} = 0,001$) und 4,91% (Ionomycin, $p_{D1 \text{ zu } I1} < 0,01$) (s. Tabelle 2).

Die Stimulation mit GI inhibierte die ADAM10-, aber nicht die ADAM17-vermittelte Prozessierung. Dabei wurde durch das PMA-induzierte *Shedding* in Anwesenheit von GI die Rezeptorexpression um weitere 15,62% reduziert, verglichen mit der entsprechenden DMSO Kontrolle ($p=0,002$). Das Ionomycin-induzierte *Shedding* wurde durch GI vollständig blockiert. Der Inhibitor GW, welcher sowohl ADAM10, als auch ADAM17 blockiert, inhibierte das PMA- und Ionomycin-vermittelte *Shedding* vollständig. Durch die Stimulation mit PMA in Anwesenheit von GW kam es sogar eher zu einem Anstieg der Rezeptorexpression um 9,55% ($p < 0,05$) verglichen mit der entsprechenden DMSO Kontrolle.

3 Ergebnisse

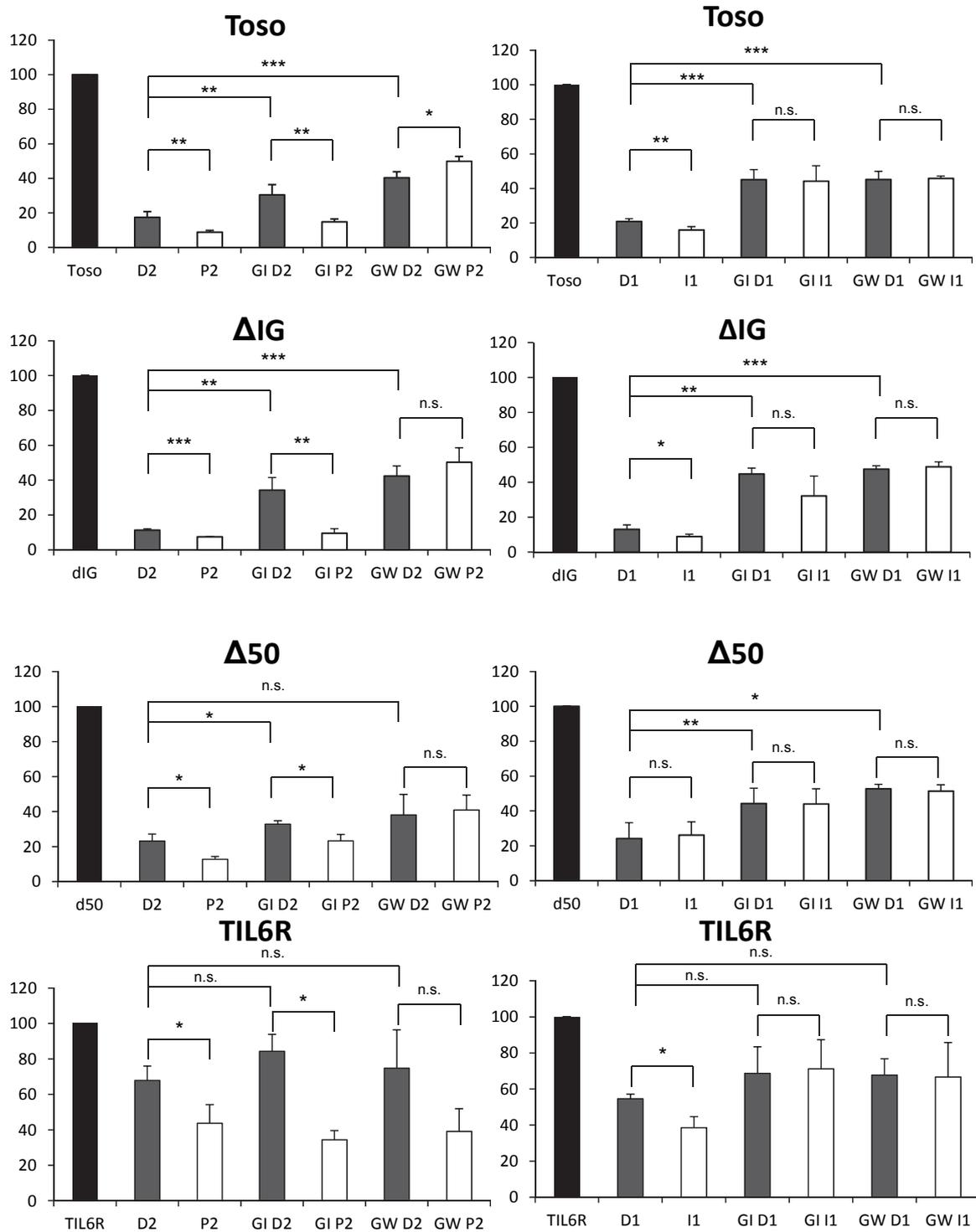


Abbildung 3.30: Zusammenfassung des Shedding des Toso Rezeptors. Zusammenfassung der generierten Daten der Oberflächenexpression. Aus den in Abschnitt 3.3.4 und 3.3.5 beschriebenen durchflusszytometrischen Ergebnissen, wurde für jede Messung der arithmetische Mittelwert gebildet. Die Ausgangsexpression der Tosovarianten wurde auf 100% gesetzt und die restlichen Werte entsprechend berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei biologisch unabhängigen Experimenten. D2= 2 h DMSO, P2= 2 h PMA, D1= 1 h DMSO, I1= 1 h Ionomycin, GI= 30 min GI254023X, GW= 30 min GW280264X. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, n.s.: nicht signifikant.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Daten des Sheddings des Toso Rezeptors. Erläuterungen siehe Abbildung 3.30

	Toso		Δ IG		Δ 50		TIL6R	
	Abnahme der Expression in %	p						
D2	82,62 ± 3,42	0,001	88,72 ± 0,74	0,001	76,89 ± 8,04	0,015	32,12 ± 8,04	0,011
P2	91,14 ± 1,05		92,52 ± 0,09		87,24 ± 1,53		56,36 ± 10,55	
D2+GI	69,54 ± 5,98	0,002	65,67 ± 7,16	0,005	67,16 ± 1,89	0,016	15,67 ± 9,57	0,002
P2+GI	85,16 ± 1,76		90,38 ± 2,48		76,75 ± 3,66		65,67 ± 5,27	
D2+GW	59,61 ± 3,38	0,019	57,64 ± 5,74	n.s.	61,96 ± 11,76	n.s.	25,31 ± 21,70	n.s.
P2+GW	50,06 ± 2,77		49,76 ± 8,39		59,15 ± 8,64		60,87 ± 12,93	
D1	79,18 ± 1,67	0,003	86,89 ± 2,54	0,026	75,78 ± 9,04	n.s.	45,43 ± 2,56	0,014
I1	84,09 ± 1,98		91,14 ± 1,39		73,79 ± 7,57		61,48 ± 6,14	
D1+GI	54,98 ± 5,90	n.s.	55,23 ± 3,44	n.s.	55,80 ± 8,87	n.s.	31,32 ± 14,69	n.s.
I1+GI	55,86 ± 8,93		67,77 ± 11,39		55,98 ± 8,72		28,88 ± 16,25	
D1+GW	54,84 ± 4,70	n.s.	52,48 ± 2,03	n.s.	47,31 ± 2,54	n.s.	32,24 ± 9,02	n.s.
I1+GW	54,18 ± 1,34		51,07 ± 2,76		48,63 ± 3,70		33,37 ± 19,19	

3 Ergebnisse

Auch das konstitutive *Shedding* wurde durch beide Inhibitoren blockiert, dass eine höhere Oberflächenexpression, verglichen mit der DMSO Kontrolle ohne Inhibitoren, detektierbar war (PMA bis zu 23,01%, Ionomycin bis zu 24,34%) (s. Abbildung 3.30 und Tabelle 2).

Alle Toso-Varianten wurden nach einer Stimulation mit PMA, welche durch den Inhibitor GW vollständig gehemmt wurde, prozessiert. Bei den Toso-Varianten fiel der TIL6R besonders auf, weil dieser generell nur sehr schwach auf der Oberfläche exprimiert wurde (s. Abbildung 3.25) und dadurch die Reduzierung der Rezeptorexpression bei den DMSO Kontrollen nicht so stark ausfiel wie bei den anderen Varianten (s. Abb. 3.30 und Tabelle 2). Das ADAM10-vermittelte *Shedding*, welches durch die Inhibitoren GI und GW gehemmt wurde, wurde bei allen Varianten, außer der $\Delta 50$ Mutation, beobachtet. Bei dieser Variante kam es durch die Stimulation mit Ionomycin zu keiner signifikanten Veränderung der Oberflächenexpression. Alle berechneten Messwerte sind nochmal in der Tabelle 2 dargestellt.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass fast alle Toso-Rezeptorvarianten durch ADAM10 und ADAM17 nach einer Stimulation prozessiert werden. Nur die Variante, in der 50 Aminosäuren in der Stalkregion (Toso $\Delta 50$) deletiert wurde, konnte nicht mehr durch ADAM10, aber weiterhin durch ADAM17 geschnitten werden.

4 Diskussion

4.1 Einfluss von SAP97 auf die ADAM17 vermittelte Proteolyse des IL-6R

Die limitierte Proteolyse (*Shedding*) von membrangebundenen Proteinen ist eine irreversible posttranslationale Proteinmodifikation, wodurch unter anderem Rezeptoren, wie der IL-6R und der TNFR (*tumor necrosis factor receptor*), als auch Signalmoleküle, wie TNF und EGF (*epidermal growth factor*) von der Zelloberfläche entfernt werden. Dies bietet die Möglichkeit die Expression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu reduzieren, wodurch die Zelle nicht mehr so sensitiv gegenüber bestimmten Signalen reagiert. Zudem können die löslichen Rezeptoren in der Regel, wie im Falle des TNFR, antagonistisch wirken (Hooper et al. 1997). Das *Shedding* bietet auch die Möglichkeit, dass die freigesetzten, löslichen, biologisch aktiven Signalmoleküle, wie TNF + EGF, eine autokrine, parakrine oder juxtakrine Signaltransduktion auslösen und somit agonistisch wirken können (Blobel 2005).

Das Zytokin IL-6 bindet an den membrangebundenen IL-6R, was zu einer Rekrutierung von zwei gp130 Molekülen und einer Signaltransduktion führt. Diese Art der Signalweiterleitung wird klassische IL-6 Signaltransduktion genannt und ist auf Zellen beschränkt, die den IL-6R exprimieren. Nach einer proteolytischen Spaltung des IL-6R, bindet dieser lösliche Rezeptor ebenfalls das Zytokin und löst eine Signaltransduktion auf allen Zellen aus, weil gp130 ubiquitär exprimiert wird (*trans-signaling*). Die Unterschiede in der zellulären Signaltransduktion dieser beiden Signalwege sind gravierend. So führt die klassische Signaltransduktion zur Aktivierung des Immunsystems, anti-inflammatorischen Prozessen und die Differenzierung von B-Zellen. Das *Trans-signaling* löst jedoch pro-inflammatorische Signale aus, inhibiert die T-Zell-Apoptose und sorgt für eine maligne Proliferation (Chalaris et al. 2011; Scheller et al. 2011b).

Aus diesen Gründen ist eine Untersuchung der Regulation der Proteolyse des IL-6 Rezeptors unabdingbar. Diese Arbeit untersucht die Auswirkung der Interaktion von SAP97 mit den Proteasen ADAM10 und ADAM17 auf die Proteolyse des IL-6R. SAP97 interagiert über seine PDZ3 Domäne mit ADAM17 und ADAM10, wodurch es im Falle der Interaktion

4. Diskussion

mit ADAM17 zu einer verminderten Proteolyse von TNF, TNFR1 und TNFR2 kommt (Peiretti et al. 2003b). Die Interaktion von SAP97 mit ADAM10, sorgt für eine stärkere Oberflächenexpression der Protease und dadurch zu einer verstärkten Proteolyse von APP, wodurch weniger A β Peptid gebildet wird (Marcello et al. 2007; Saraceno et al. 2014).

Durch die Interaktion zwischen ADAM17 und SAP97 wurde die Freisetzung der Substrate TNF, TNFR1, TNFR2, welche ebenfalls von ADAM17 prozessiert werden, vermindert (Peiretti et al. 2003b; Marcello et al. 2007; Surena et al. 2009). SAP97 beeinflusst wahrscheinlich nur die Proteolyse bestimmter Substrate, ähnlich wie iRhom2 (Maretzky et al. 2013) und bietet daher die Möglichkeit, die Prozessierung bestimmter Substrate zu untersuchen und beeinflussen.

Diese Arbeit bestätigt, dass ADAM17 mit SAP97 über dessen PDZ3 Domäne interagiert. Interessanterweise wurde auch eine Interaktion von SAP97, ebenfalls über die PDZ3 Domäne, mit dem humanen IL-6R beobachtet. Dadurch erfolgte der Nachweis einer bisher unentdeckten Interaktion von SAP97 mit ADAM17 und eines seiner Substrate. Durch die Analyse des löslichen IL-6R im Überstand nach einer PMA-induzierten Aktivierung von ADAM17 erfolgte der Beweis, dass durch eine Überexpression von SAP97 die Freisetzung des IL-6R durch ADAM17 vermindert wurde. Dieser Effekt erschien auch, wenn nur die interagierende PDZ3 Domäne überexprimiert wurde. Einen Einfluss von SAP97 auf das Ionomycin- (ADAM10) oder Anisomycin- (ADAM17) induzierte *Shedding* des IL-6R wurde nicht beobachtet.

Eine physiologische Begründung, wodurch die verminderte, PMA-induzierte Proteolyse des IL-6R ausgelöst wird, konnte im Zuge dieser Arbeit nicht gefunden werden, da durch die Expression von SAP97 weder ADAM17 noch der IL-6R vermehrt oder vermindert auf der Oberfläche exprimiert wurde. Auch die Reifung von ADAM17 wurde durch SAP97 nicht beeinflusst. Jedoch wurde durch die Stimulation mit PMA, unabhängig von SAP97, die Konzentration des reifen ADAM17 reduziert, was schon durch Doedens *et. all* gezeigt wurde (Doedens and Black 2000).

4.2 IL-23R ist ein neues Substrat von ADAM10 und ADAM17

Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, führt die proteolytische Freisetzung des IL-6R und das damit einhergehende *Trans-signaling* zu pro-inflammatorischen Prozessen und Erkrankungen.

Der IL-23R wird teils gar nicht oder nur in geringen Mengen auf naiven T-Zellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort (Oppmann et al. 2000; Parham et al. 2002).

IL-23 und somit auch der IL-23R sind zudem durch dysregulierte T-Zellantworten an Autoimmunkrankheiten beteiligt. Einen Einfluss von IL-23 auf Multiple Sklerose (MS) wurde anhand des Tiermodells der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) nachgewiesen, indem p19- und p40-defiziente Mäuse eine Resistenz gegenüber dieser Krankheit aufwiesen (Cua et al. 2003). p19-defiziente Mäuse zeigten außerdem einen protektiven Effekt auf die Kollagen-induzierte Arthritis, wohingegen in p40-defizienten Mäusen der Krankheitsverlauf, durch den Verlust des IL-12 Signalweges, schwerer verlief (Murphy et al. 2003). In Patienten mit Morbus Crohn, rheumatoider Arthritis (RA) und MS wurde eine erhöhte Expression von p19, welches eine Untereinheit des IL-23 ist, nachgewiesen (Schmidt et al. 2005; Sato et al. 2006; Li et al. 2007b; Di Cesare et al. 2009).

Einzelnukeotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNPs) sind weit verbreitete Sequenzvariationen im Genom. Rund alle 500-1000 bp treten SNPs auf (Wang et al. 2005). Diese können in nicht-kodierenden oder kodierenden Regionen auftreten, wobei letztere als synonyme oder nicht-synonyme SNPs auftreten. Synonyme SNPs verändern, durch die Degeneriertheit des genetischen Codes, die Aminosäuresequenz nicht. Wohingegen bei Nicht-Synonymen SNPs (ns-SNPs) eine Aminosäure ausgetauscht wird. Diese Austausche können Effekte auf verschiedene Krankheiten haben. Daher sind genomweite Assoziationsstudien (GWAS) ein wichtiges Tool um krankheitsrelevante Genvariationen aufzuklären. Duerr et. al führten eine GWAS durch, um genetische Faktoren zu identifizieren, die einen Einfluss auf Morbus Crohn und Ulcerative Colitis haben. Die Nicht-Synonyme SNP Variante rs11209026 (R381Q) im Exon 9 des *IL23R* zeigte dabei einen starken Schutz gegenüber Morbus Crohn (Duerr et al. 2006).

4. Diskussion

Andere Einzelnukleotid-Polymorphismen des IL-23R sind mit Erkrankungen wie Psoriasis, Morbus Basedow, Rheumatoide Arthritis und Morbus Behçet assoziiert (Capon et al. 2007; Cargill et al. 2007; Huber et al. 2008; Nair et al. 2008; Hollis-Moffatt et al. 2009; Nair et al. 2009; Oka et al. 2013; Yalcin et al. 2014; Hamdy et al. 2015).

Die Signalkaskade des IL-23 über den IL-23R wird durch Zytokinuntereinheiten (p40 und p80), aber auch durch lösliche Rezeptorvarianten (sIL-23R) oder neutralisierende Antikörper (anti-p40, anti-p19) inhibiert (Floss et al. 2015). Eine lösliche Variante des IL-23R, welches die IL-23 vermittelte Immunantwort unterdrückt, wurde schon durch alternatives Splicing nachgewiesen (Yu et al. 2015).

In einem initialen Experiment dieser Arbeit wurde die Internalisierungsgeschwindigkeit des IL-23R untersucht. Dies ergab, dass nach 14 Minuten die Hälfte der Rezeptoren, die auf der Oberfläche der Zelle exprimiert waren, in die Zelle aufgenommen wurden. Für einen Rezeptor ist diese Aufnahmegeschwindigkeit vergleichsweise schnell, weil die Halbwertszeit anderer Rezeptoren, wie dem IL-6R, im Bereich von 2-3 h liegt. Genau wie bei dem IL-6R wird auch beim IL-23R die Internalisierung nicht durch das entsprechende Zytokin beeinflusst (Gerhartz et al. 1994). Durch die Stimulation mit GI254028X, GW280264X und Marimastat, welches Metalloproteinasen inhibiert, wurde die Reduktion der Oberflächenexpression des IL-23R in den Internalisierungsexperimenten verlangsamt. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass der Rezeptor nicht nur durch Endozytose, sondern auch durch limitierte Proteolyse (*Shedding*) von der Oberfläche verschwindet.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Beantwortung der Frage, ob die proteolytische Freisetzung des humanen und murinen IL-23R durch ADAM10 und ADAM17 erfolgt.

Für die spezifische Aktivierung von ADAM17 wurde der Phorbolster PMA eingesetzt. Dieser aktiviert die Protein Kinase C (PKC), wodurch ADAM17 aktiviert wird (Kraft and Anderson 1983). ADAM10 wurde durch Ionomycin aktiviert, welches den Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle auslöst (Hundhausen et al. 2007). Zur Unterscheidung der beiden Proteasen wurden zwei Inhibitoren eingesetzt: GW280264X (inhibiert ADAM10 und ADAM17) und GI254023X (inhibiert ADAM10) (Hundhausen et al. 2003; Ludwig et al. 2005).

Initial erfolgte der Nachweis, dass sowohl der murine als auch der humane IL-23R von ADAM17 nach einer Stimulation mit PMA und konstitutiv von ADAM10 prozessiert werden, jedoch nicht von ADAM10, nach einer Stimulation mit Ionomycin. Um die verantwortliche

4. Diskussion

Protease für das PMA-induzierte *Shedding* zu identifizieren, wurden die genannten selektiven, chemischen Inhibitoren und HEK293T-Zellen, in welchen ADAM10, ADAM17 oder beide Proteasen durch ein CRISPR/Cas System genetisch inaktiviert wurden, für weitere Analysen verwendet. Dabei wurde festgestellt, dass ADAM17 die verantwortliche Protease für das PMA-induzierte *Shedding* ist. Der Nachweis des löslichen IL-23R aus dem Überstand der stimulierten, stabil transduzierten Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R-Zellen erfolgte mittels Western Blot. Hierfür musste das lösliche Protein, durch die Zugabe von HmIL-23R-Fc und Protein-A Agarose aus dem Überstand gefällt werden. Der lösliche Rezeptor konnte nur aus dem Überstand gefällt werden, wenn dieser mit dem HmIL-23-Fc interagiert. Das HmIL-23-Fc ist ein Fusionsprotein aus p19 und p40. Dieses interagiert nur mit einem intakten und daher auch biologisch aktiven IL-23R. Aus diesem Grunde wurde durch die Immunopäzitation auch nachgewiesen, dass der gebildete, lösliche IL-23R biologisch aktiv ist.

Im Gegensatz zu ADAM17 ist ADAM10 auch konstitutiv aktiv (Matthews et al. 2003; Garbers et al. 2011). Nach den initialen *Shedding* Experimenten wurde das ADAM10 vermittelte, konstitutive *Shedding* des IL-23R untersucht. Dabei erfolgte der Nachweis, dass sowohl der humane, als auch der murine IL-23R durch die konstitutiv aktive Protease ADAM10 geschnitten und dass diese Prozessierung durch die Inhibitoren GI, GW und Marimastat geblockt wurde. Dies bedeutet, dass ADAM10 den IL-23R konstitutiv prozessiert. Durch den Austausch der Stalkregion des humanen IL-23R gegen die entsprechende Region des hIL-6R konnte die Ionomycin-induzierte Prozessierung des IL-23R erlangt werden.

Bisher konnte für ADAM17 und ADAM10 keine Konsensussequenz gefunden werden, in der die jeweiligen Substrate geschnitten werden. Das bedeutet, dass potentielle Substrate nicht durch Sequenzvergleiche identifiziert werden können und die Schnittstelle durch molekularbiologische Methoden bestimmt werden muss.

Um herauszufinden, in welchem Bereich ADAM17 den humanen und murinen IL-23R schneidet, wurden Stalkdeletionsvarianten generiert und deren Verhalten gegenüber ADAM17 nach einer Stimulation mit PMA analysiert. Dabei zeigte sich, dass bei allen Stalkdeletionsvarianten außer der Variante mSD4, der lösliche mIL-23R, nach einer Präzipitation mit HmIL-23-Fc, im Überstand detektierbar war. Eine vorherige Stimulation mit dem ADAM10/ADAM17 Inhibitor GW280264X, aber nicht die Stimulation mit GI254023X blockierte die Freisetzung des Rezeptors. Durch Analysen einer Peptidbibliothek wurde für

4. Diskussion

ADAM17 Valin als bevorzugte Aminosäure hinter der Schnittstelle identifiziert (Tucher et al. 2014). Auch in dem putativen Schnittstellenbereich des murinen IL-23R (S₃₃₆-V₃₄₂) finden sich zwei Valine (V₃₃₉ und V₃₄₂). Durch Mutationen der Valine wurde das *Shedding* des murinen IL-23R bis zu 82% abgeschwächt, wodurch sowohl TV₃₃₉, als auch QV₃₄₂, als Schnittstellen im murinen IL-23R für die Protease ADAM17 in Frage kommen. Welche der beiden Aminosäuren die bevorzugte Schnittstelle ist, oder ob in beiden Bereichen der Rezeptor gleichermaßen geschnitten wird, konnte nicht gezeigt werden.

Durch ein Alignment der Stalkregion des murinen und humanen IL-23R wurde nachgewiesen, dass dieser Bereich zu 42% aus identischen Aminosäuren besteht. Auch die Aminosäuren (QV, TV), die im murinen Rezeptor als Schnittstelle identifiziert wurden, finden sich an der gleichen Stelle in der Stalkregion des humanen IL-23R wieder. *Shedding*analysen von Deletionsvarianten der Stalkregion des humanen IL-23R in HEK293-Zellen zeigten, dass das humane ADAM17 die Wildtyp-Variante und die Varianten hSD1 und hSD2 des humanen IL-23R schneidet. Dies beweist, dass der humane Rezeptor in der Region T₃₃₂-N₃₃₃ geschnitten wird. Kurz vor diesem Bereich befinden sich zwei Valine (V₃₁₉ und V₃₂₂), die in einer Sequenzabfolge liegen, die auch schon im murinen Rezeptor als Schnittstellen definiert wurden. Falls der humane und der murine IL-23R in der gleichen Region prozessiert werden, müsste die Möglichkeit bestehen, dass die humane Deletionsvariante hSD3 noch *gescheddet* wird, weil in dieser Varianten die Aminosäuren TV und QV (V₃₁₉ V₃₂₂) vorhanden sind. Der Stalk dieser Deletionsvariante besteht jedoch nur noch aus 4 Aminosäuren, was dazu führen kann, dass die Protease wahrscheinlich durch sterische Hinderungen keinen Zugang mehr zu der Schnittstelle hat (Abbildung 4.1).

4. Diskussion

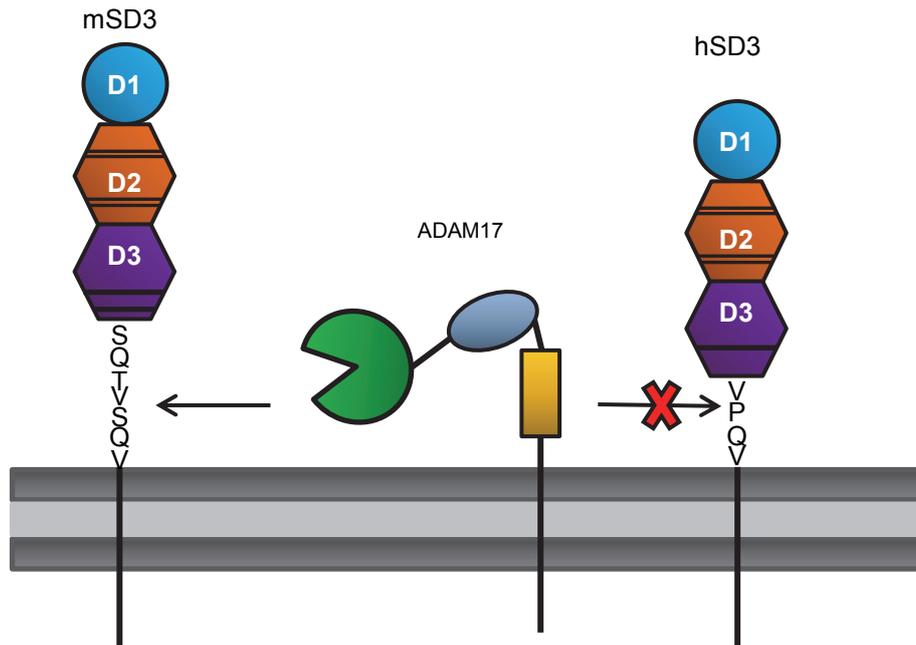


Abbildung 4.1: Einfluss der sterischen Hinderung auf die Proteolyse. Gezeigt wird die murine Stalkdeletionsvariante mSD3 (links) und die humane Variante hSD3 (rechts). Beide Rezeptoren bestehen aus den Domänen D1, D2 und D3. Die Duplikation des WQPWS Motivs des murinen IL-23R ist durch 2 schwarze Balken in der D3 Domäne dargestellt. Die Aminosäuresequenz beschreibt die verbleibende Stalkregion. ADAM17 (Mitte) spaltet noch mSD3 aber nicht mehr hSD3.

Der Stalk der Deletionsvariante mSD3 des murinen IL-23R, die noch prozessiert wird, besteht aus 7 Aminosäuren. Dies könnte reichen, um der Protease Zugang zu der Schnittstelle zu ermöglichen. Darüber hinaus enthält die murine D3 Domäne eine Duplikation des C-terminalen WQPWS Motivs, die der humane Rezeptor nicht hat, wodurch vielleicht die Schnittstelle des murinen Rezeptors in der mSD3 Variante besser zugänglich ist. Vermutlich ist die dublierte Region unstrukturiert und verlängert dadurch die Stalkregion (Abbildung 4.1).

Neben der Schnittstelle sind auch die dreidimensionale Struktur und die Interaktion der Protease mit anderen Regionen des Substrates für die Prozessierung essentiell. Antikörper, die gegen CD40 und HB-EGF gerichtet sind und entfernt von der Schnittstelle binden, waren in der Lage, das *Shedding* dieser Substrate durch ADAM17 zu inhibieren, obwohl die Schnittstelle frei zugänglich war (Hansen et al. 2004; Hamaoka et al. 2010).

Für die Interaktion der murinen ADAM-Protease mit dem humanen IL-23R wurden die Domänen D1 und D3 des IL-23R als essentielle Regionen identifiziert. Für die Domäne D2 konnte keine Interaktion nachgewiesen werden (s. Abb. 4.2). Auch die Stalkregion, die

4. Diskussion

intrazelluläre Domäne und die Transmembranregion sind für die Interaktion zwischen der Protease und dem IL-23R nicht essentiell.

Die Vermutung liegt nahe, dass der lösliche IL-23R eine antagonistische Funktion für die IL-23 vermittelte Signalweiterleitung hat. Eine agonistische Wirkung, wie sie bei dem löslichen IL-6R zu finden ist, kann für den IL-23R ausgeschlossen werden, da die Signaltransduktion des IL-23 über die intrazelluläre Domäne des IL-23R weitergeleitet wird (Floss et al. 2015). Daher löst dieser, nachdem er freigesetzt wurde und IL-23 gebunden hat, keine Signale in anderen Zellen aus (s. Abb. 4.2).

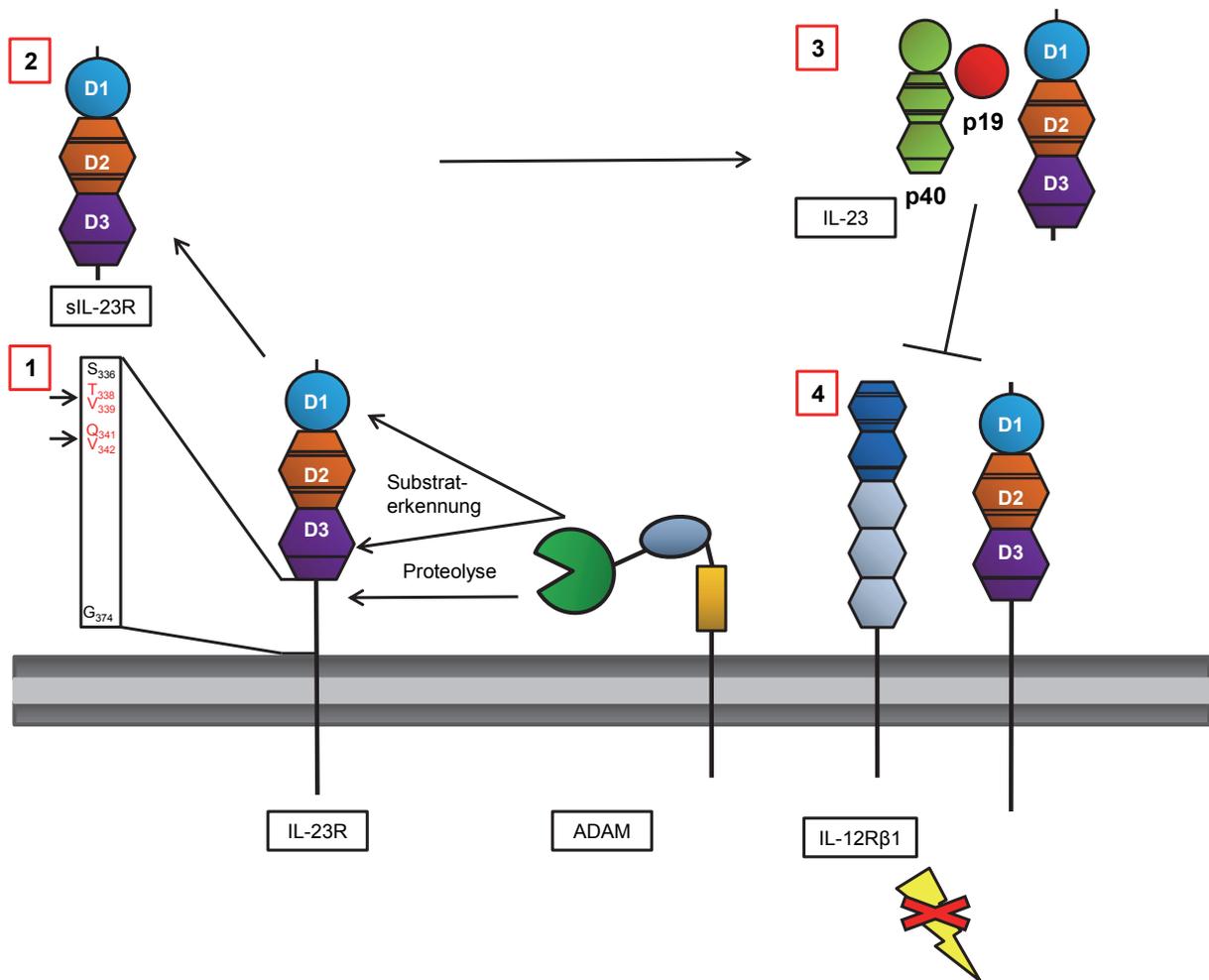


Abbildung 4.2: Auswirkung der Proteolyse des IL-23R. 1: ADAM17prozessiert den murinen IL-23R nach einer Interaktion mit den Domänen D1 und D3, zwischen den Aminosäuren T₃₃₈V₃₃₉ oder Q₃₄₁V₃₄₂ (rote Aminosäuren). 2: Durch die Prozessierung wird der Rezeptor von der Oberfläche entfernt und es wird sIL-23R gebildet. 3: Dieser lösliche Rezeptor bindet das Zytokin IL-23, welches aus p19 und p40 besteht. 4: Das *Shedding* beeinflusst die IL-23 Signale auf zwei Arten. Als erstes wird die Oberflächenexpression des IL-23R reduziert, was zur Folge hat, dass die Zelle nicht mehr so sensitiv auf IL-23 reagiert. Zweitens bindet sIL-23R das IL-23 und wirkt dadurch als kompetitiver Inhibitor.

4. Diskussion

Das IL-6 *Signaling* erfolgt nach Bindung des IL-6 an den IL-6R, woraufhin zwei Glykoproteine gp130 rekrutiert werden, welche die Signale weiterleiten. Der lösliche IL-6R bindet ebenfalls das IL-6 und löst dadurch auch eine Signaltransduktion in Zellen aus, die den IL-6R nicht exprimieren (Rose-John 2012). Die Signalweiterleitung des IL-23 verläuft jedoch über den intrazellulären Bereich der IL-23 Rezeptoren und nicht über den Co-Rezeptor IL-12R β 1 ab.

Ob der proteolytisch generierte, lösliche IL-23R die IL-23-induzierte Proliferation blockiert, wurde in dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Jedoch war die Konzentration des löslichen IL-23R im Überstand zu gering, um die IL-23 vermittelte Signalweiterleitung zu inhibieren (Daten nicht gezeigt). Anhand der Analysen der löslichen Rezeptorvariante, die durch alternatives Splicing gebildet wird (*IL23RA9*), wurde gezeigt, dass die Bildung des sIL-23R zu einer verminderten Expression der Th17 Zytokine, IL-17A und IL-17F führt. Dies liegt sowohl an der resultierenden Reduktion der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche, als auch an der Reduzierung des freien IL-23 durch die Bindung mit dem sIL-23R (Yu and Gallagher 2010; Yu et al. 2015). Die SNP Variante rs11209026 (R381Q), die die lösliche Splicevariante (*IL23RA9*) des IL-23R bildet, hat einen bisher unentschlüsselten protektiven Effekt auf verschiedene Krankheiten, wie Morbus Crohn und Ulcerative Colitis (Duerr et al. 2006; Yu et al. 2015). Auch Mäuse, die mit rekombinantem, löslichen hIL-23R-CHR (*cytokine-binding homology region*) behandelt wurden, zeigten durch die Inhibition der IL-23-Signaltransduktion und der dadurch reduzierten Th17- Entwicklung und verminderter IL-17 Genexpression eine Resistenz gegenüber EAE. Dieser protektive Effekt wird durch eine Unterdrückung von Entzündungsreaktionen im zentralen Nervensystem und verminderter Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen vermittelt (Guo et al. 2014). Die gezielte Proteolyse des IL-23R würde demnach einen möglichen neuen therapeutischen Ansatz zur Behandlung von Th17-vermittelten Krankheiten bieten, weil neben der Freisetzung des löslichen antagonistischen Rezeptors, gleichzeitig auch die Oberflächenexpression des IL-23R herabgesetzt werden würde.

4.3 Der IgM Rezeptor Toso ist ein neues Substrat für ADAM10 und ADAM17

Das Toso Protein, was auch unter den Bezeichnungen FAIM3 und Fc μ R bekannt ist, ist ein IgM Rezeptor, der hauptsächlich auf B- und T-Zellen exprimiert wird. Bei Analysen wurde neben dem 60 kDa großen Toso auch ein ca. 40 kDa großes Protein detektiert. Bei Patienten, die an Chronisch-Lymphatischer Leukämie (CLL) leiden, wurde dieses lösliche 40 kDa große Toso im Serum nachgewiesen. Eine Arbeit deutet darauf hin, dass lösliches Toso durch alternatives Splicing gebildet wird (Li et al. 2011b). Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung, ob lösliches Toso auch durch eine proteolytische Spaltung generiert wird.

Genau wie für die Analyse des IL-23R wurden Zellen mit PMA, für eine Aktivierung von ADAM17, oder Ionomycin, als Aktivator von ADAM10, stimuliert. Zur Spezifizierung der Proteasen kamen wieder die beiden Inhibitoren GI und GW zum Einsatz. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass das Toso Protein sowohl von ADAM17, als auch von ADAM10 prozessiert wird (s. Abb. 4.3). Durch das Fusionsprotein aus Toso und der Transmembran- und intrazellulären Domäne des IL-6R wurde bewiesen, dass die intrazelluläre Domäne (ICD) des Toso Proteins nicht essentiell für das *Shedding* ist, weil auch dieses Fusionsprotein gespalten wurde. Dies ist auch nicht weiter verwunderlich, weil schon für den IL-6R gezeigt wurde, dass die ICD für das PMA-induzierte *Shedding* nicht notwendig ist (Müllberg et al. 1994a). Auch die Ig-Domäne des Proteins scheint für die Substraterkennung oder das *Shedding* nicht wichtig zu sein. Die Ig-Domäne ist die einzige, extrazelluläre Domäne von Toso. Bei dem IL-23R (in dieser Arbeit) oder dem IL-6R erfolgt die Substraterkennung der ADAM-Proteasen durch Regionen im Substrat, die distal der Schnittstelle liegen (Garbers 2011). Es besteht natürlich die Möglichkeit, dass die Erkennung des Substrates durch eine andere Region oder durch die bisher noch nicht ermittelte Schnittstelle, vermittelt wird. Dies muss durch weitere Untersuchungen an dem Rezeptor herausgefunden werden.

Durch die Deletionsvariante Toso Δ 50, sollte die Schnittstelle der Protease eingegrenzt werden. Bei dieser Deletionsvariante, die weiterhin von ADAM17 jedoch nicht mehr von ADAM10 prozessiert wurde, wurden 50 Aminosäuren in der Stalkregion, ausgehend von der Transmembrandomäne, deletiert. Dies bedeutet, dass ADAM17 eine Schnittstelle verwendet, die weiter als 50 Aminosäuren von der Membran entfernt liegt, was sehr ungewöhnlich ist,

4. Diskussion

weil für andere Substrate, wie CD16 oder dem IL-6R die Schnittstelle wesentlich näher an der Membran liegt. CD16 wird in einer Region gespalten, die 7 Aminosäuren von der Membran entfernt liegt. Die Schnittstelle des IL-6R für ADAM17 liegt 10 Aminosäuren von der Membran entfernt, die Schnittstelle für ADAM10 liegt noch näher an der Membran (Baran et al. 2013; Jing et al. 2015).

Daher ist es wahrscheinlicher, dass ADAM17 durch die Verkürzung der Stalkregion Zugang zu einer alternativen Schnittstelle bekommt und diese nutzt. Dies erklärt auch, warum das lösliche Toso Δ 50 kleiner ist, als lösliches Toso. Der genaue Vorgang der Prozessierung und die Regionen in denen der Rezeptor geschnitten wird, müssen noch weiter untersucht werden.

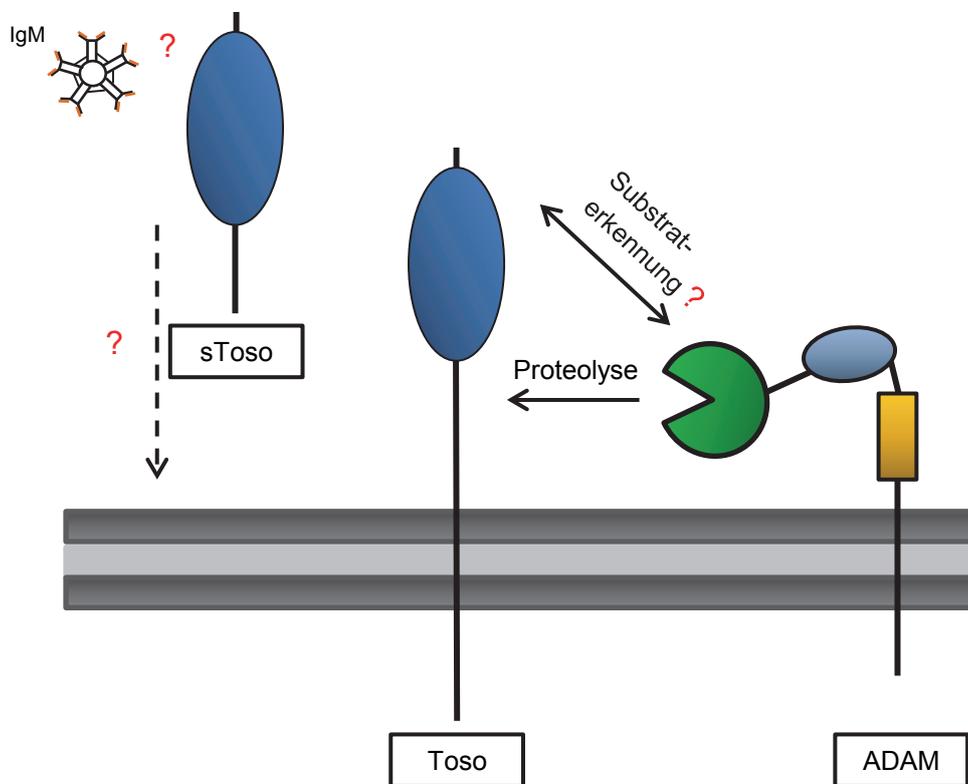


Abbildung 4.3: Proteolyse des IgM Rezeptors Toso. Nach einer nicht aufklärten Interaktion zwischen dem Rezeptor und der ADAM Protease wird der IgM Rezeptor Toso in einer unbekanntenen Region geschnitten. Dadurch wird lösliches Toso freigesetzt. Ob dieser lösliche Rezeptor immer noch IgM binden kann und welche Auswirkung das *Shedding* des Toso Rezeptors auf die Zelle hat, muss noch untersucht werden.

Sowohl in dieser Arbeit, als auch in der Arbeitsgruppe von Li wurde lösliches Toso nachgewiesen. Die Bildung dieser Varianten wird von Li auf alternatives Splicing (Li et al. 2011b) und in dieser Arbeit auf die proteolytische Spaltung zurückgeführt. Die Funktion des

4. Diskussion

löslichen Toso ist weiterhin unbekannt (s. Abb. 4.3). Eine verringerte Menge an IgM wurde im Serum von CLL-Patienten, in denen das erste Mal der Nachweis des löslichen Toso erfolgte, detektiert. Es ist aber unklar, ob die erhöhte Rezeptorexpression auf CLL B-Zellen oder der lösliche Rezeptor an diesem Effekt beteiligt sind (Li et al. 2011b). Die Vermutung liegt nahe, dass lösliches Toso nicht als agonistischer Rezeptor wirkt, weil keine Co-Rezeptoren von Toso bekannt sind und sehr wahrscheinlich die intrazelluläre Domäne des Rezeptors der Signaltransduktion dient. Die genauen Abläufe der Signaltransduktion sind zwar noch unbekannt, jedoch wurden Phosphorylierungen an Tyrosin- und Serin-Resten nach einer Bindung des IgM detektiert (Kubagawa et al. 2009; Murakami et al. 2012).

Eine erhöhte Toso-Expression auf den CLL-Zellen korreliert mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf. Dadurch bietet die Freisetzung des Tosos durch alternatives Splicing oder Proteolyse einen möglichen therapeutischen Ansatz um den Krankheitsverlauf der Chronisch-Lymphatischen Leukämie abzumildern. Der lösliche Rezeptor konnte bisher nur im Serum erkrankter Personen detektiert werden. Ob der detektierte Serumlevel des löslichen Toso auch mit der Schwere der Erkrankung zusammenhängt, müssen weitere Versuche klären. Die Analyse der Oberflächenexpression und der Serumkonzentration des Tosos können eine Möglichkeit darstellen, CLL besser zu detektieren und das Krankheitsstadium zu analysieren.

5 Zusammenfassung

ADAM Proteasen sind als Regulatoren an vielen biologischen Vorgängen beteiligt. So haben sie Einfluss auf physiologische Prozesse in der Entwicklung, der Regeneration und der Immunantwort. Die Hauptfunktion der katalytisch aktiven ADAM-Proteasen ist die Überführung membrangebundener Proteine in lösliche Proteine durch sogenanntes *Shedding*. Bisher konnte weder die genaue Regulation des *Sheddings*, noch alle Substrate der Proteasen entschlüsselt werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass SAP97, als beschriebener Interaktionspartner der ADAM Proteasen, einen Einfluss auf die ADAM17-, aber nicht ADAM10-vermittelte Prozessierung des IL-6R hat. Dieser Effekt wurde weder durch eine Veränderung der Oberflächenexpression der Protease oder des Substrates, noch durch eine Einwirkung bei der Reifung von ADAM17, vermittelt.

Die Analysen des *Sheddings* zeigten, dass der IL-23R und der IgM Rezeptor Toso/Fc μ R sowohl von ADAM10, als auch von ADAM17 prozessiert und die löslichen Rezeptoren somit nicht nur durch alternatives Splicing entstehen.

Der humane und der murine IL-23R werden von ADAM17 nach einer Stimulation mit PMA und konstitutiv von ADAM10 prozessiert. Der resultierende lösliche IL-23R bindet weiterhin das Zytokin IL-23. Für den murinen IL-23R wurden zwei konservierte Valine (V₃₃₉ und V₃₄₂) als potentielle Schnittstelle von ADAM17 identifiziert. Ein Austausch dieser Aminosäuren gegen Asparaginsäure reduzierte das PMA-induzierte und konstitutive *Shedding*. Als verantwortliche Domänen der Interaktion zwischen der ADAM Protease und dem IL-23R wurden die extrazellulären Domänen D1 und D3 des IL-23R identifiziert.

Die Analyse des IgM Rezeptors Toso belegt, dass dieser sowohl von ADAM10, als auch von ADAM17 prozessiert wird und dass die lösliche Form somit nicht nur durch alternatives Splicing, sondern auch durch Proteolyse gebildet wird. Die intrazelluläre und die Ig-Domäne des Rezeptors sind für die PMA- und Ionomycin-induzierte Proteolyse nicht essentiell.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die ADAM17-vermittelte Proteolyse des IL-6R durch SAP97 reguliert wird und dass die beiden Rezeptoren IL-23R und Toso sowohl von ADAM10, als auch von ADAM17 prozessiert werden. Diese Ergebnisse bieten eine Grundlage, um weitere Einflüsse auf die pathologischen Auswirkungen der Substrate und

Regulationsmechanismen der ADAM Proteasen zu untersuchen und erweitern außerdem das Substratspektrum der ADAM Proteasen.

6 Summary

ADAM proteases are crucial regulators of a plethora of biological processes. They have an influence on physiological processes during development, regeneration and immune responses. The main function of catalytic active ADAM proteases is ectodomain shedding which leads to a release of membrane-bound proteins. So far, neither the exact regulation of shedding, nor all substrates of proteases could be decrypted.

This work shows that SAP97, a known interaction partner of ADAM proteases, has an impact on the ADAM17 but not ADAM10 mediated proteolysis of the IL-6R. This effect was neither mediated by changes in the surface expression of the protease or the substrate, nor by affecting the maturation of ADAM17.

Proteolytic analysis showed that the IgM receptor Toso/Fc μ R and the IL-23 receptor are novel substrates of ADAM10 and ADAM17, adding an alternative way for the generation of soluble IL-23R and sToso in addition to alternative splicing.

The human and murine IL-23R are cleaved inducibly by ADAM17 and constitutively by ADAM10. The resulting sIL-23R still had IL-23 binding activity. For the murine IL-23R two conserved valine residues (V₃₃₉ and V₃₄₂) were identified as potential cleavage sites of ADAM17. An exchange of valine to aspartic acid reduced the PMA-induced and constitutive shedding. The interaction of the ADAM protease with the IL-23R is mediated by the extracellular domains, D1 and D3 of IL-23R.

Shedding analyses of the IgM receptor Toso demonstrated that it can be processed by both ADAM10 and ADAM17. The intracellular and the Ig-domain of the receptor appeared not to be essential for ADAM10 and ADAM17 mediated proteolysis.

In summary, this work shows that the ADAM17-mediated proteolysis of IL-6R can be regulated by SAP97 and that the two receptors IL-23R and Toso/Fc μ R are substrates of ADAM10 as well as ADAM17.

These results provide further insights into ADAM biology, the effect on the pathogenesis of the substrates and broaden the substrate spectrum of ADAM proteases.

Literaturverzeichnis

- Abel, S., C. Hundhausen, R. Mentlein, A. Schulte, T. A. Berkhout, N. Broadway, D. Hartmann, R. Sedlacek, S. Dietrich, B. Muetze, B. Schuster, K. J. Kallen, P. Saftig, S. Rose-John and A. Ludwig** (2004). "The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10." *Journal of immunology* 172(10): 6362-6372.
- Aitio, O., M. Hellman, A. Kazlauskas, D. F. Vingadassalom, J. M. Leong, K. Saksela and P. Permi** (2010). "Recognition of tandem PxxP motifs as a unique Src homology 3-binding mode triggers pathogen-driven actin assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(50): 21743-21748.
- Akiyama, H., M. C. Chaboissier, J. F. Martin, A. Schedl and B. de Crombrughe** (2002). "The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6." *Genes & development* 16(21): 2813-2828.
- Ali, N. and V. Knaüper** (2007). "Phorbol ester-induced shedding of the prostate cancer marker transmembrane protein with epidermal growth factor and two follistatin motifs 2 is mediated by the disintegrin and metalloproteinase-17." *The journal of biological chemistry* 282(52): 37378-37388.
- Althoff, K., P. Reddy, N. Voltz, S. Rose-John and J. Müllberg** (2000). "Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins." *European journal of biochemistry / FEBS* 267(9): 2624-2631.
- Amour, A., C. G. Knight, A. Webster, P. M. Slocombe, P. E. Stephens, V. Knäuper, A. J. Docherty and G. Murphy** (2000). "The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3." *FEBS letters* 473(3): 275-279.
- Amour, A., P. M. Slocombe, A. Webster, M. Butler, C. G. Knight, B. J. Smith, P. E. Stephens, C. Shelley, M. Hutton, V. Knauper, A. J. Docherty and G. Murphy** (1998). "TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3." *FEBS letters* 435(1): 39-44.
- Anders, A., S. Gilbert, W. Garten, R. Postina and F. Fahrenholz** (2001). "Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15(10): 1837-1839.
- Arduise, C., T. Abache, L. Li, M. Billard, A. Chabanon, A. Ludwig, P. Mauduit, C. Boucheix, E. Rubinstein and F. Le Naour** (2008). "Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor." *Journal of immunology* 181(10): 7002-7013.
- Baker, A. H., D. R. Edwards and G. Murphy** (2002). "Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities." *Journal of cell science* 115(19): 3719-3727.
- Baran, P., R. Nitz, J. Grötzinger, J. Scheller and C. Garbers** (2013). "Minimal interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling." *The Journal of biological chemistry* 288(21): 14756-14768.

- Bech-Serra, J. J., B. Santiago-Josefat, C. Esselens, P. Saftig, J. Baselga, J. Arribas and F. Canals** (2006). "Proteomic identification of desmoglein 2 and activated leukocyte cell adhesion molecule as substrates of ADAM17 and ADAM10 by difference gel electrophoresis." *Molecular and cellular biology* 26(13): 5086-5095.
- Bender, M., S. Hofmann, D. Stegner, A. Chalaris, M. Bosl, A. Braun, J. Scheller, S. Rose-John and B. Nieswandt** (2010). "Differentially regulated GPVI ectodomain shedding by multiple platelet-expressed proteinases." *Blood* 116(17): 3347-3355.
- Benson, J. M., C. W. Sachs, G. Treacy, H. Zhou, C. E. Pendley, C. M. Brodmerkel, G. Shankar and M. A. Mascelli** (2011). "Therapeutic targeting of the IL-12/23 pathways: generation and characterization of ustekinumab." *Nature biotechnology* 29(7): 615-624.
- Bergmeier, W., C. L. Piffath, G. Cheng, V. S. Dole, Y. Zhang, U. H. von Andrian and D. D. Wagner** (2004). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates GPIIb/alpha shedding from platelets in vitro and in vivo." *Circulation research* 95(7): 677-683.
- Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March and D. P. Cerretti** (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." *Nature* 385(6618): 729-733.
- Blobel, C. P.** (2005). "ADAMs: key components in EGFR signalling and development." *Nature reviews. Molecular cell biology* 6(1): 32-43.
- Blume, K. E., S. Soeroes, H. Keppeler, S. Stevanovic, D. Kretschmer, M. Rautenberg, S. Wesselborg and K. Lauber** (2012). "Cleavage of annexin A1 by ADAM10 during secondary necrosis generates a monocytic "find-me" signal." *Journal of immunology* 188(1): 135-145.
- Bobby, R., P. Robustelli, A. V. Kralicek, M. Mobli, G. F. King, J. Grötzinger and A. J. Dingley** (2014). "Functional implications of large backbone amplitude motions of the glycoprotein 130-binding epitope of interleukin-6." *The FEBS journal* 281(10): 2471-2483.
- Bode, W., F. X. Gomis-Rüth and W. Stöckler** (1993). "Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'." *FEBS letters* 331(1-2): 134-140.
- Bouillot, S., E. Tillet, G. Carmona, M. H. Prandini, A. S. Gauchez, P. Hoffmann, N. Alfaidy, F. Cand and P. Huber** (2011). "Protocadherin-12 cleavage is a regulated process mediated by ADAM10 protein: evidence of shedding up-regulation in pre-eclampsia." *The journal of biological chemistry* 286(17): 15195-15204.
- Boulanger, M. J., D. C. Chow, E. E. Brevnova and K. C. Garcia** (2003). "Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex." *Science* 300(5628): 2101-2104.
- Boutet, P., S. Agüera-González, S. Atkinson, C. J. Pennington, D. R. Edwards, G. Murphy, H. T. Reyburn and M. Valés-Gómez** (2009). "Cutting edge: the metalloproteinase ADAM17/TNF-alpha-converting enzyme regulates proteolytic shedding of the MHC class I-related chain B protein." *Journal of immunology* 182(1): 49-53.

- Bravo, J. and J. K. Heath** (2000). "Receptor recognition by gp130 cytokines." *The EMBO journal* 19(11): 2399-2411.
- Bray, S.** (2000a). "Notch." *Current biology* : CB 10(12): R433-435.
- Bray, S.** (2000b). "Notch." *Current biology* 10(12): R433-435.
- Brou, C., F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J. R. Doedens, A. Cumano, P. Roux, R. A. Black and A. Israël** (2000). "A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE." *Molecular cell* 5(2): 207-216.
- Buxbaum, J. D., K. N. Liu, Y. Luo, J. L. Slack, K. L. Stocking, J. J. Peschon, R. S. Johnson, B. J. Castner, D. P. Cerretti and R. A. Black** (1998). "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." *The journal of biological chemistry* 273(43): 27765-27767.
- Caescu, C. I., G. R. Jeschke and B. E. Turk** (2009). "Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10." *The biochemical journal* 424(1): 79-88.
- Canault, M., K. Certel, D. Schatzberg, D. D. Wagner and R. O. Hynes** (2010). "The lack of ADAM17 activity during embryonic development causes hemorrhage and impairs vessel formation." *PloS one* 5(10): e13433.
- Cao, Y., Q. Kang, Z. Zhao and A. Zolkiewska** (2002). "Intracellular processing of metalloprotease disintegrin ADAM12." *The journal of biological chemistry* 277(29): 26403-26411.
- Capon, F., P. Di Meglio, J. Szaub, N. J. Prescott, C. Dunster, L. Baumber, K. Timms, A. Gutin, V. Abkevic, A. D. Burden, J. Lanchbury, J. N. Barker, R. C. Trembath and F. O. Nestle** (2007). "Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis." *Human genetics* 122(2): 201-206.
- Cargill, M., S. J. Schrodi, M. Chang, V. E. Garcia, R. Brandon, K. P. Callis, N. Matsunami, K. G. Ardlie, D. Civello, J. J. Catanese, D. U. Leong, J. M. Panko, L. B. McAllister, C. B. Hansen, J. Papenfuss, S. M. Prescott, T. J. White, M. F. Leppert, G. G. Krueger and A. B. Begovich** (2007). "A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes." *American journal of human genetics* 80(2): 273-290.
- Case, R. D., E. Piccione, G. Wolf, A. M. Benett, R. J. Lechleider, B. G. Neel and S. E. Shoelson** (1994). "SH-PTP2/Syp SH2 domain binding specificity is defined by direct interactions with platelet-derived growth factor beta-receptor, epidermal growth factor receptor, and insulin receptor substrate-1-derived phosphopeptides." *The journal of biological chemistry* 269(14): 10467-10474.
- Cerretti, D. P., K. Poindexter, B. J. Castner, G. Means, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, R. A. Black and N. Nelson** (1999). "Characterization of the cDNA and gene for mouse tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) and its location to mouse chromosome 12 and human chromosome 2p25." *Cytokine* 11(8): 541-551.
- Chalaris, A., N. Adam, C. Sina, P. Rosenstiel, J. Lehmann-Koch, P. Schirmacher, D. Hartmann, J. Cichy, O. Gavrilova, S. Schreiber, T. Jostock, V. Matthews, R. Häslner, C. Becker, M. F. Neurath, K. Reiss, P. Saftig, J. Scheller and S. Rose-John** (2010a). "Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal

- inflammation and regeneration in mice." *The journal of experimental medicine* 207(8): 1617-1624.
- Chalaris, A., C. Garbers, B. Rabe, S. Rose-John and J. Scheller** (2011). "The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer." *European journal of cell biology* 90(6-7): 484-494.
- Chalaris, A., J. Gewiese, K. Paliga, L. Fleig, A. Schneede, K. Krieger, S. Rose-John and J. Scheller** (2010b). "ADAM17-mediated shedding of the IL6R induces cleavage of the membrane stub by gamma-secretase." *Biochimica et biophysica acta* 1803(2): 234-245.
- Chalaris, A., B. Rabe, K. Paliga, H. Lange, T. Laskay, C. A. Fielding, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller** (2007). "Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils." *Blood* 110(6): 1748-1755.
- Chan, J. R., W. Blumenschein, E. Murphy, C. Diveu, M. Wiekowski, S. Abbondanzo, L. Lucian, R. Geissler, S. Brodie, A. B. Kimball, D. M. Gorman, K. Smith, R. de Waal Malefyt, R. A. Kastelein, T. K. McClanahan and E. P. Bowman** (2006). "IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis." *The Journal of experimental medicine* 203(12): 2577-2587.
- Chavaroche, A., M. Cudic, M. Giulianotti, R. A. Houghten, G. B. Fields and D. Minond** (2014). "Glycosylation of a disintegrin and metalloprotease 17 affects its activity and inhibition." *Analytical biochemistry* 449: 68-75.
- Chen, C. D., S. Podvin, E. Gillespie, S. E. Leeman and C. R. Abraham** (2007). "Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17." *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 104(50): 19796-19801.
- Chen, Z., A. Laurence, Y. Kanno, M. Pacher-Zavisin, B. M. Zhu, C. Tato, A. Yoshimura, L. Hennighausen and J. J. O'Shea** (2006). "Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells." *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 103(21): 8137-8142.
- Chognard, G., L. Bellemare, A. N. Pelletier, M. C. Dominguez-Punaro, C. Beauchamp, M. J. Guyon, G. Charron, N. Morin, D. Sivanesan, V. Kuchroo, R. Xavier, S. W. Michnick, S. Chemtob, J. D. Rioux and S. Lesage** (2014). "The dichotomous pattern of IL-12r and IL-23R expression elucidates the role of IL-12 and IL-23 in inflammation." *PloS one* 9(2): e89092.
- Choi, S. C., H. Wang, L. Tian, Y. Murakami, D. M. Shin, F. Borrego, H. C. Morse, 3rd and J. E. Coligan** (2013). "Mouse IgM Fc receptor, FCMR, promotes B cell development and modulates antigen-driven immune responses." *Journal of immunology* 190(3): 987-996.
- Chow, J. P., A. Fujikawa, H. Shimizu, R. Suzuki and M. Noda** (2008). "Metalloproteinase- and gamma-secretase-mediated cleavage of protein-tyrosine phosphatase receptor type Z." *The journal of biological chemistry* 283(45): 30879-30889.
- Clausen, B. E., C. Burkhardt, W. Reith, R. Renkawitz and I. Förster** (1999). "Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice." *Transgenic research* 8(4): 265-277.

- Coleman, H. A., J. P. Labrador, R. K. Chance and G. J. Bashaw** (2010). "The Adam family metalloprotease Kuzbanian regulates the cleavage of the roundabout receptor to control axon repulsion at the midline." *Development* 137(14): 2417-2426.
- Colledge, M., R. A. Dean, G. K. Scott, L. K. Langeberg, R. L. Haganir and J. D. Scott** (2000). "Targeting of PKA to glutamate receptors through a MAGUK-AKAP complex." *Neuron* 27(1): 107-119.
- Contin, C., V. Pitard, T. Itai, S. Nagata, J. F. Moreau and J. Déchanet-Merville** (2003). "Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling." *The journal of biological chemistry* 278(35): 32801-32809.
- Cua, D. J., Y. Chen and C. A. Murphy** (2003). "Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain " *Nature* 421(6924): 744-748.
- Daëron, M.** (1997). "Fc receptor biology." *Annual review of immunology* 15: 203-234.
- Dewitz, C., K. Moller-Hackbarth, O. Schweigert, K. Reiss, A. Chalaris, J. Scheller and S. Rose-John** (2014). "T-cell immunoglobulin and mucin domain 2 (TIM-2) is a target of ADAM10-mediated ectodomain shedding." *The FEBS journal* 281(1): 157-174.
- Di Cesare, A., P. Di Meglio and F. O. Nestle** (2009). "The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis." *The journal of investigative dermatology* 129(6): 1339-1350.
- Díaz-Rodríguez, E., N. Cabrera, A. Esparís-Ogando, J. C. Montero and A. Pandiella** (1999). "Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms." *The european journal of neuroscience* 11(4): 1421-1430.
- Díaz-Rodríguez, E., J. C. Montero, A. Esparís-Ogando, L. Yuste and A. Pandiella** (2002). "Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding." *Molecular biology of the cell* 13(6): 2031-2044.
- Doedens, J. R. and R. A. Black** (2000). "Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme." *The journal of biological chemistry* 275(19): 14598-14607.
- Dolnik, O., V. Volchkova, W. Garten, C. Carbonnelle, S. Becker, J. Kahnt, U. Ströher, H. D. Klenk and V. Volchkov** (2004). "Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus." *The EMBO journal* 23(10): 2175-2184.
- Donmez, G., D. Wang, D. E. Cohen and L. Guarente** (2010). "SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha-secretase gene ADAM10." *Cell* 142(2): 320-332.
- Donners, M. M., I. M. Wolfs, S. Olieslagers, Z. Mohammadi-Motahhari, V. Tchaikovski, S. Heeneman, J. D. van Buul, V. Caolo, D. G. Molin, M. J. Post and J. Waltenberger** (2010). "A disintegrin and metalloprotease 10 is a novel mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell function in angiogenesis and is associated with atherosclerosis." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30(11): 2188-2195.
- Drey Mueller, D., S. Uhlig and A. Ludwig** (2015). "ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets." *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 308(4): L325-343.

- Duerr, R. H., K. D. Taylor, S. R. Brant, J. D. Rioux, M. S. Silverberg, M. J. Daly, A. H. Steinhart, C. Abraham, M. Regueiro, A. Griffiths, T. Dassopoulos, A. Bitton, H. Yang, S. Targan, L. W. Datta, E. O. Kistner, L. P. Schumm, A. T. Lee, P. K. Gregersen, M. M. Barmada, J. I. Rotter, D. L. Nicolae and J. H. Cho (2006).** "A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene." *Science* 314(5804): 1461-1463.
- Durant, L., W. T. Watford, H. L. Ramos, A. Laurence, G. Vahedi, L. Wei, H. Takahashi, H. W. Sun, Y. Kanno, F. Powrie and J. J. O'Shea (2010).** "Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis." *Immunity* 32(5): 605-615.
- Düsterhöft, S., K. Höbel, M. Oldefest, J. Lokau, G. H. Waetzig, A. Chalaris, C. Garbers, J. Scheller, S. Rose-John, I. Lorenzen and J. Grötzinger (2014).** "A disintegrin and metalloprotease 17 dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor." *The journal of biological chemistry* 289(23): 16336-16348.
- Düsterhöft, S., S. Jung, C. W. Hung, A. Tholey, F. D. Sönnichsen, J. Grötzinger and I. Lorenzen (2013).** "Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase." *Journal of the american chemical society* 135(15): 5776-5781.
- Dyczynska, E., D. Sun, H. Yi, A. Sehara-Fujisawa, C.P. Blobel and A. Zolkiewska (2007).** "Proteolytic processing of delta-like 1 by ADAM proteases." *The journal of biological chemistry* 282(1): 436-444.
- Ebsen, H., M. Lettau, D. Kabelitz and O. Janssen (2015).** "Subcellular localization and activation of ADAM proteases in the context of FasL shedding in T lymphocytes." *Molecular immunology* 65(2): 416-428.
- Edwards, D. R., M. M. Handsley and C. J. Pennington (2008).** "The ADAM metalloproteinases." *Molecular aspects of medicine* 29(5): 258-289.
- Eichenauer, D. A., V. L. Simhadri, E. P. von Strandmann, A. Ludwig, V. Matthews, K. S. Reiners, B. von Tresckow, P. Saftig, S. Rose-John, A. Engert and H. P. Hansen (2007).** "ADAM10 inhibition of human CD30 shedding increases specificity of targeted immunotherapy in vitro." *Cancer research* 67(1): 332-338.
- Elias, G. M., L. Funke, V. Stein, S. G. Grant, D. S. Bredt and R. A. Nicoll (2006).** "Synapse-specific and developmentally regulated targeting of AMPA receptors by a family of MAGUK scaffolding proteins." *Neuron* 52(2): 307-320.
- Endres, K., A. Anders, E. Kojro, S. Gilbert, F. Fahrenholz and R. Postina (2003).** "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation." *European journal of biochemistry* 270(11): 2386-2393.
- Endres, K. and F. Fahrenholz (2010).** "Upregulation of the alpha-secretase ADAM10--risk or reason for hope?" *The FEBS journal* 277(7): 1585-1596.
- Escrevente, C., V. A. Morais, S. Keller, C. M. Soares, P. Altevogt and J. Costa (2008).** "Functional role of N-glycosylation from ADAM10 in processing, localization and activity of the enzyme." *Biochimica et biophysica acta* 1780(6): 905-913.
- Esselens, C. W., J. Malapeira, N. Colomé, M. Moss, F. Canals and J. Arribas (2008).** "Metastasis-associated C4.4A, a GPI-anchored protein cleaved by ADAM10 and ADAM17." *Biological chemistry* 389(8): 1075-1084.

- Etzerodt, A., M. B. Maniecki, K. Møller, H. J. Møller and S. K. Moestrup** (2010). "Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163." *Journal of leukocyte biology* 88(6): 1201-1205.
- Eulenfeld, R., A. Dittrich, C. Khouri, P. J. Müller, B. Mütze, A. Wolf and F. Schaper** (2012). "Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs." *European journal of cell biology* 91(6-7): 486-495.
- Fabre-Lafay, S., S. Garrido-Urbani, N. Reymond, A. Gonçalves, P. Dubreuil and M. Lopez** (2005). "Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM-17." *The journal of biological chemistry* 280(20): 19543-19550.
- Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J. P. Brakenhoff, K. J. Kallen, A. Wollmer, J. Grötzinger and S. Rose-John** (1997). "I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion." *Nature biotechnology* 15(2): 142-145.
- Fleck, D., F. van Bebber, A. Colombo, C. Galante, B. M. Schwenk, L. Rabe, H. Hampel, B. Novak, E. Kremmer, S. Tahirovic, D. Edbauer, S. F. Lichtenthaler, B. Schmid, M. Willem and C. Haass** (2013). "Dual cleavage of neuregulin 1 type III by BACE1 and ADAM17 liberates its EGF-like domain and allows paracrine signaling." *The journal of neuroscience : the official journal of the society for neuroscience* 33(18): 7856-7869.
- Floss, D. M., S. Mrotzek, T. Klöcker, J. Schröder, J. Grötzinger, S. Rose-John and J. Scheller** (2013). "Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor." *The Journal of biological chemistry* 288(27): 19386-19400.
- Floss, D. M., J. Schröder, M. Franke and J. Scheller** (2015). "Insights into IL-23 biology: From structure to function." *Cytokine & growth factor reviews* 26(5): 569-578.
- Fong, K. P., C. Barry, A. N. Tran, E. A. Traxler, K. M. Wannemacher, H. Y. Tang, K. D. Speicher, I. A. Blair, D. W. Speicher, T. Grosser and L. F. Brass** (2011). "Deciphering the human platelet sheddome." *Blood* 117(1): e15-26.
- Fourie, C., D. Li and J. M. Montgomery** (2014). "The anchoring protein SAP97 influences the trafficking and localisation of multiple membrane channels." *Biochimica et biophysica acta* 1838(2): 589-594.
- Franzke, C. W., K. Tasanen, H. Schäcke, Z. Zhou, K. Tryggvason, C. Mauch, P. Zigrino, S. Sunnarborg, D. C. Lee, F. Fahrenholz and L. Bruckner-Tuderman** (2002). "Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs." *The EMBO journal* 21(19): 5026-5035.
- Fukada, T., M. Hibi, Y. Yamanaka, M. Takahashi-Tezuka, Y. Fujitani, T. Yamaguchi, K. Nakajima and T. Hirano** (1996). "Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis." *Immunity* 5(5): 449-460.
- Gaffen, S. L., R. Jain, A. V. Garg and D. J. Cua** (2014). "The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing." *Nature reviews immunology* 14(9): 585-600.
- Garbers, C.** (2011). *Der Interleukin-6 Rezeptor: Spezies-spezifische Unterschiede der proteolytischen Freisetzung durch die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 zwischen Maus und Mensch* Dissertation, Christian-Albrechts-Universität.

- Garbers, C., H. M. Hermanns, F. Schaper, G. Müller-Newen, J. Grötzinger, S. Rose-John and J. Scheller** (2012). "Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines." *Cytokine & growth factor reviews* 23(3): 85-97.
- Garbers, C., N. Janner, A. Chalaris, M. L. Moss, D. M. Floss, D. Meyer, F. Koch-Nolte, S. Rose-John and J. Scheller** (2011). "Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding." *The journal of biological chemistry* 286(17): 14804-14811.
- Garton, K. J., P. J. Gough, C. P. Blobel, G. Murphy, D. R. Greaves, P. J. Dempsey and E. W. Raines** (2001). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1)." *The journal of biological chemistry* 276(41): 37993-38001.
- Garton, K. J., P. J. Gough, J. Philalay, P. T. Wille, C. P. Blobel, R. H. Whitehead, P. J. Dempsey and E. W. Raines** (2003). "Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17)." *The journal of biological chemistry* 278(39): 37459-37464.
- Gerhartz, C., E. Dittrich, T. Stoyan, S. Rose-John, K. Yasukawa, P. C. Heinrich and L. Graeve** (1994). "Biosynthesis and half-life of the interleukin-6 receptor and its signal transducer gp130." *European journal of biochemistry / FEBS* 223(1): 265-274.
- Gonzales, P. E., A. Solomon, A. B. Miller, M. A. Leesnitzer, I. Sagi and M. E. Milla** (2004). "Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain." *The journal of biological chemistry* 279(30): 31638-31645.
- Gooz, M.** (2010). "ADAM-17: the enzyme that does it all." *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 45(2): 146-169.
- Groot, A. J., R. Habets, S. Yahyanejad, C. M. Hodin, K. Reiss, P. Saftig, J. Theys and M. Vooijs** (2014). "Regulated proteolysis of NOTCH2 and NOTCH3 receptors by ADAM10 and presenilins." *Molecular and cellular biology* 34(15): 2822-2832.
- Guo, L., J. R. Eisenman, R. M. Mahimkar, J. J. Peschon, R. J. Paxton, R. A. Black and R. S. Johnson** (2002). "A proteomic approach for the identification of cell-surface proteins shed by metalloproteases." *Molecular & cellular proteomics* 1(1): 30-36.
- Guo, S., M. Peng, Q. Zhao and W. Zhang** (2012). "Role of ADAM10 and ADAM17 in CD16b shedding mediated by different stimulators." *Chinese medical sciences journal* 27(2): 73-79.
- Guo, W., C. Luo, C. Wang, Y. H. Wang, X. Wang, X. D. Gao and W. B. Yao** (2014). "Suppression of human and mouse Th17 differentiation and autoimmunity by an endogenous Interleukin 23 receptor cytokine-binding homology region." *The international journal of biochemistry & cell biology* 55: 304-310.
- Gutwein, P., S. Mechtersheimer, S. Riedle, A. Stoeck, D. Gast, S. Joumaa, H. Zentgraf, M. Fogel and D. P. Altevogt** (2003). "ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles." *FASEB journal* 17(2): 292-294.
- Hamaoka, M., I. Chinen, T. Murata, S. Takashima, R. Iwamoto and E. Mekada** (2010). "Anti-human HB-EGF monoclonal antibodies inhibiting ectodomain shedding of HB-EGF and diphtheria toxin binding." *Journal of biochemistry* 148(1): 55-69.
- Hamdy, G., H. Darweesh, E. A. Khatlab, S. Fawzy, E. Fawzy and M. Sheta** (2015). "Evidence of association of interleukin-23 receptor gene polymorphisms with Egyptian rheumatoid arthritis patients." *Human immunology* 76(6): 417-420.

- Hansen, H. P., S. Dietrich, T. Kisseleva, T. Mokros, R. Mentlein, H. H. Lange, G. Murphy and H. Lemke** (2000). "CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme." *Journal of immunology* 165(12): 6703-6709.
- Hansen, H. P., A. Recke, U. Reineke, B. Von Tresckow, P. Borchmann, E. P. Von Strandmann, H. Lange, H. Lemke and A. Engert** (2004). "The ectodomain shedding of CD30 is specifically regulated by peptide motifs in its cysteine-rich domains 2 and 5." *FASEB journal* 18(7): 893-895.
- Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, A. Lena Illert, K. von Figura and P. Saftig** (2002). "The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts." *Human molecular genetics* 11(21): 2615-2624.
- Hattori, M., M. Osterfield and J. G. Flanagan** (2000). "Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent." *Science* 289(5483): 1360-1365.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Müller-Newen and F. Schaper** (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." *The biochemical journal* 374(Pt 1): 1-20.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, G. Müller-Newen, F. Schaper and L. Graeve** (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway." *The biochemical journal* 334 (Pt 2): 297-314.
- Hermey, G., S. S. Sjøgaard, C. M. Petersen, A. Nykjær and J. Gliemann** (2006). "Tumour necrosis factor alpha-converting enzyme mediates ectodomain shedding of Vps10p-domain receptor family members." *The biochemical journal* 395(2): 285-293.
- Herzog, C., R. S. Haun, A. Ludwig, S. V. Shah and G. P. Kaushal** (2014). "ADAM10 is the major sheddase responsible for the release of membrane-associated meprin A." *The journal of biological chemistry* 289(19): 13308-13322.
- Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga and T. Kishimoto** (1990). "Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130." *Cell* 63(6): 1149-1157.
- Hikita, A., N. Tanaka, S. Yamane, Y. Ikeda, H. Furukawa, S. Tohma, R. Suzuki, S. Tanaka, H. Mitomi and N. Fukui** (2009). "Involvement of a disintegrin and metalloproteinase 10 and 17 in shedding of tumor necrosis factor-alpha." *Biochemistry and cell biology* 87(4): 581-593.
- Hikita, A., I. Yana, H. Wakeyama, M. Nakamura, Y. Kadono, Y. Oshima, K. Nakamura, M. Seiki and S. Tanaka** (2006). "Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand." *The journal of biological chemistry* 281(48): 36846-36855.
- Hirano, T. and T. Kishimoto** (1992). "Molecular biology and immunology of interleukin-6." *Research in immunology* 143(7): 723-724.
- Hitoshi, Y., J. Lorens, S. I. Kitada, J. Fisher, M. LaBarge, H. Z. Ring, U. Francke, J. C. Reed, S. Kinoshita and G. P. Nolan** (1998). "Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells." *Immunity* 8(4): 461-471.
- Hollis-Moffatt, J. E., M. E. Merriman, R. A. Rodger, K. A. Rowley, P. T. Chapman, N. Dalbeth, P. J. Gow, A. A. Harrison, J. Highton, P. B. Jones, J. L. O'Donnell, L. K. Stamp and T. R. Merriman** (2009). "Evidence for association of an interleukin 23 receptor variant independent of the R381Q variant with rheumatoid arthritis." *Annals of the rheumatic diseases* 68(8): 1340-1344.

- Honda, M., S. Yamamoto, M. Cheng, K. Yasukawa, H. Suzuki, T. Saito, Y. Osugi, T. Tokunaga and T. Kishimoto** (1992). "Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection." *Journal of immunology* 148(7): 2175-2180.
- Honjo, K., Y. Kubagawa, D. M. Jones, B. Dizon, Z. Zhu, H. Ohno, S. Izui, J. F. Kearney and H. Kubagawa** (2012a). "Altered Ig levels and antibody responses in mice deficient for the Fc receptor for IgM (FcmuR)." *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 109(39): 15882-15887.
- Honjo, K., Y. Kubagawa and H. Kubagawa** (2012b). "Is Toso an antiapoptotic protein or an Fc receptor for IgM?" *Blood* 119(7): 1789-1790.
- Hooper, N. M., E. H. Karran and A. J. Turner** (1997). "Membrane protein secretases." *The biochemical journal* 321(2): 265-279.
- Horiuchi, K.** (2013). "A brief history of tumor necrosis factor alpha--converting enzyme: an overview of ectodomain shedding." *The Keio journal of medicine* 62(1): 29-36.
- Horiuchi, K., T. Kimura, T. Miyamoto, K. Miyamoto, H. Akiyama, H. Takaishi, H. Morioka, T. Nakamura, Y. Okada, C. P. Blobel and Y. Toyama** (2009a). "Conditional inactivation of TACE by a Sox9 promoter leads to osteoporosis and increased granulopoiesis via dysregulation of IL-17 and G-CSF." *Journal of immunology* 182(4): 2093-2101.
- Horiuchi, K., T. Kimura, T. Miyamoto, H. Takaishi, Y. Okada, Y. Toyama and C. P. Blobel** (2007). "Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock." *Journal of immunology* 179(5): 2686-2689.
- Horiuchi, K., H. Morioka, H. Takaishi, H. Akiyama, C. P. Blobel and Y. Toyama** (2009b). "Ectodomain shedding of FLT3 ligand is mediated by TNF-alpha converting enzyme." *Journal of immunology* 182(12): 7408-7414.
- Hougaard, S., F. Loechel, X. Xu, R. Tajima, R. Albrechtsen and U. M. Wewer** (2000). "Trafficking of human ADAM 12-L: retention in the trans-Golgi network." *Biochemical and biophysical research communications* 275(2): 261-267.
- Howard, L., R. A. Maciewicz and C. P. Blobel** (2000). "Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28." *The Biochemical journal* 348(1): 21-27.
- Huber, A. K., E. M. Jacobson, K. Jazdzewski, E. S. Concepcion and Y. Tomer** (2008). "Interleukin (IL)-23 receptor is a major susceptibility gene for Graves' ophthalmopathy: the IL-23/T-helper 17 axis extends to thyroid autoimmunity." *The journal of clinical endocrinology and metabolism* 93(3): 1077-1081.
- Hundhausen, C., D. Misztela, T. A. Berkhout, N. Broadway, P. Saftig, K. Reiss, D. Hartmann, F. Fahrenholz, R. Postina, V. Matthews, K. J. Kallen, S. Rose-John and A. Ludwig** (2003). "The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion." *Blood* 102(4): 1186-1195.
- Hundhausen, C., A. Schulte, B. Schulz, M. G. Andrzejewski, N. Schwarz, P. von Hundelshausen, U. Winter, K. Paliga, K. Reiss, P. Saftig, C. Weber and A. Ludwig** (2007). "Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes." *Journal of immunology* 178(12): 8064-8072.
- Hunter, C. A. and S. A. Jones** (2015). "IL-6 as a keystone cytokine in health and disease." *Nature immunology* 16(5): 448-457.

- Infante-Duarte, C., H. F. Horton, M. C. Byrne and T. Kamradt** (2000). "Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells." *Journal of immunology* 165(11): 6107-6115.
- Jackson, L. F., T. H. Qiu, S. W. Sunnarborg, A. Chang, C. Zhang, C. Patterson and D. C. Lee** (2003). "Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling." *The EMBO journal* 22(11): 2704-2716.
- Jacobsen, K. T., L. Adlerz, G. Multhaupt and K. Iverfeldt** (2010). "Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced processing of amyloid-beta precursor protein (APP) and APP-like protein 2 is mediated by different metalloproteinases." *The journal of biological chemistry* 285(14): 10223-10231.
- Janes, P. W., N. Saha, W. A. Barton, M. V. Kolev, S. H. Wimmer-Kleikamp, E. Nievergall, C. P. Blobel, J. P. Himanen, M. Lackmann and D. B. Nikolov** (2005). "Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans." *Cell* 123(2): 291-304.
- Jia, H. P., D. C. Look, P. Tan, L. Shi, M. Hickey, L. Gakhar, M. C. Chappell, C. Wohlford-Lenane and P. B. McCray, Jr.** (2009). "Ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme 2 in human airway epithelia." *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 297(1): L84-96.
- Jiang, J., S. Wu, W. Wang, S. Chen, J. Peng, X. Zhang and Q. Wu** (2011). "Ectodomain shedding and autocleavage of the cardiac membrane protease corin." *The journal of biological chemistry* 286(12): 10066-10072.
- Jing, Y., Z. Ni, J. Wu, L. Higgins, T. W. Markowski, D. S. Kaufman and B. Walcheck** (2015). "Identification of an ADAM17 cleavage region in human CD16 (FcγRIII) and the engineering of a non-cleavable version of the receptor in NK cells." *PloS one* 10(3): 1-14.
- Jostock, T., J. Müllberg, S. Ozbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M. F. Neurath and S. Rose-John** (2001). "Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses." *European journal of biochemistry / FEBS* 268(1): 160-167.
- Kaczur, V., L. G. Puskas, Z. U. Nagy, N. Miled, A. Rebai, F. Juhasz, Z. Kupihar, A. Zvara, L. Hackler, Jr. and N. R. Farid** (2007). "Cleavage of the human thyrotropin receptor by ADAM10 is regulated by thyrotropin." *Journal of molecular recognition : JMR* 20(5): 392-404.
- Kalus, I., U. Bormann, M. Mzoughi, M. Schachner and R. Kleene** (2006). "Proteolytic cleavage of the neural cell adhesion molecule by ADAM17/TACE is involved in neurite outgrowth." *Journal of neurochemistry* 98(1): 78-88.
- Kan, S. H., G. Mancini and G. Gallagher** (2008). "Identification and characterization of multiple splice forms of the human interleukin-23 receptor alpha chain in mitogen-activated leukocytes." *Genes and immunity* 9(7): 631-639.
- Kapp, K., J. Siemens, H.-U. Häring and R. Lammers** (2012). "Proteolytic processing of the protein tyrosine phosphatase α extracellular domain is mediated by ADAM17/TACE." *European journal of cell biology* 91(9): 687-693.
- Kawaguchi, N., K. Horiuchi, J. D. Becherer, Y. Toyama, P. Besmer and C. P. Blobel** (2007). "Different ADAMs have distinct influences on Kit ligand processing: phorbol-ester-stimulated ectodomain shedding of Kitl1 by ADAM17 is reduced by ADAM19." *Journal of cell science* 120(6): 943-952.

- Kawaguchi, N., X. Xu, R. Tajima, P. Kronqvist, C. Sundberg, F. Loechel, R. Albrechtsen and U. M. Wewer** (2002). "ADAM 12 protease induces adipogenesis in transgenic mice." *The american journal of pathology* 160(5): 1895-1903.
- Ketteler, R., S. Glaser, O. Sandra, U. M. Martens and U. Klingmüller** (2002). "Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors." *Gene therapy* 9(8): 477-487.
- Kim, J., C. Lilliehook, A. Dudak, J. Prox, P. Saftig, H. J. Federoff and S. T. Lim** (2010). "Activity-dependent alpha-cleavage of nectin-1 is mediated by a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10)." *The Journal of biological chemistry* 285(30): 22919-22926.
- Kim, J. H., S. R. Lee, L. H. Li, H. J. Park, J. H. Park, K. Y. Lee, M. K. Kim, B. A. Shin and S. Y. Choi** (2011). "High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice." *PloS one* 6(4): e18556.
- Koenen, R. R., J. Pruessmeyer, O. Soehnlein, L. Fraemohs, A. Zerneck, N. Schwarz, K. Reiss, A. Sarabi, L. Lindbom, T. M. Hackeng, C. Weber and A. Ludwig** (2009). "Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases." *Blood* 113(19): 4799-4809.
- Kojro, E., G. Gimpl, S. Lammich, W. Marz and F. Fahrenholz** (2001). "Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha-secretase ADAM 10." *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 98(10): 5815-5820.
- Kopitz, C., M. Gerg, O. R. Bandapalli, D. Ister, C. J. Pennington, S. Hauser, C. Flechsig, H. W. Krell, D. Antolovic, K. Brew, H. Nagase, M. Stangl, C. W. von Weyhern, B. L. Brücher, K. Brand, L. M. Coussens, D. R. Edwards and A. Krüger** (2007). "Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling." *Cancer research* 67(18): 8615-8623.
- Kraft, A. S. and W. B. Anderson** (1983). "Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane." *Nature* 301(5901): 621-623.
- Kubagawa, H., S. Oka, Y. Kubagawa, I. Torii, E. Takayama, D. W. Kang, G. L. Gartland, L. F. Bertoli, H. Mori, H. Takatsu, T. Kitamura, H. Ohno and J. Y. Wang** (2009). "Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcmuR) in humans." *The journal of experimental medicine* 206(12): 2779-2793.
- Kubagawa, H., S. Oka, Y. Kubagawa, I. Torii, E. Takayama, D. W. Kang, D. Jones, N. Nishida, T. Miyawaki, L. F. Bertoli, S. K. Sanders and K. Honjo** (2014a). "The long elusive IgM Fc receptor, FcmuR." *Journal of clinical immunology* 34(1): 35-45.
- Kubagawa, Y., K. Honjo, D. W. Kang and H. Kubagawa** (2014b). "Monoclonal antibodies specific for human IgM Fc receptor inhibit ligand-binding activity." *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy* 33(6): 393-400.
- Kühn, R., F. Schwenk, M. Aguet and K. Rajewsky** (1995). "Inducible gene targeting in mice." *Science* 269(5229): 1427-1429.
- Kummer, M. P., H. Maruyama, C. Huelsmann, S. Baches, S. Weggen and E. H. Koo** (2009). "Formation of Pmel17 amyloid is regulated by juxtamembrane metalloproteinase cleavage, and the resulting C-terminal fragment is a substrate for gamma-secretase." *The journal of biological chemistry* 284(4): 2296-2306.

- Lajoie, L., N. Congy-Jolivet, A. Bolzec, V. Gouilleux-Gruart, E. Sicard, H. C. Sung, F. Peiretti, T. Moreau, H. Vié, B. Clémenceau and G. Thibault** (2014). "ADAM17-mediated shedding of FcγRIIIA on human NK cells: identification of the cleavage site and relationship with activation." *Journal of immunology* 192(2): 741-751.
- Lambert, D. W., M. Yarski, F. J. Warner, P. Thornhill, E. T. Parkin, A. I. Smith, N. M. Hooper and A. J. Turner** (2005). "Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2)." *The journal of biological chemistry* 280(34): 30113-30119.
- Langowski, J. L., X. Zhang, L. Wu, J. D. Mattson, T. Chen, K. Smith, B. Basham, T. McClanahan, R. A. Kastelein and M. Oft** (2006). "IL-23 promotes tumour incidence and growth." *Nature* 442(7101): 461-465.
- Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein and D. J. Cua** (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." *The journal of experimental medicine* 201(2): 233-240.
- Langrish, C. L., B. S. McKenzie, N. J. Wilson, R. de Waal Malefyt, R. A. Kastelein and D. J. Cua** (2004). "IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity." *Immunological reviews* 202: 96-105.
- Le Gall, S. M., P. Bobe, K. Reiss, K. Horiuchi, X. D. Niu, D. Lundell, D. R. Gibb, D. Conrad, P. Saftig and C. P. Blobel** (2009). "ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha." *Molecular biology of the cell* 20(6): 1785-1794.
- Leksa, V., R. Loewe, B. Binder, H. B. Schiller, P. Eckerstorfer, F. Forster, A. Soler-Cardona, G. Ondrovicová, E. Kutejová, E. Steinhuber, J. Breuss, J. Drach, P. Petzelbauer, B. R. Binder and H. Stockinger** (2011). "Soluble M6P/IGF2R released by TACE controls angiogenesis via blocking plasminogen activation." *Circulation research* 108(6): 676-685.
- Leonard, A. S., M. A. Davare, M. C. Horne, C. C. Garner and J. W. Hell** (1998). "SAP97 is associated with the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit." *The journal of biological chemistry* 273(31): 19518-19524.
- Levine, S. J.** (2008). "Molecular mechanisms of soluble cytokine receptor generation." *The Journal of biological chemistry* 283(21): 14177-14181.
- Lewandrowski, U., S. Wortelkamp, K. Lohrig, R. P. Zahedi, D. A. Wolters, U. Walter and A. Sickmann** (2009). "Platelet membrane proteomics: a novel repository for functional research." *Blood* 114(1): 10-19.
- Li, D., C. G. Specht, C. L. Waites, C. Butler-Munro, S. Leal-Ortiz, J. W. Foote, D. Genoux, C. C. Garner and J. M. Montgomery** (2011a). "SAP97 directs NMDA receptor spine targeting and synaptic plasticity." *The journal of physiology* 589(18): 4491-4510.
- Li, F. J., Y. Kubagawa, M. K. McCollum, L. Wilson, T. Motohashi, L. F. Bertoli, J. C. Barton, S. Barnes, R. S. Davis and H. Kubagawa** (2011b). "Enhanced levels of both the membrane-bound and soluble forms of IgM Fc receptor (FcmuR) in patients with chronic lymphocytic leukemia." *Blood* 118(18): 4902-4909.

- Li, N., Y. Wang, K. Forbes, K. M. Vignali, B. S. Heale, P. Saftig, D. Hartmann, R. A. Black, J. J. Rossi, C. P. Blobel, P. J. Dempsey, C. J. Workman and D. A. Vignali** (2007a). "Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3." *The EMBO journal* 26(2): 494-504.
- Li, X., T. Maretzky, G. Weskamp, S. Monette, X. Qing, P. D. Issuree, H. C. Crawford, D. R. McIlwain, T. W. Mak, J. E. Salmon and C. P. Blobel** (2015). "iRhoms 1 and 2 are essential upstream regulators of ADAM17-dependent EGFR signaling." *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 112(19): 6080-6085.
- Li, Y., N. Chu, A. Hu, B. Gran, A. Rostami and G. X. Zhang** (2007b). "Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia." *Brain : a journal of neurology* 130(2): 490-501.
- Lima, X. T., K. Abuabara, A. B. Kimball and H. C. Lima** (2009). "Briakinumab." *Expert opinion on biological therapy* 9(8): 1107-1113.
- Liu, P. C., X. Liu, Y. Li, M. Covington, R. Wynn, R. Huber, M. Hillman, G. Yang, D. Ellis, C. Marando, K. Katiyar, J. Bradley, K. Abremski, M. Stow, M. Rupar, J. Zhuo, Y. L. Li, Q. Lin, D. Burns, M. Xu, C. Zhang, D. Q. Qian, C. He, V. Sharief, L. Weng, C. Agrios, E. Shi, B. Metcalf, R. Newton, S. Friedman, W. Yao, P. Scherle, G. Hollis and T. C. Burn** (2006). "Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells." *Cancer biology & therapy* 5(6): 657-664.
- Liu, Q., J. Zhang, H. Tran, M. M. Verbeek, K. Reiss, S. Estus and G. Bu** (2009). "LRP1 shedding in human brain: roles of ADAM10 and ADAM17." *Molecular neurodegeneration* 4: 17.
- Ludwig, A., C. Hundhausen, M. H. Lambert, N. Broadway, R. C. Andrews, D. M. Bickett, M. A. Leesnitzer and J. D. Becherer** (2005). "Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules." *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 8(2): 161-171.
- Lue, R. A., S. M. Marfatia, D. Branton and A. H. Chishti** (1994). "Cloning and characterization of hdlg: the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to protein 4.1." *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 91(21): 9818-9822.
- Lum, L., M. S. Reid and C. P. Blobel** (1998). "Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15." *The journal of biological chemistry* 273(40): 26236-26247.
- Lum, L., B. R. Wong, R. Josien, J. D. Becherer, H. Erdjument-Bromage, J. Schlöndorff, P. Tempst, Y. Choi and C. P. Blobel** (1999). "Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival." *The journal of biological chemistry* 274(19): 13613-13618.
- Lust, J. A., K. A. Donovan, M. P. Kline, P. R. Greipp, R. A. Kyle and N. J. Maitle** (1992). "Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor." *Cytokine* 4(2): 96-100.
- Maetzel, D., S. Denzel, B. Mack, M. Canis, P. Went, M. Benk, C. Kieu, P. Papior, P. A. Baeuerle, M. Munz and O. Gires** (2009). "Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM." *Nature cell biology* 11(2): 162-171.

- Malapeira, J., C. Esselens, J. J. Bech-Serra, F. Canals and J. Arribas** (2011). "ADAM17 (TACE) regulates TGFbeta signaling through the cleavage of vasorin." *Oncogene* 30(16): 1912-1922.
- Mancini, G., S. H. Kan and G. Gallagher** (2008). "A novel insertion variant of the human IL-23 receptor-alpha chain transcript." *Genes and immunity* 9(6): 566-569.
- Marcello, E., F. Gardoni, M. Di Luca and I. Perez-Otano** (2010). "An arginine stretch limits ADAM10 exit from the endoplasmic reticulum." *The journal of biological chemistry* 285(14): 10376-10384.
- Marcello, E., F. Gardoni, D. Mauceri, S. Romorini, A. Jeromin, R. Epis, B. Borroni, F. Cattabeni, C. Sala, A. Padovani and M. Di Luca** (2007). "Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity." *The journal of neuroscience : the official journal of the society for neuroscience* 27(7): 1682-1691.
- Maretzky, T., D. R. McIlwain, P. D. Issuree, X. Li, J. Malapeira, S. Amin, P. A. Lang, T. W. Mak and C. P. Blobel** (2013). "iRhom2 controls the substrate selectivity of stimulated ADAM17-dependent ectodomain shedding." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(28): 11433-11438.
- Maretzky, T., K. Reiss, A. Ludwig, J. Buchholz, F. Scholz, E. Proksch, B. de Strooper, D. Hartmann and P. Saftig** (2005a). "ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(26): 9182-9187.
- Maretzky, T., M. Schulte, A. Ludwig, S. Rose-John, C. Blobel, D. Hartmann, P. Altevogt, P. Saftig and K. Reiss** (2005b). "L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth." *Molecular and cellular biology* 25(20): 9040-9053.
- Martens, A. S., J. G. Bode, P. C. Heinrich and L. Graeve** (2000). "The cytoplasmic domain of the interleukin-6 receptor gp80 mediates its basolateral sorting in polarized madin-darby canine kidney cells." *Journal of cell science* 113 (20): 3593-3602.
- Martin, L., R. Fluhrer, K. Reiss, E. Kremmer, P. Saftig and C. Haass** (2008). "Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b." *The journal of biological chemistry* 283(3): 1644-1652.
- Mathews, J. A., D. R. Gibb, B. H. Chen, P. Scherle and D. H. Conrad** (2010). "CD23 Sheddase A disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) is also required for CD23 sorting into B cell-derived exosomes." *The journal of biological chemistry* 285(48): 37531-37541.
- Matthews, V., B. Schuster, S. Schütze, I. Bussmeyer, A. Ludwig, C. Hundhausen, T. Sadowski, P. Saftig, D. Hartmann, K. J. Kallen and S. Rose-John** (2003). "Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE)." *The journal of biological chemistry* 278(40): 38829-38839.
- May, L. T., U. Santhanam and P. B. Sehgal** (1991). "On the multimeric nature of natural human interleukin-6." *The journal of biological chemistry* 266(15): 9950-9955.
- McFarland-Mancini, M. M., H. M. Funk, A. M. Paluch, M. Zhou, P. V. Giridhar, C. A. Mercer, S. C. Kozma and A. F. Drew** (2010). "Differences in wound healing in mice

- with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor." *Journal of immunology* 184(12): 7219-7228.
- McIlwain, D. R., P. A. Lang, T. Maretzky, K. Hamada, K. Ohishi, M. S. K., T. Berger, A. Murthy, G. Duncan, H. C. Xu, K. S. Lang, D. Häussinger, A. Wakeham, A. Itie-Youten, R. Khokha, P. S. Ohashi, C. Blobel and T. W. Mak** (2012). "iRhom2 Regulation of TACE Controls TNF-Mediated Protection Against *Listeria* and Responses to LPS." *Science* 335(229): 229-232.
- McInnes, I. B. and G. Schett** (2007). "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Nature reviews Immunology* 7(6): 429-442.
- McLaughlin, M., R. Hale, D. Ellston, S. Gaudet, R. A. Lue and A. Viel** (2002). "The distribution and function of alternatively spliced insertions in hDlg." *The journal of biological chemistry* 277(8): 6406-6412.
- Mendelson, K., S. Swendeman, P. Saftig and C. P. Blobel** (2010). "Stimulation of platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFRbeta) activates ADAM17 and promotes metalloproteinase-dependent cross-talk between the PDGFRbeta and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways." *The journal of biological chemistry* 285(32): 25024-25032.
- Merlos-Suárez, A., S. Ruiz-Paz, J. Baselga and J. Arribas** (2001). "Metalloprotease-dependent protransforming growth factor-alpha ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme." *The journal of biological chemistry* 276(51): 48510-48517.
- Mezyk, R., M. Bzowska and J. Bereta** (2003). "Structure and functions of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme." *Acta biochimica polonica* 50(3): 625-645.
- Milla, M. E., P. E. Gonzales and J. D. Leonard** (2006). "The TACE zymogen: re-examining the role of the cysteine switch." *Cell biochemistry and biophysics* 44(3): 342-348.
- Millichip, M. I., D. J. Dallas, E. Wu, S. Dale and N. McKie** (1998). "The metallo-disintegrin ADAM10 (MADM) from bovine kidney has type IV collagenase activity in vitro." *Biochemical and biophysical research communications* 245(2): 594-598.
- Mitsuoka, H., N. Kume, K. Hayashida, A. Inui-Hayashiada, Y. Aramaki, M. Toyohara, T. Jinnai, E. Nishi and T. Kita** (2009). "Interleukin 18 stimulates release of soluble lectin-like oxidized LDL receptor-1 (sLOX-1)." *Atherosclerosis* 202(1): 176-182.
- Mochizuki, S. and Y. Okada** (2007). "ADAMs in cancer cell proliferation and progression." *Cancer science* 98(5): 621-628.
- Möller-Hackbarth, K., C. Dewitz, O. Schweigert, A. Trad, C. Garbers, S. Rose-John and J. Scheller** (2013). "A disintegrin and metalloprotease (ADAM) 10 and ADAM17 are major sheddases of T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (Tim-3)." *The journal of biological chemistry* 288(48): 34529-34544.
- Monteiro, R. C. and J. G. Van De Winkel** (2003). "IgA Fc receptors." *Annual review of immunology* 21: 177-204.
- Montero, J. C., L. Yuste, E. Díaz-Rodríguez, A. Esparís-Ogando and A. Pandiella** (2000). "Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme." *Molecular and cellular neurosciences* 16(5): 631-648.
- Moretta, L., S. R. Webb, C. E. Grossi, P. M. Lydyard and M. D. Cooper** (1977). "Functional analysis of two human T-cell subpopulations: help and suppression of B-

- cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG." *The journal of experimental medicine* 146(1): 184-200.
- Moss, M. L., M. Bomar, Q. Liu, H. Sage, P. Dempsey, P. M. Lenhart, P. A. Gillispie, A. Stoeck, D. Wildeboer, J. W. Bartsch, R. Palmisano and P. Zhou** (2007). "The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events." *The journal of biological chemistry* 282(49): 35712-35721.
- Moss, M. L., S. L. Jin, M. E. Milla, D. M. Bickett, W. Burkhart, H. L. Carter, W. J. Chen, W. C. Clay, J. R. Didsbury, D. Hassler, C. R. Hoffman, T. A. Kost, M. H. Lambert, M. A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L. K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J. L. Su, J. D. Becherer and et al.** (1997). "Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha." *Nature* 385(6618): 733-736.
- Müllberg, J., W. Oberthur, F. Lottspeich, E. Mehl, E. Dittrich, L. Graeve, P. C. Heinrich and S. Rose-John** (1994a). "The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site." *Journal of immunology* 152(10): 4958-4968.
- Müllberg, J., W. Oberthür, F. Lottspeich, E. Mehl, E. Dittrich, L. Graeve, P. C. Heinrich and S. Rose-John** (1994b). "The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site." *Journal of immunology* 152(10): 4958-4968.
- Müllberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich and S. Rose-John** (1993). "The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding." *European journal of immunology* 23(2): 473-480.
- Muller, B. M., U. Kistner, R. W. Veh, C. Cases-Langhoff, B. Becker, E. D. Gundelfinger and C. C. Garner** (1995). "Molecular characterization and spatial distribution of SAP97, a novel presynaptic protein homologous to SAP90 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein." *The journal of neuroscience : the official journal of the society for neuroscience* 15(3): 2354-2366.
- Murai, T., Y. Maruyama, K. Mio, H. Nishiyama, M. Suga and C. Sato** (2011). "Low cholesterol triggers membrane microdomain-dependent CD44 shedding and suppresses tumor cell migration." *The journal of biological chemistry* 286(3): 1999-2007.
- Murakami, Y., S. Narayanan, S. Su, R. Childs, K. Krzewski, F. Borrego, J. Weck and J. E. Coligan** (2012). "Toso, a functional IgM receptor, is regulated by IL-2 in T and NK cells." *Journal of immunology* 189(2): 587-597.
- Murphy, C. A., C. L. Langrish, Y. Chen, W. Blumenschein, T. McClanahan, R. A. Kastelein, J. D. Sedgwick and D. J. Cua** (2003). "Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation." *The journal of experimental medicine* 198(12): 1951-1957.
- Murphy, G.** (2008). "The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment." *Nature reviews Cancer* 8(12): 929-941.
- Na, H. W., W. S. Shin, A. Ludwig and S. T. Lee** (2012). "The Cytosolic Domain of Protein-tyrosine Kinase 7 (PTK7), Generated from Sequential Cleavage by a Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) and -Secretase, Enhances Cell Proliferation and Migration in Colon Cancer Cells." *The journal of biological chemistry* 287(30): 25001-25009.

- Naeger, L. K., J. McKinney, A. Salvekar and T. Hoey** (1999). "Identification of a STAT4 binding site in the interleukin-12 receptor required for signaling." *The journal of biological chemistry* 274(4): 1875-1878.
- Nagano, O., D. Murakami, D. Hartmann, B. De Strooper, P. Saftig, T. Iwatsubo, M. Nakajima, M. Shinohara and H. Saya** (2004). "Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca²⁺ influx and PKC activation." *Journal of cell biology* 165(6): 893-902.
- Nagara, Y., M. Hagiya, N. Hatano, E. Futai, S. Suo, Y. Takaoka, Y. Murakami, A. Ito and S. Ishiura** (2012). "Tumor suppressor cell adhesion molecule 1 (CADM1) is cleaved by a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and subsequently cleaved by gamma-secretase complex." *Biochemical and biophysical research communications* 417(1): 462-467.
- Nair, R. P., K. C. Duffin, C. Helms, J. Ding, P. E. Stuart, D. Goldgar, J. E. Gudjonsson, Y. Li, T. Tejasvi, B. J. Feng, A. Ruether, S. Schreiber, M. Weichenthal, D. Gladman, P. Rahman, S. J. Schrodi, S. Prahalad, S. L. Guthery, J. Fischer, W. Liao, P. Y. Kwok, A. Menter, G. M. Lathrop, C. A. Wise, A. B. Begovich, J. J. Voorhees, J. T. Elder, G. G. Krueger, A. M. Bowcock and G. R. Abecasis** (2009). "Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways." *Nature genetics* 41(2): 199-204.
- Nair, R. P., A. Ruether, P. E. Stuart, S. Jenisch, T. Tejasvi, R. Hiremagalore, S. Schreiber, D. Kabelitz, H. W. Lim, J. J. Voorhees, E. Christophers, J. T. Elder and M. Weichenthal** (2008). "Polymorphisms of the IL12B and IL23R genes are associated with psoriasis." *Journal of investigative dermatology* 128(7): 1653-1661.
- Nakagawa, T., K. Futai, H. A. Lashuel, I. Lo, K. Okamoto, T. Walz, Y. Hayashi and M. Sheng** (2004). "Quaternary structure, protein dynamics, and synaptic function of SAP97 controlled by L27 domain interactions." *Neuron* 44(3): 453-467.
- Nakamura, T., H. Kubagawa, T. Ohno and M. D. Cooper** (1993). "Characterization of an IgM Fc-binding receptor on human T cells." *Journal of immunology* 151(12): 6933-6941.
- Nelson, K. K., J. Schlöndorff and C. P. Blobel** (1999). "Evidence for an interaction of the metalloprotease-disintegrin tumour necrosis factor alpha convertase (TACE) with mitotic arrest deficient 2 (MAD2), and of the metalloprotease-disintegrin MDC9 with a novel MAD2-related protein, MAD2beta." *The biochemical journal* 343(3): 673-680.
- Nimmerjahn, F., P. Bruhns, K. Horiuchi and J. V. Ravetch** (2005). "FcgammaRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity." *Immunity* 23(1): 41-51.
- O'Neill, A. K., L. L. Gallegos, V. Justilien, E. L. Garcia, M. Leitges, A. P. Fields, R. A. Hall and A. C. Newton** (2011). "Protein kinase Calpha promotes cell migration through a PDZ-dependent interaction with its novel substrate discs large homolog 1 (DLG1)." *The Journal of biological chemistry* 286(50): 43559-43568.
- Oberg, H. H., D. Wesch, S. Grussel, S. Rose-John and D. Kabelitz** (2006). "Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4+CD25- and CD25high regulatory T cells." *International immunology* 18(4): 555-563.
- Ohno, T., H. Kubagawa, S. K. Sanders and M. D. Cooper** (1990). "Biochemical nature of an Fc mu receptor on human B-lineage cells." *The journal of experimental medicine* 172(4): 1165-1175.

- Oka, A., T. Mabuchi, S. Ikeda, T. Terui, Y. Haida, A. Ozawa, K. Yatsu, J. K. Kulski and H. Inoko** (2013). "IL12B and IL23R gene SNPs in Japanese psoriasis." *Immunogenetics* 65(11): 823-828.
- Okamura, Y., E. Kohmura and T. Yamashita** (2011). "TACE cleaves neogenin to desensitize cortical neurons to the repulsive guidance molecule." *Neuroscience research* 71(1): 63-70.
- Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J. C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J. S. Abrams, K. W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J. F. Bazan and R. A. Kastelein** (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." *Immunity* 13(5): 715-725.
- Oswald, F., B. Tauber, T. Dobner, S. Bourteele, U. Kostezka, G. Adler, S. Liptay and R. M. Schmid** (2001). "p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1." *Molecular and cellular biology* 21(22): 7761-7774.
- Ouchida, R., H. Mori, K. Hase, H. Takatsu, T. Kurosaki, T. Tokuhisa, H. Ohno and J. Y. Wang** (2012). "Critical role of the IgM Fc receptor in IgM homeostasis, B-cell survival, and humoral immune responses." *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 109(40): 2699-2706.
- Pallasch, C. P. and C. M. Wendtner** (2009). "Overexpression of the Fas-inhibitory molecule TOSO: a novel antiapoptotic factor in chronic lymphocytic leukemia." *Leukemia & lymphoma* 50(3): 498-501.
- Pan, D. and G. M. Rubin** (1997). "Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis." *Cell* 90(2): 271-280.
- Parham, C., M. Chirica, J. Timans, E. Vaisberg, M. Travis, J. Cheung, S. Pflanz, R. Zhang, K. P. Singh, F. Vega, W. To, J. Wagner, A. M. O'Farrell, T. McClanahan, S. Zurawski, C. Hannum, D. Gorman, D. M. Rennick, R. A. Kastelein, R. de Waal Malefyt and K. W. Moore** (2002). "A Receptor for the Heterodimeric Cytokine IL-23 Is Composed of IL-12R 1 and a Novel Cytokine Receptor Subunit, IL-23R." *Journal of immunology* 168(11): 5699-5708.
- Parr-Sturgess, C. A., D. J. Rushton and E. T. Parkin** (2010). "Ectodomain shedding of the Notch ligand Jagged1 is mediated by ADAM17, but is not a lipid-raft-associated event." *The Biochemical journal* 432(2): 283-294.
- Peiretti, F., M. Canault, P. Deprez-Beauclair, V. Berthet, B. Bonardo, I. Juhan-Vague and G. Nalbone** (2003a). "Intracellular maturation and transport of tumor necrosis factor alpha converting enzyme." *Experimental cell research* 285(2): 278-285.
- Peiretti, F., P. Deprez-Beauclair, B. Bonardo, H. Aubert, I. Juhan-Vague and G. Nalbone** (2003b). "Identification of SAP97 as an intracellular binding partner of TACE." *Journal of cell science* 116(10): 1949-1957.
- Peng, M., S. Guo, N. Yin, J. Xue, L. Shen, Q. Zhao and W. Zhang** (2010). "Ectodomain shedding of Fc α receptor is mediated by ADAM10 and ADAM17." *Immunology* 130(1): 83-91.
- Peschon, J. J., J. L. Slack, P. Reddy, K. L. Stocking, S. W. Sunnarborg, D. C. Lee, W. E. Russell, B. J. Castner, R. S. Johnson, J. N. Fitzner, R. W. Boyce, N. Nelson, C. J. Kozlosky, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, D. P. Cerretti, R. J. Paxton, C. J. March**

- and R. A. Black** (1998). "An essential role for ectodomain shedding in mammalian development." *Science* 282(5392): 1281-1284.
- Poghosyan, Z., S. M. Robbins, M. D. Houslay, A. Webster, G. Murphy and D. R. Edwards** (2002). "Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases." *The Journal of biological chemistry* 277(7): 4999-5007.
- Postina, R., A. Schroeder, I. Dewachter, J. Bohl, U. Schmitt, E. Kojro, C. Prinzen, K. Endres, C. Hiemke, M. Blessing, P. Flamez, A. Dequenne, E. Godaux, F. van Leuven and F. Fahrenholz** (2004). "A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model." *The Journal of clinical investigation* 113(10): 1456-1464.
- Pricop, L., H. Rabinowich, P. A. Morel, A. Sulica, T. L. Whiteside and R. B. Herberman** (1993). "Characterization of the Fc mu receptor on human natural killer cells. Interaction with its physiologic ligand, human normal IgM, specificity of binding, and functional effects." *Journal of immunology* 151(6): 3018-3029.
- Primakoff, P. and D. G. Myles** (2000). "The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity." *Trends in genetics* 16(2): 83-87.
- Prinzen, C., U. Müller, K. Endres, F. Fahrenholz and R. Postina** (2005). "Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter." *FASEB journal* 19(11): 1522-1524.
- Pruessmeyer, J., C. Martin, F. M. Hess, N. Schwarz, S. Schmidt, T. Kogel, N. Hoettecke, B. Schmidt, A. Sechi, S. Uhlig and A. Ludwig** (2010). "A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates inflammation-induced shedding of syndecan-1 and -4 by lung epithelial cells." *The Journal of biological chemistry* 285(1): 555-564.
- Qu, D., Y. Wang, N. L. Esmon and C. T. Esmon** (2007). "Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17." *Journal of thrombosis and haemostasis* 5(2): 395-402.
- Rabie, T., A. Strehl, A. Ludwig and B. Nieswandt** (2005). "Evidence for a role of ADAM17 (TACE) in the regulation of platelet glycoprotein V." *The Journal of biological chemistry* 280(15): 14462-14468.
- Raikwar, N. S., K. Z. Liu and C. P. Thomas** (2014). "N-terminal cleavage and release of the ectodomain of Flt1 is mediated via ADAM10 and ADAM 17 and regulated by VEGFR2 and the Flt1 intracellular domain." *PloS one* 9(11): e112794.
- Ran, F. A., P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott and F. Zhang** (2013). "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system." *Nature protocols* 8(11): 2281-2308.
- Rauci, A., S. Cugusi, A. Antonelli, S. M. Barabino, L. Monti, A. Bierhaus, K. Reiss, P. Saftig and M. E. Bianchi** (2008). "A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10)." *FASEB journal* 22(10): 3716-3727.
- Ravetch, J. V. and J. P. Kinet** (1991). "Fc receptors." *Annual review of immunology* 9: 457-492.
- Rawlings, N. D. and A. J. Barrett** (1999). "MEROPS: the peptidase database." *Nucleic acids research* 27(1): 325-331.
- Reddy, P., J. L. Slack, R. Davis, D. P. Cerretti, C. J. Kozlosky, R. A. Blanton, D. Shows, J. J. Peschon and R. A. Black** (2000). "Functional analysis of the Domain Structure

- of Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme." *The Journal of biological chemistry* 275(19): 14609-14614.
- Reinherz, E. L., L. Moretta, M. Roper, J. M. Breard, M. C. Mingari, M. D. Cooper and S. F. Schlossman** (1980). "Human T lymphocyte subpopulations defined by Fc receptors and monoclonal antibodies. A comparison." *The Journal of experimental medicine* 151(4): 969-974.
- Reiss, K., T. Maretzky, I. G. Haas, M. Schulte, A. Ludwig, M. Frank and P. Saftig** (2006). "Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gamma-proteoglycan C3 modulates cell-cell adhesion." *The Journal of biological chemistry* 281(31): 21735-21744.
- Reiss, K., T. Maretzky, A. Ludwig, T. Tousseyn, B. de Strooper, D. Hartmann and P. Saftig** (2005). "ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling." *The EMBO journal* 24(4): 742-752.
- Riethmueller, S., J. C. Ehlers, J. Lokau, S. Dusterhoft, K. Knittler, G. Dombrowsky, J. Grotzinger, B. Rabe, S. Rose-John and C. Garbers** (2016). "Cleavage Site Localization Differentially Controls Interleukin-6 Receptor Proteolysis by ADAM10 and ADAM17." *Scientific reports* 6: 25550.
- Rio, C., J. D. Buxbaum, J. J. Peschon and G. Corfas** (2000). "Tumor necrosis factor- α -converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4." *The Journal of biological chemistry* 275(14): 10379-10387.
- Rizoli, S. B., O. D. Rotstein and A. Kapus** (1999). "Cell volume-dependent regulation of L-selectin shedding in neutrophils. A role for p38 mitogen-activated protein kinase." *The Journal of biological chemistry* 274(31): 22072-22080.
- Roberts, S., E. Calautti, S. Vanderweil, H. O. Nguyen, A. Foley, H. P. Baden and A. Viel** (2007). "Changes in localization of human discs large (hDlg) during keratinocyte differentiation are [corrected] associated with expression of alternatively spliced hDlg variants." *Experimental cell research* 313(12): 2521-2530.
- Roghani, M., J. D. Becherer, M. L. Moss, R. E. Atherton, H. Erdjument-Bromage, J. Arribas, R. K. Blackburn, G. Weskamp, P. Tempst and C. P. Blobel** (1999). "Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity." *The Journal of biological chemistry* 274(6): 3531-3540.
- Rooke, J., D. Pan, T. Xu and G. M. Rubin** (1996). "KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in Drosophila neurogenesis." *Science* 273(5279): 1227-1231.
- Rose-John, S.** (2012). "IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6." *International Journal of biological sciences* 8(9): 1237-1247.
- Rose-John, S. and P. C. Heinrich** (1994). "Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function." *The Biochemical journal* 300 2(2): 281-290.
- Rose-John, S., J. Scheller, G. Elson and S. A. Jones** (2006). "Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer." *Journal of leukocyte biology* 80(2): 227-236.
- Rose-John, S., G. H. Waetzig, J. Scheller, J. Grötzinger and D. Seegert** (2007). "The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches." *Expert opinion on therapeutic targets* 11(5): 613-624.

- Rose, A. A., M. G. Annis, Z. Dong, F. Pepin, M. Hallett, M. Park and P. M. Siegel** (2010). "ADAM10 releases a soluble form of the GPNMB/Osteoactivin extracellular domain with angiogenic properties." *PloS one* 5(8): e12093.
- Rothbauer, U., K. Zolghadr, S. Muyldermans, A. Schepers, A. C. Cardoso and H. Leonhardt** (2008). "A Versatile Nanotrap for Biochemical and Functional Studies with Fluorescent Fusion Proteins." *Molecular and cellular proteomics* 7(2): 282-289.
- Rovida, E., A. Paccagnini, M. Del Rosso, J. Peschon and P. Dello Sbarba** (2001). "TNF-alpha-converting enzyme cleaves the macrophage colony-stimulating factor receptor in macrophages undergoing activation." *Journal of immunology* 166(3): 1583-1589.
- Ruhe, J. E., S. Streit, S. Hart and A. Ullrich** (2006). "EGFR signaling leads to downregulation of PTP-LAR via TACE-mediated proteolytic processing." *Cellular signalling* 18(9): 1515-1527.
- Rumbaugh, G., G. M. Sia, C. C. Garner and R. L. Huganir** (2003). "Synapse-associated protein-97 isoform-specific regulation of surface AMPA receptors and synaptic function in cultured neurons." *Journal of neuroscience* 23(11): 4567-4576.
- Sahin, U. and C. P. Blobel** (2007). "Ectodomain shedding of the EGF-receptor ligand epigen is mediated by ADAM17." *FEBS letters* 581(1): 41-44.
- Sahin, U., G. Weskamp, K. Kelly, H. M. Zhou, S. Higashiyama, J. Peschon, D. Hartmann, P. Saftig and C. P. Blobel** (2004). "Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands." *Journal of cell biology* 164(5): 769-779.
- Sanders, S. K., H. Kubagawa, T. Suzuki, J. L. Butler and M. D. Cooper** (1987). "IgM binding protein expressed by activated B cells." *Journal of immunology* 139(1): 188-193.
- Saraceno, C., E. Marcello, D. Di Marino, B. Borroni, S. Claeysen, J. Perroy, A. Padovani, A. Tramontano, F. Gardoni and M. Di Luca** (2014). "SAP97-mediated ADAM10 trafficking from Golgi outposts depends on PKC phosphorylation." *Cell death & disease* 5(11): 1547-1560.
- Sato, K., A. Suematsu, K. Okamoto, A. Yamaguchi, Y. Morishita, Y. Kadono, S. Tanaka, T. Kodama, S. Akira, Y. Iwakura, D. J. Cua and H. Takayanagi** (2006). "Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction." *Journal of experimental medicine* 203(12): 2673-2682.
- Scheller, J., A. Chalaris, C. Garbers and S. Rose-John** (2011a). "ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration." *Trends in immunology* 32(8): 380-387.
- Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras and S. Rose-John** (2011b). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." *Biochimica et biophysica acta* 1813(5): 878-888.
- Scheller, J., J. Grötzinger and S. Rose-John** (2006a). "Updating interleukin-6 classic- and trans-signaling." *Signal transduction* 6(4): 240-259.
- Scheller, J., N. Ohnesorge and S. Rose-John** (2006b). "Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer." *Scandinavian journal of immunology* 63(5): 321-329.
- Scheller, J. and S. Rose-John** (2006). "Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside." *Medical microbiology and immunology* 195(4): 173-183.
- Schelter, F., J. Kobuch, M. L. Moss, J. D. Becherer, P. M. Comoglio, C. Boccaccio and A. Krüger** (2010). "A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates

- DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor." *The Journal of biological chemistry* 285(34): 26335-26340.
- Schiffmacher, A. T., R. Padmanabhan, S. Jhingory and L. A. Taneyhill** (2014). "Cadherin-6B is proteolytically processed during epithelial-to-mesenchymal transitions of the cranial neural crest." *Molecular biology of the cell* 25(1): 41-54.
- Schlecker, E., N. Fiegler, A. Arnold, P. Altevogt, S. Rose-John, G. Moldenhauer, A. Sucker, A. Paschen, E. P. von Strandmann, S. Textor and A. Cerwenka** (2014). "Metalloprotease-mediated tumor cell shedding of B7-H6, the ligand of the natural killer cell-activating receptor NKp30." *Cancer research* 74(13): 3429-3440.
- Schlomann, U., D. Wildeboer, A. Webster, O. Antropova, D. Zeuschner, C. G. Knight, A. J. Docherty, M. Lambert, L. Skelton, H. Jockusch and J. W. Bartsch** (2002). "The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion." *The Journal of biological chemistry* 277(50): 48210-48219.
- Schlondorff, J. and C. P. Blobel** (1999). "Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding." *Journal of cell science* 112(21): 3603-3617.
- Schlüter, O. M., W. Xu and R. C. Malenka** (2006). "Alternative N-terminal domains of PSD-95 and SAP97 govern activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor function." *Neuron* 51(1): 99-111.
- Schmidt, C., T. Giese, B. Ludwig, I. Mueller-Molaian, T. Marth, S. Zeuzem, S. C. Meuer and A. Stallmach** (2005). "Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis." *Inflammatory bowel diseases* 11(1): 16-23.
- Schmitz, J., M. Weissenbach, S. Haan, P. C. Heinrich and F. Schaper** (2000). "SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130." *The Journal of biological chemistry* 275(17): 12848-12856.
- Schröder, J., J. M. Moll, P. Baran, J. Grotzinger, J. Scheller and D. M. Floss** (2015). "Non-canonical interleukin 23 receptor complex assembly: p40 protein recruits interleukin 12 receptor beta1 via site II and induces p19/interleukin 23 receptor interaction via site III." *The Journal of biological chemistry* 290(1): 359-370.
- Schroers, A., O. Hecht, K. J. Kallen, M. Pachta, S. Rose-John and J. Grötzinger** (2005). "Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly on the cellular membrane." *Protein science* 14(3): 783-790.
- Schulte, M., K. Reiss, M. Lettau, T. Maretzky, A. Ludwig, D. Hartmann, B. de Strooper, O. Janssen and P. Saftig** (2007). "ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death." *Cell death and differentiation* 14(5): 1040-1049.
- Schulz, B., J. Pruessmeyer, T. Maretzky, A. Ludwig, C. P. Blobel, P. Saftig and K. Reiss** (2008). "ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin." *Circulation research* 102(10): 1192-1201.
- Schumacher, N., D. Meyer, A. Mauermann, J. von der Heyde, J. Wolf, J. Schwarz, K. Knittler, G. Murphy, M. Michalek, C. Garbers, J. W. Bartsch, S. Guo, B. Schacher, P. Eickholz, A. Chalaris, S. Rose-John and B. Rabe** (2015). "Shedding of endogenous Interleukin-6 receptor (IL-6R) is governed by ADAM proteases while a

- full-length IL-6R isoform localizes to circulating microvesicles." *The Journal of biological chemistry* 290(43): 26059-26071.
- Schwarz, J., C. Broder, A. Helmstetter, S. Schmidt, I. Yan, M. Muller, D. Schmidt-Arras, C. Becker-Pauly, F. Koch-Nolte, H. W. Mittrucker, B. Rabe, S. Rose-John and A. Chalaris** (2013). "Short-term TNF α shedding is independent of cytoplasmic phosphorylation or furin cleavage of ADAM17." *Biochimica et biophysica acta* 1833(12): 3355-3367.
- Schweigert, O., C. Dewitz, K. Möller-Hackbarth, A. Trad, C. Garbers, S. Rose-John and J. Scheller** (2014). "Soluble T cell immunoglobulin and mucin domain (TIM)-1 and -4 generated by A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM)-10 and -17 bind to phosphatidylserine." *Biochimica et biophysica acta* 1843(2): 275-287.
- Seals, D. F. and S. A. Courtneidge** (2003). "The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions." *Genes & development* 17(1): 7-30.
- Selkoe, D. and R. Kopan** (2003). "Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration." *Annual review of neuroscience* 26: 565-597.
- Six, E., D. Ndiaye, Y. Laabi, C. Brou, N. Gupta-Rossi, A. Israel and F. Logeat** (2003). "The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase." *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 100(13): 7638-7643.
- Sprecher, C. A., F. J. Grant, J. W. Baumgartner, S. R. Presnell, S. K. Schrader, T. Yamagiwa, T. E. Whitmore, P. J. O'Hara and D. F. Foster** (1998). "Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor." *Biochemical and biophysical research communications* 246(1): 82-90.
- Stöcker, W., F. Grams, U. Baumann, P. Reinemer, F. X. Gomis-Rüth, D. B. McKay and W. Bode** (1995). "The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases." *Protein science* 4(5): 823-840.
- Stoeck, A., S. Keller, S. Riedle, M. P. Sanderson, S. Runz, F. Le Naour, P. Gutwein, A. Ludwig, E. Rubinstein and P. Altevogt** (2006). "A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44." *The Biochemical journal* 393(3): 609-618.
- Sundberg, C., C. K. Thodeti, M. Kveiborg, C. Larsson, P. Parker, R. Albrechtsen and U. M. Wewer** (2004). "Regulation of ADAM12 cell-surface expression by protein kinase C epsilon." *The Journal of biological chemistry* 279(49): 51601-51611.
- Sunnarborg, S. W., C. L. Hinkle, M. Stevenson, W. E. Russell, C. S. Raska, J. J. Peschon, B. J. Castner, M. J. Gerhart, R. J. Paxton, R. A. Black and D. C. Lee** (2002). "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability." *The Journal of biological chemistry* 277(15): 12838-12845.
- Surena, A. L., G. P. de Faria, J. M. Studler, F. Peiretti, M. Pidoux, J. Camonis, H. Chneiweiss, E. Formstecher and M. P. Junier** (2009). "DLG1/SAP97 modulates transforming growth factor alpha bioavailability." *Biochimica et biophysica acta* 1793(2): 264-272.
- Swendeman, S., K. Mendelson, G. Weskamp, K. Horiuchi, U. Deutsch, P. Scherle, A. Hooper, S. Rafii and C. P. Blobel** (2008). "VEGF-A stimulates ADAM17-dependent

- shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling." *Circulation research* 103(9): 916-918.
- Taga, T., M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano and T. Kishimoto** (1989). "Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130." *Cell* 58(3): 573-581.
- Takeda, S.** (2009). "Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases." *Seminars in cell & developmental biology* 20(2): 146-152.
- Takeda, S., H. Takeya and S. Iwanaga** (2012). "Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins." *Biochimica et biophysica acta* 1824(1): 164-176.
- Tanaka, M., D. Nanba, S. Mori, F. Shiba, H. Ishiguro, K. Yoshino, N. Matsuura and S. Higashiyama** (2004). "ADAM binding protein Eve-1 is required for ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands." *The Journal of biological chemistry* 279(40): 41950-41959.
- Tellier, E., M. Canault, L. Rebsomen, B. Bonardo, I. Juhan-Vague, G. Nalbone and F. Peiretti** (2006). "The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts." *Experimental cell research* 312(20): 3969-3980.
- Thathiah, A., C. P. Blobel and D. D. Carson** (2003). "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding." *The Journal of biological chemistry* 278(5): 3386-3394.
- Tousseyn, T., A. Thathiah, E. Jorissen, T. Raemaekers, U. Konietzko, K. Reiss, E. Maes, A. Snellinx, L. Serneels, O. Nyabi, W. Annaert, P. Saftig, D. Hartmann and B. De Strooper** (2009). "ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase." *The Journal of biological chemistry* 284(17): 11738-11747.
- Trad, A., N. Hedemann, M. Shomali, V. Pawlak, J. Grotzinger and I. Lorenzen** (2011). "Development of sandwich ELISA for detection and quantification of human and murine a disintegrin and metalloproteinase17." *Journal of immunological methods* 371(1-2): 91-96.
- Trichas, G., J. Begbie and S. Srinivas** (2008). "Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice." *BMC biology* 6: 40.
- Tsakadze, N. L., S. D. Sithu, U. Sen, W. R. English, G. Murphy and S. E. D'Souza** (2006). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)." *The Journal of biological chemistry* 281(6): 3157-3164.
- Tucher, J., D. Linke, T. Koudelka, L. Cassidy, C. Tredup, R. Wichert, C. Pietrzik, C. Becker-Pauly and A. Tholey** (2014). "LC-MS based cleavage site profiling of the proteases ADAM10 and ADAM17 using proteome-derived peptide libraries." *Journal of proteome research* 13(4): 2205-2214.
- Valtschanoff, J. G., A. Burette, M. A. Davare, A. S. Leonard, J. W. Hell and R. J. Weinberg** (2000). "SAP97 concentrates at the postsynaptic density in cerebral cortex." *European journal of neuroscience* 12(10): 3605-3614.
- Varghese, J. N., R. L. Moritz, M. Z. Lou, A. Van Donkelaar, H. Ji, N. Ivancic, K. M. Branson, N. E. Hall and R. J. Simpson** (2002). "Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha -chain." *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 99(25): 15959-15964.

- Vignali, D. A. and V. K. Kuchroo** (2012). "IL-12 family cytokines: immunological playmakers." *Nature immunology* 13(8): 722-728.
- Vincent, B., E. Paitel, P. Saftig, Y. Frobert, D. Hartmann, B. De Strooper, J. Grassi, E. Lopez-Perez and F. Checler** (2001). "The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein." *The journal of biological chemistry* 276(41): 37743-37746.
- Vire, B., A. David and A. Wiestner** (2011). "TOSO, the Fc μ receptor, is highly expressed on chronic lymphocytic leukemia B cells, internalizes upon IgM binding, shuttles to the lysosome, and is downregulated in response to TLR activation." *Journal of immunology* 187(8): 4040-4050.
- Waites, C. L., C. G. Specht, K. Härtel, S. Leal-Ortiz, D. Genoux, D. Li, R. C. Drisdell, O. Jeyifous, J. E. Cheyne, W. N. Green, J. M. Montgomery and C. C. Garner** (2009). "Synaptic SAP97 isoforms regulate AMPA receptor dynamics and access to presynaptic glutamate." *Journal of neuroscience* 29(14): 4332-4345.
- Waldhauer, I., D. Goehlsdorf, F. Gieseke, T. Weinschenk, M. Wittenbrink, A. Ludwig, S. Stevanovic, H. G. Rammensee and A. Steinle** (2008). "Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases." *Cancer research* 68(15): 6368-6376.
- Wang, X., K. He, M. Gerhart, Y. Huang, J. Jiang, R. J. Paxton, S. Yang, C. Lu, R. K. Menon, R. A. Black, G. Baumann and S. J. Frank** (2002). "Metalloprotease-mediated GH receptor proteolysis and GHBP shedding. Determination of extracellular domain stem region cleavage site." *The Journal of biological chemistry* 277(52): 50510-50519.
- Wang, X., D. J. Tomso, X. Liu and D. A. Bell** (2005). "Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes." *Toxicology and applied pharmacology* 207(2): 84-90.
- Wang, Y., K. A. Kim, J. H. Kim and H. S. Sul** (2006). "Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis." *Journal of nutrition* 136(12): 2953-2956.
- Wei, L., A. Laurence, K. M. Elias and J. J. O'Shea** (2007). "IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner." *The Journal of biological chemistry* 282(48): 34605-34610.
- Wen, C., M. M. Metzstein and I. Greenwald** (1997). "SUP-17, a *Caenorhabditis elegans* ADAM protein related to *Drosophila* KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling." *Development* 124(23): 4759-4767.
- Weskamp, G., J. W. Ford, J. Sturgill, S. Martin, A. J. Docherty, S. Swendeman, N. Broadway, D. Hartmann, P. Saftig, S. Umland, A. Sehara-Fujisawa, R. A. Black, A. Ludwig, J. D. Becherer, D. H. Conrad and C. P. Blobel** (2006). "ADAM10 is a principal 'shedase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23." *Nature immunology* 7(12): 1293-1298.
- Weskamp, G., J. Schlöndorff, L. Lum, J. D. Becherer, T. W. Kim, P. Saftig, D. Hartmann, G. Murphy and C. P. Blobel** (2004). "Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR)." *The Journal of biological chemistry* 279(6): 4241-4249.
- White, J. M., L. Bridges, D. DeSimone, M. Tomczuk and T. Wolfsberg** (2005). Introduction to the ADAM Family. *The ADAM Family of Proteases*. N. M. Hooper and U. Lendeckel, Springer: 1-28.

- Wild-Bode, C., K. Fellerer, J. Kugler, C. Haass and A. Capell** (2006). "A basolateral sorting signal directs ADAM10 to adherens junctions and is required for its function in cell migration." *The Journal of biological chemistry* 281(33): 23824-23829.
- Willems, S. H., C. J. Tape, P. L. Stanley, N. A. Taylor, I. G. Mills, D. E. Neal, J. McCafferty and G. Murphy** (2010). "Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17." *The Biochemical journal* 428(3): 439-450.
- Wojtalewicz, N., E. Sadeqzadeh, J. V. Weiss, M. M. Tehrani, S. Klein-Scory, S. Hahn, W. Schmiegel, U. Warnken, M. Schnölzer, C. E. de Bock, R. F. Thorne and I. Schwarte-Waldhoff** (2014). "A soluble form of the giant cadherin Fat1 is released from pancreatic cancer cells by ADAM10 mediated ectodomain shedding." *PloS one* 9(3): e90461.
- Wong, E., T. Maretzky, Y. Peleg, C. P. Blobel and I. Sagi** (2015). "The Functional Maturation of A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 9, 10, and 17 Requires Processing at a Newly Identified Proprotein Convertase (PC) Cleavage Site." *The Journal of biological chemistry* 290(19): 12135-12146.
- Wu, H., J. E. Nash, P. Zamorano and C. C. Garner** (2002). "Interaction of SAP97 with minus-end-directed actin motor myosin VI. Implications for AMPA receptor trafficking." *The Journal of biological chemistry* 277(34): 30928-30934.
- Wu, H., C. Reissner, S. Kuhlendahl, B. Coblentz, S. Reuver, S. Kindler, E. D. Gundelfinger and C. C. Garner** (2000). "Intramolecular interactions regulate SAP97 binding to GKAP." *The EMBO journal* 19(21): 5740-5751.
- Xu, P. and R. Derynck** (2010). "Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation." *Molecular cell* 37(4): 551-566.
- Yacoub, D., N. Benslimane, L. Al-Zoobi, G. Hassan, A. Nadiri and W. Mourad** (2013). "CD154 is released from T-cells by a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 protein-dependent manner." *The Journal of biological chemistry* 288(50): 36083-36093.
- Yalcin, B., N. Atakan and S. Dogan** (2014). "Association of interleukin-23 receptor gene polymorphism with Behcet disease." *Clinical and experimental dermatology* 39(8): 881-887.
- Yamasaki, K., T. Taga, Y. Hirata, H. Yawata, Y. Kawanishi, B. Seed, T. Taniguchi, T. Hirano and T. Kishimoto** (1988). "Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor." *Science* 241(4867): 825-828.
- Yamazaki, K., Y. Mizui and I. Tanaka** (1997). "Radiation hybrid mapping of human ADAM10 gene to chromosome 15." *Genomics* 45(2): 457-459.
- Yan, Y., K. Shirakabe and Z. Werb** (2002). "The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors." *Journal of cell biology* 158(2): 221-226.
- Yao, B. B., P. Niu, C. S. Surowy and C. R. Faltynek** (1999). "Direct interaction of STAT4 with the IL-12 receptor." *Archives of biochemistry and biophysics* 368(1): 147-155.
- Yen, D., J. Cheung, H. Scheerens, F. Poulet, T. McClanahan, B. McKenzie, M. A. Kleinschek, A. Owyang, J. Mattson, W. Blumenschein, E. Murphy, M. Sathe, D. J. Cua, R. A. Kastelein and D. Rennick** (2006). "IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6." *Journal of clinical investigation* 116(5): 1310-1316.

- Young, J., X. Yu, K. Wolslegel, A. Nguyen, C. Kung, E. Chiang, G. Kolumam, N. Wei, W. L. Wong, L. DeForge, M. J. Townsend and J. L. Grogan** (2010). "Lymphotoxin-alpha heterotrimers are cleaved by metalloproteinases and contribute to synovitis in rheumatoid arthritis." *Cytokine* 51(1): 78-86.
- Yu, R. Y., J. Brazaitis and G. Gallagher** (2015). "The human IL-23 receptor rs11209026 A allele promotes the expression of a soluble IL-23R-encoding mRNA species." *Journal of immunology* 194(3): 1062-1068.
- Yu, R. Y. and G. Gallagher** (2010). "A naturally occurring, soluble antagonist of human IL-23 inhibits the development and in vitro function of human Th17 cells." *Journal of immunology* 185(12): 7302-7308.
- Zatovicova, M., O. Sedlakova, E. Svastova, A. Ohradanova, F. Ciampor, J. Arribas, J. Pastorek and S. Pastorekova** (2005). "Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17." *British journal of cancer* 93(11): 1267-1276.
- Zhang, L., M. Bukulin, E. Kojro, A. Roth, V. V. Metz, F. Fahrenholz, P. P. Nawroth, A. Bierhaus and R. Postina** (2008). "Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases." *The Journal of biological chemistry* 283(51): 35507-35516.
- Zhang, X. Y., H. J. Zhang, Y. Zhang, Y. J. Fu, J. He, L. P. Zhu, S. H. Wang and L. Liu** (2006). "Identification and expression analysis of alternatively spliced isoforms of human interleukin-23 receptor gene in normal lymphoid cells and selected tumor cells." *Immunogenetics* 57(12): 934-943.
- Zhao, J., H. Chen, J. J. Peschon, W. Shi, Y. Zhang, S. J. Frank and D. Warburton** (2001). "Pulmonary hypoplasia in mice lacking tumor necrosis factor-alpha converting enzyme indicates an indispensable role for cell surface protein shedding during embryonic lung branching morphogenesis." *Developmental biology* 232(1): 204-218.
- Zhu, L., W. Bergmeier, J. Wu, H. Jiang, T. J. Stalker, M. Cieslak, R. Fan, L. Bousmell, A. Kumanogoh, H. Kikutani, L. Tamagnone, D. D. Wagner, M. E. Milla and L. F. Brass** (2007). "Regulated surface expression and shedding support a dual role for semaphorin 4D in platelet responses to vascular injury." *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 104(5): 1621-1626.

7 Anhang

7.1 Substrate von ADAM10

Tabelle 3: Substrate von ADAM10. Bisher beschriebene Substrate von ADAM10. Tabelle aktualisiert nach (Garbers 2011)

Art des Substrates	Name des Proteins	Referenz
Zytokine/ Wachstumsfaktoren	Betacellulin	(Sahin et al. 2004)
	CD154 (CD40L)	(Yacoub et al. 2013)
	cMet	(Kopitz et al. 2007; Schelter et al. 2010)
	CX3CL1/Fractalkine	(Hundhausen et al. 2003)
	CXCL16	(Abel et al. 2004)
	EGF	(Sahin et al. 2004)
	MICA	(Waldhauer et al. 2008)
	NRG1 TypIII	(Fleck et al. 2013)
	TNF	(Hikita et al. 2009)
	TRANCE/RANKL	(Hikita et al. 2006)
Rezeptoren	ACE2	(Jia et al. 2009)
	CD16B/ FcγRIIIB	(Guo et al. 2012)
	CD23	(Weskamp et al. 2006; Mathews et al. 2010)
	CD30	(Eichenauer et al. 2007)
	CD91/LRP1/APOER	(Liu et al. 2009)
	DLL1	(Six et al. 2003)
	Ephrin A5	(Janes et al. 2005)
	Ephrin A2	(Hattori et al. 2000)
	ERBB2 (HER2/neu)	(Liu et al. 2006)
	FcαR, CD89	(Peng et al. 2010)
	Flt1	(Raikwar et al. 2014)
	GPV1	(Bender et al. 2010)
	IL-6Rα	(Mathews et al. 2003)
	IL-23R	Diese Arbeit
	LOX-1	(Mitsuoka et al. 2009)
	NRP-1	(Swendeman et al. 2008)
	Notch-1	(Pan and Rubin 1997)

7 Anhang

	Notch-2	(Groot et al. 2014)
	Notch-3	(Groot et al. 2014)
	PDGFR β	(Mendelson et al. 2010)
	RAGE	(Rauci et al. 2008; Zhang et al. 2008)
	Robo	(Coleman et al. 2010)
	Thyrotropinrezeptor	(Kaczur et al. 2007)
	Toso, FAIM3, Fc μ R	Diese Arbeit
	VEGFR2	(Donners et al. 2010)
Adhäsionsmoleküle	CADM1	(Nagara et al. 2012)
	Cad6B	(Schiffmacher et al. 2014)
	CD44	(Nagano et al. 2004; Murai et al. 2011)
	Collagen IV	(Millichip et al. 1998)
	Collagen XVII	(Franzke et al. 2002)
	Desmoglein-2	(Bech-Serra et al. 2006)
	E-cadherin	(Maretzky et al. 2005a)
	Fat1 cadherin	(Wojtalewicz et al. 2014)
	F11R, JAM-A	(Koenen et al. 2009)
	L1-CAM	(Gutwein et al. 2003; Maretzky et al. 2005b)
	N-cadherin	(Reiss et al. 2005)
	Nectin-1	(Kim et al. 2010)
	PcdhyC3/B4	(Reiss et al. 2006)
	Protocadherin (PCDH)12	(Bouillot et al. 2011)
	VE-cadherin	(Schulz et al. 2008)
	Sonstige	Annexin A1
APP		(Postina et al. 2004)
B7-H6		(Schlecker et al. 2014)
Bri2/Itm2b		(Martin et al. 2008)
CD223/LAG-3		(Li et al. 2007a)
Corin		(Jiang et al. 2011)
FasL		(Schulte et al. 2007)
GPNMB/Osteoactivin		(Rose et al. 2010)
Klotho		(Chen et al. 2007)
LYPD3, C4.4A		(Esselens et al. 2008)

Meprin β (Mephrin A)	(Herzog et al. 2014)
Pmel17	(Kummer et al. 2009)
PRNP, PrPc	(Vincent et al. 2001)
TIM-1	(Schweigert et al. 2014)
TIM-2	(Dewitz et al. 2014)
TIM-3	(Möller-Hackbarth et al. 2013)
TIM-4	(Schweigert et al. 2014)

7.2 Substrate von ADAM17

Tabelle 4: Substrate von ADAM17. Bisher beschriebene Substrate von ADAM17. Tabelle aktualisiert nach (Garbers 2011)

Art des Substrats	Name des Proteins	Referenz
Zytokine/ Wachstumsfaktoren	AREG	(Sunnarborg et al. 2002)
	CD154 (CD40L)	(Yacoub et al. 2013)
	CSF-1	(Horiuchi et al. 2007)
	DLL1	(Dyczynska et al. 2007)
	Fractalkine/CXC3CL1	(Garton et al. 2001)
	EREG	(Sahin et al. 2004)
	EPGN, Epigen	(Sahin and Blobel 2007)
	HB-EGF	(Merlos-Suárez et al. 2001)
	Jagged	(Parr-Sturgess et al. 2010)
	KL-1	(Kawaguchi et al. 2007)
	KL-2	(Kawaguchi et al. 2007)
	LAG-3	(Li et al. 2007a)
	LTA	(Young et al. 2010)
	MICA	(Waldhauer et al. 2008)
	MICB	(Boutet et al. 2009)
	NRG1, Heregulin	(Montero et al. 2000)
	NRGI TypIII	(Fleck et al. 2013)
	Pref1	(Wang et al. 2006)
	SEMA4D	(Zhu et al. 2007)
	TGF α	(Peschon et al. 1998)
	TMEFF2	(Ali and Knaüper 2007)
	TNF	(Black et al. 1997; Moss et al. 1997)

	TRANCE/RANKL	(Lum et al. 1999)
Rezeptoren	ACE2	(Lambert et al. 2005)
	CD16A/FcγRIIIA	(Lajoie et al. 2014)
	CD16B/ FcγRIIIB	(Guo et al. 2012)
	CD91/LRP1/APOER	(Liu et al. 2009)
	CSF1R, M-CSFR	(Rovida et al. 2001)
	EPCR	(Qu et al. 2007)
	FcαR, CD89	(Peng et al. 2010)
	Flt1	(Raikwar et al. 2014)
	FLT3L	(Horiuchi et al. 2009b)
	GHR	(Wang et al. 2002)
	GPIba	(Bergmeier et al. 2004)
	GPV	(Rabie et al. 2005)
	GPV1	(Bender et al. 2010)
	HER4/ErbB4	(Rio et al. 2000)
	IL-1R2	(Reddy et al. 2000)
	IL-6Rα	(Althoff et al. 2000)
	IL-23R	Diese Arbeit
	KDR, VEGFR2	(Swendeman et al. 2008)
	M6P/IGF2R	(Leksa et al. 2011)
	Neogenin	(Okamura et al. 2011)
	Notch-1	(Brou et al. 2000)
	NTRK1, TrkA	(Díaz-Rodríguez et al. 1999)
	p55 TNFα R1	(Reddy et al. 2000)
	p75 TNFα RII	(Peschon et al. 1998)
	p75NTR	(Weskamp et al. 2004)
	PTPα	(Kapp et al. 2012)
	Ptprz	(Chow et al. 2008)
	PTPRF, PTP-LAR	(Ruhe et al. 2006)
	SDC1	(Pruessmeyer et al. 2010)
	SDC4	(Pruessmeyer et al. 2010)
	SORCS1	(Hermey et al. 2006)
	SORCS3	(Hermey et al. 2006)
SORL1, SORLA	(Guo et al. 2002)	
SORT1	(Hermey et al. 2006)	
TNFRSF8, CD30	(Hansen et al. 2000)	

7 Anhang

	TNFRSF5, CD40	(Contin et al. 2003)
	Toso, FAIM3, Fc μ R	Diese Arbeit
Adhäsionsmoleküle	ALCAM	(Bech-Serra et al. 2006)
	CD44	(Stoeck et al. 2006)
	CD62L	(Peschon et al. 1998)
	Collagen XVII	(Franzke et al. 2002)
	DSG2	(Bech-Serra et al. 2006)
	EpCAM	(Maetzel et al. 2009)
	F11R, JAM.A	(Koenen et al. 2009)
	ICAM-1	(Tsakadze et al. 2006)
	L1-CAM	(Maretzky et al. 2005b)
	NCAM	(Kalus et al. 2006)
	PVRL4, Nectin-4	(Fabre-Lafay et al. 2005)
	VCAM-1	(Garton et al. 2003)
Sonstige	APLP2	(Jacobsen et al. 2010)
	APP	(Buxbaum et al. 1998)
	B7-H6	(Schlecker et al. 2014)
	CA9	(Zatovicova et al. 2005)
	CD163	(Etzerodt et al. 2010)
	FasL	(Ebsen et al. 2015)
	GP	(Dolnik et al. 2004)
	Klotho	(Chen et al. 2007)
	LYPD3, C4.4A	(Esselens et al. 2008)
	Meprin β (Mephrin A)	(Herzog et al. 2014)
	MUC-1	(Thathiah et al. 2003)
	Pme117	(Kummer et al. 2009)
	PRNP, PrPc	(Vincent et al. 2001)
	PTK7	(Na et al. 2012)
	TIM-1	(Schweigert et al. 2014)
	TIM-3	(Möller-Hackbarth et al. 2013)
	TIM-4	(Schweigert et al. 2014)
	VASN	(Malapeira et al. 2011)

7.3 Klonierungsschemata

7.3.1 Klonierungsschemata der SAP97 Varianten

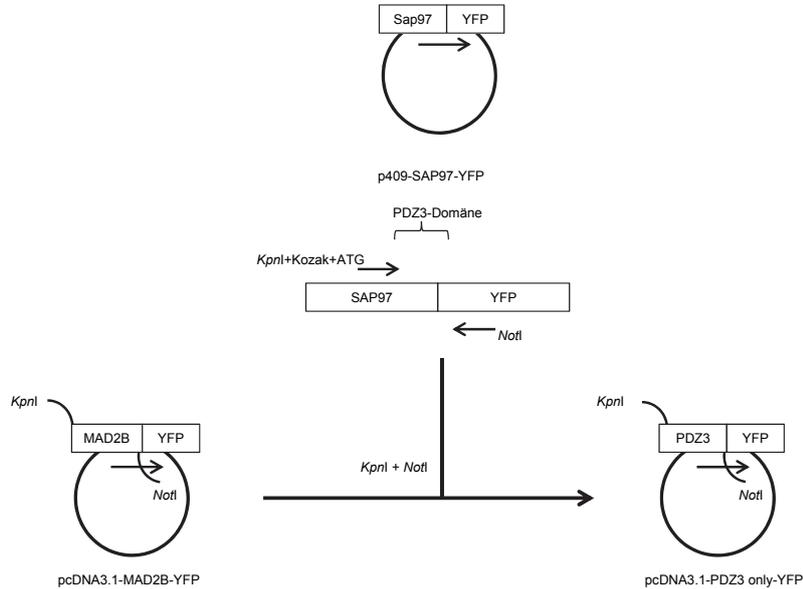


Abbildung 7.1: Klonierungsschema von PDZ3 only. Die PDZ3 Domäne des SAP97 wurde durch eine PCR mit den Primern „PDZ3-only fwd“ und „PDZ3-only rev“ amplifiziert und nach einer Behandlung mit *KpnI* und *NotI* *inframe* in den pcDNA3.1-MAD2B-YFP Vektor kloniert. Der *forward* Primer enthielt neben der *KpnI* Schnittstelle noch eine Kozak-Sequenz und ein Startkodon. Dadurch wurde durch den pcDNA3.1-PDZ3-only-YFP Vektor die PDZ3 Domäne als Fusionsprotein mit YFP exprimiert.

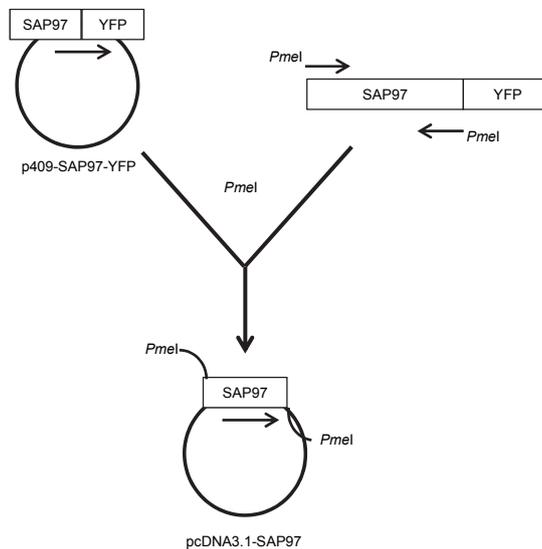


Abbildung 7.2: Deletion des YFP aus SAP97 und SAP97- Δ PDZ3. Um das fusionierte YFP-Protein wieder abzuspalten, wurde der gewünschte Teil des SAP97 bzw. des SAP97- Δ PDZ3 mit einer PCR amplifiziert. Beide Primer waren dabei mit *PmeI* Schnittstellen flankiert, wodurch das PCR-Produkt in einen pcDNA3.1-Vektor kloniert wurde. Verwendete Primer: „sap del GFP fw“ und „sap del GFP rev“. Der erhaltene Vektor wurde als pcDNA3.1-SAP97 bzw. pcDNA3.1-SAP97- Δ PDZ3 bezeichnet.

7.3.2 Klonierungsschemata der IL-23R Varianten

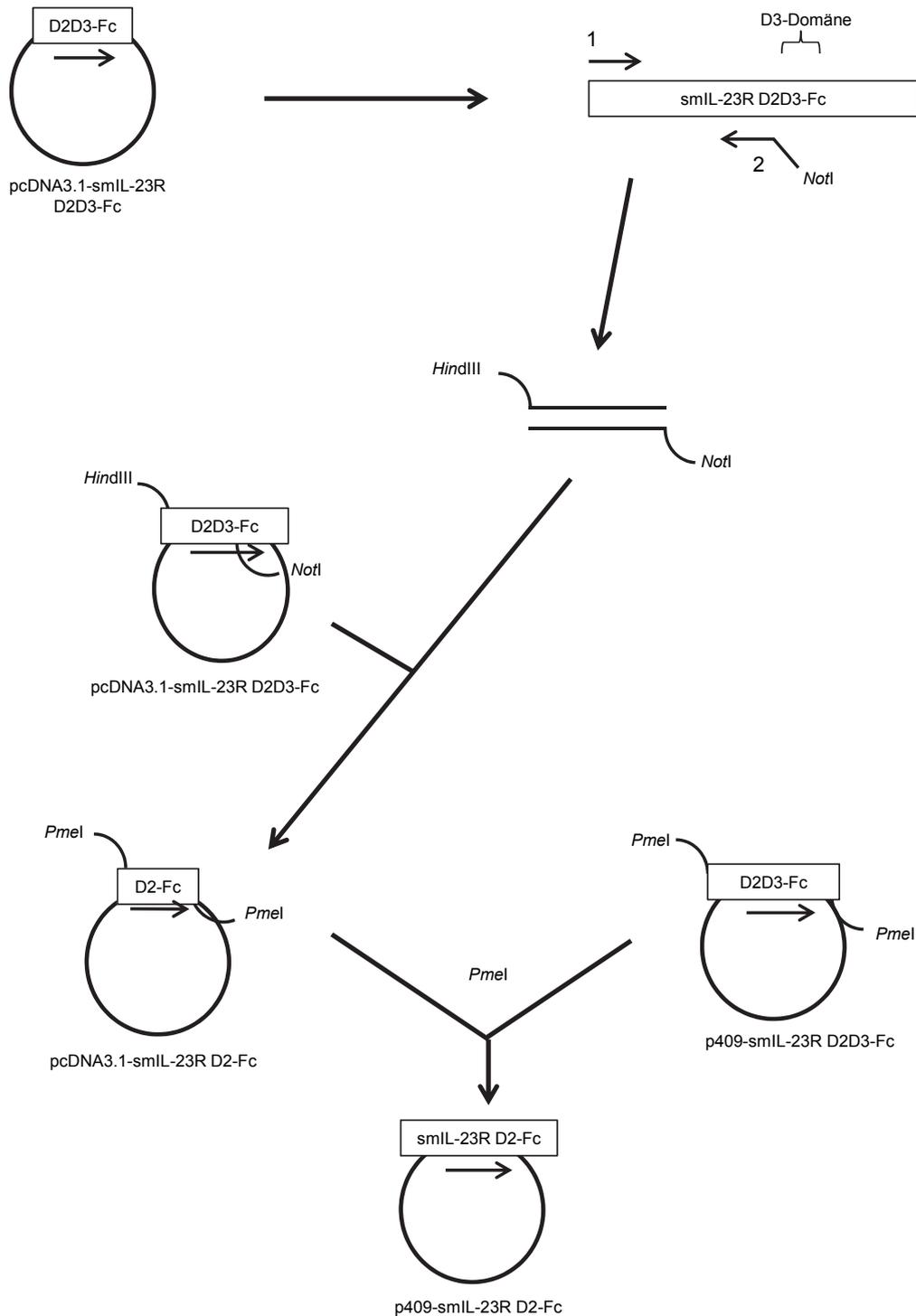


Abbildung 7.3: Klonierungsschema smIL-23R D2. Zur Herstellung der smIL-23R D2-Variante, wurde die D3 Domäne des smIL-23R D2D3 deletiert. Die D2 Domäne wurde mit den Primern „mIL23R pF3“ und „mIL23R-D2-L RP“ amplifiziert. Dieses PCR-Produkt wurde mit *HindIII* und *NotI* geschnitten und in den pcDNA3.1-smIL-23R D2D3 kloniert. Die Umklonierung der erhaltenen D2 Variante erfolgte wieder über *PmeI*. Der entstandene Vektor wurde p409-smIL-23R D2-Fc genannt.

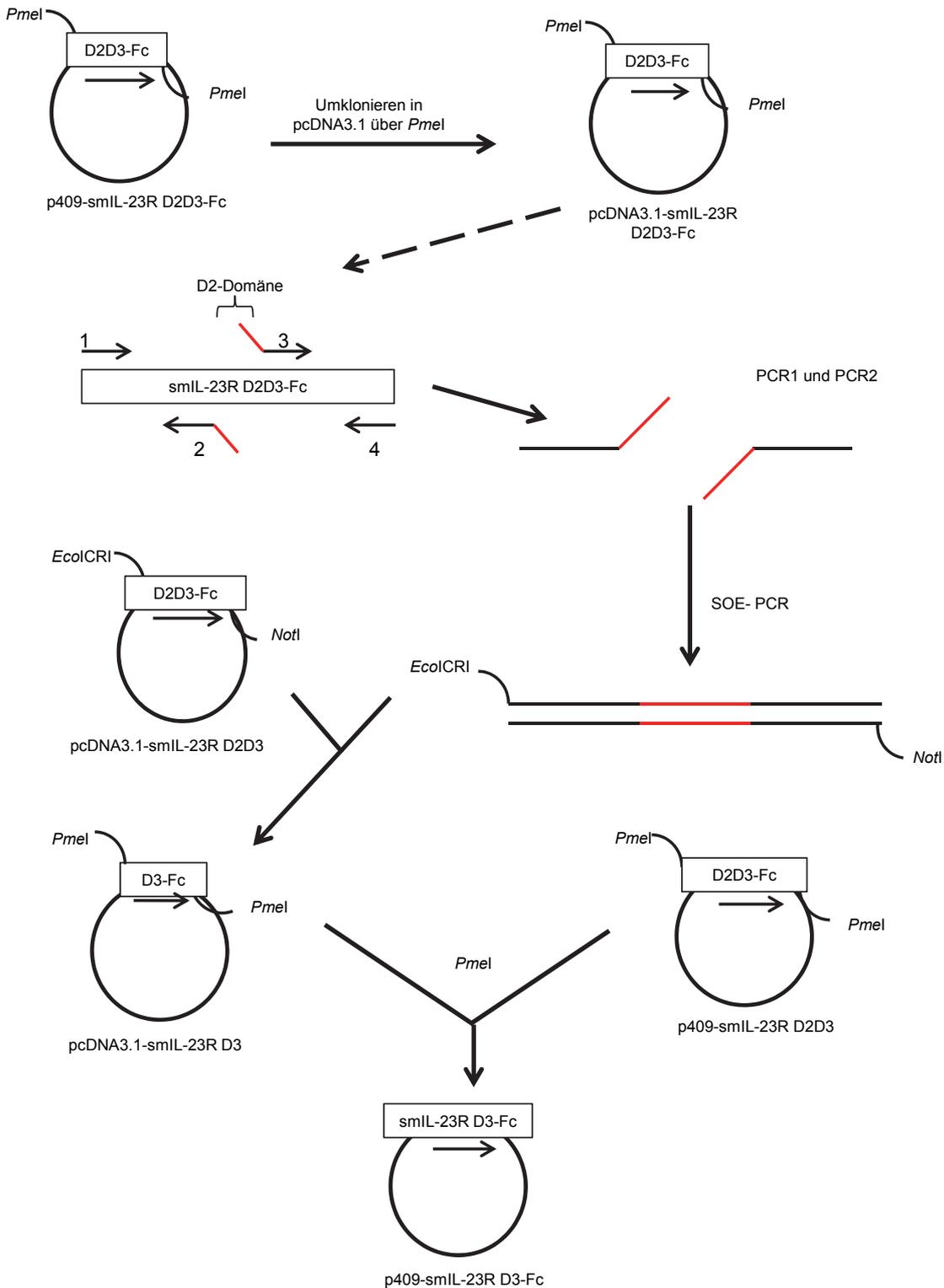


Abbildung 7.4: Klonierungsschema smIL-23R D3. Zur Herstellung der smIL-23R D3-Variante, wurde die D2 Domäne des smIL-23R D2D3 deletiert. Hierfür wurde die D2D3 Variante in einen pcDNA3.1 Vektor über *PmeI* umkloniert. Die Deletion erfolgte über eine SOE-PCR mit den Primern 1: „1fw31IL23soe“, 2: „2re2IL23soe“, 3: „3fwfIL23SOE“ und 4: „4re4IL23SOE“. Dieses PCR-Produkt wurde mit *EcoICRI* und *NotI* geschnitten und in den pcDNA3.1-smIL-23R D2D3 kloniert. Die Umklonierung der erhaltenen D3 Variante erfolgte über *PmeI*. Der erhalten Vektor wurde p409-smIL-23R D3-Fc genannt.

7.3.3 Klonierungsschemata der Toso Varianten

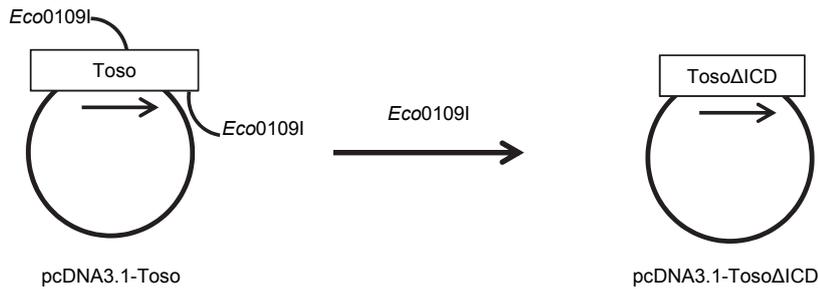


Abbildung 7.5: Klonierungsschema von Toso Δ ICD. Durch die Behandlung des pcDNA3.1-Toso mit *Eco0109I* wurde die intrazelluläre Domäne (ICD) bis auf 8 Aminosäuren deletiert. Der daraus resultierende Vektor erhielt die Bezeichnung pcDNA3.1-Toso Δ ICD.

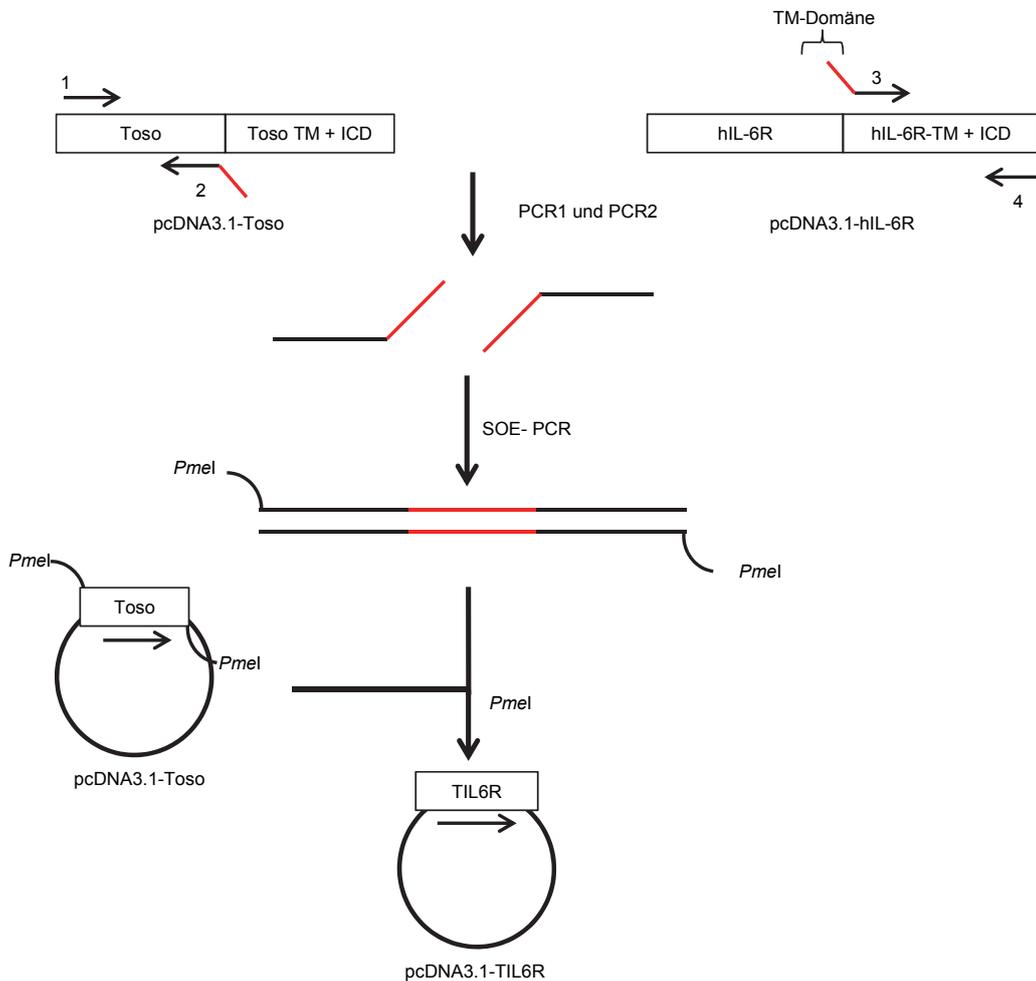


Abbildung 7.6: Klonierung des TIL6R. Das Fusionsprotein, das aus dem extrazellulären Teil des Toso Proteins und der Transmembran- und intrazellulären Domäne des hIL-6R besteht, wurde über eine SOE-PCR kloniert. Hierfür wurde in einer ersten PCR (Primer „Toso IL6R 1 und 2“) der extrazelluläre Bereich des Toso Rezeptors vervielfältigt. Mit einer zweiten PCR wurden die Regionen des hIL-6R amplifiziert (Primer „Toso IL6R 3 und 4“). Durch komplementäre Sequenzen der Primer 2 und 3 wurde in einer SOE-PCR beide PCR-Produkte miteinander verbunden (Primer 1 und 4). Das finale PCR Produkt wurde durch eine *PmeI* Behandlung in einen geschnittenen pcDNA3.1-Vektor kloniert. Das finale Produkt wurde pcDNA3.1-TIL6R genannt.

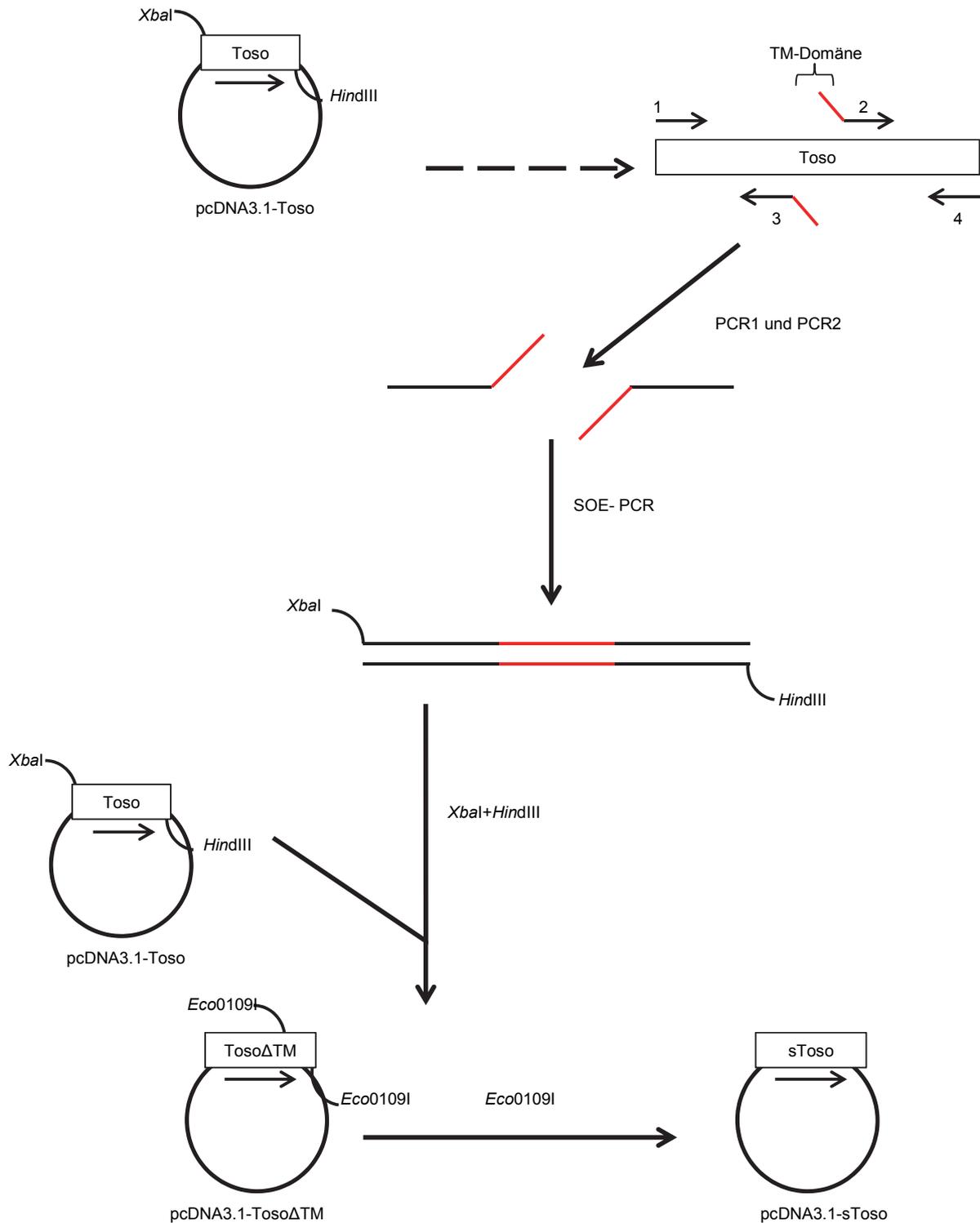


Abbildung 7.7: Klonierungsschema von sToso. Für die Herstellung des löslichen Toso Proteins (sToso) wurde zuerst über eine SOE-PCR die Transmembrandomäne deletiert. Beschreibung s. Abbildung 7.6. Primer: „Toso del TM 1-4“. Durch die Behandlung mit *XbaI* und *HindIII* wurde das finale PCR-Produkt in pcDNA3.1 kloniert. Mit der Behandlung durch *Eco0109I* wurde im Anschluss die intrazelluläre Domäne des TosoΔTM deletiert, wodurch der finale Vektor pcDNA3.1-sToso kloniert wurde.

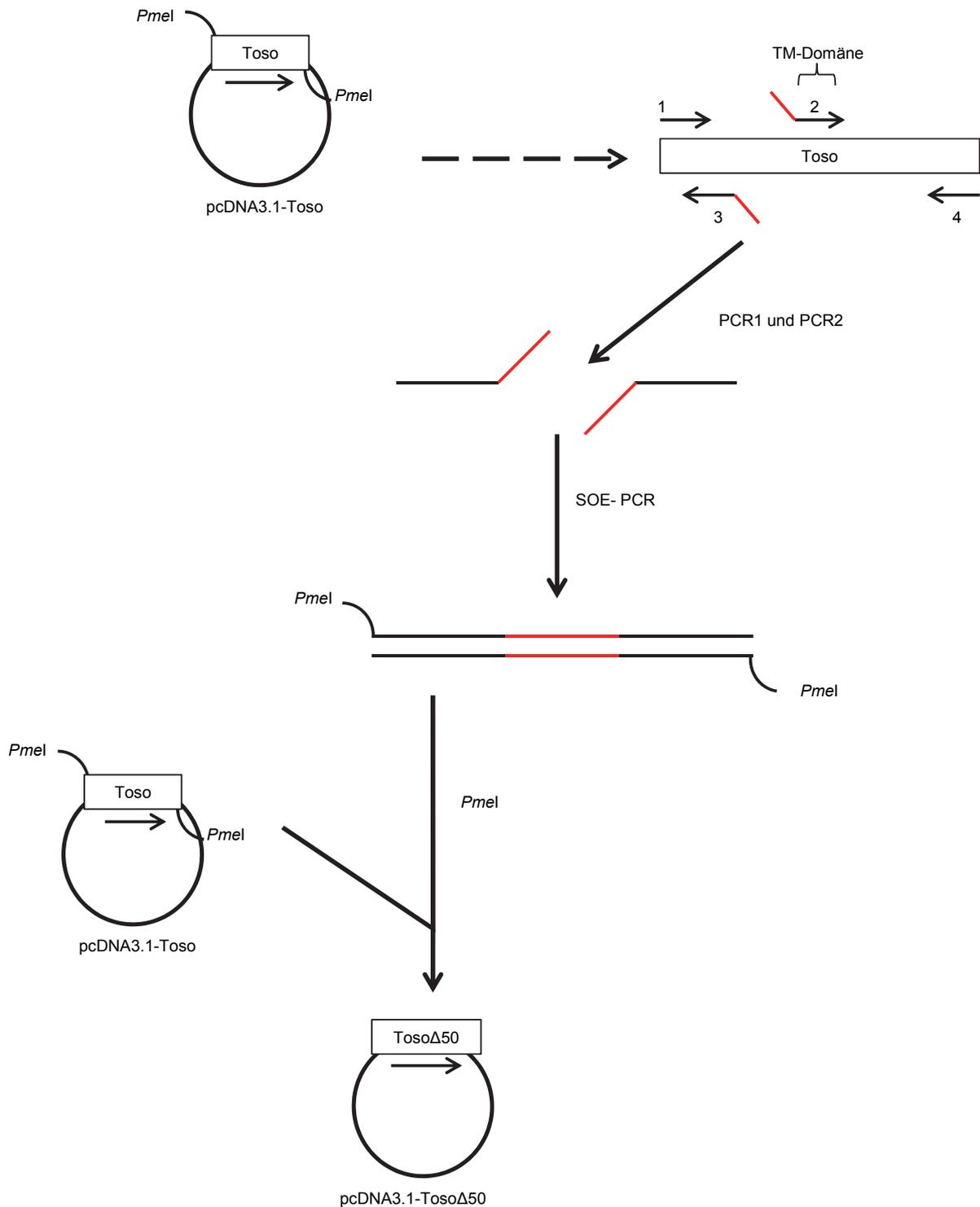


Abbildung 7.8: Klonierungsschema der Stalkdeletionsvariante $\Delta 50$. Für die Eingrenzung der Schnittstelle des Toso Rezeptors wurden 50 Aminosäuren, ausgehend von der Transmembrandomäne mit Hilfe einer SOE-PCR deletiert. Erklärung der SOE-PCR s. Abbildung 7.6. Verwendete Primer: 1: „Toso del IG1“, Rest: „Toso d50 2-4“. Durch das Schneiden des finalen PCR-Produktes mit *PmeI* und der anschließenden Ligation wurde das Plasmid pcDNA3.1-Toso $\Delta 50$ erstellt.

7.4 Publikationen

Originalbeiträge:

- **Franke M.**, Schröder J., Monhasery N., Ackfeld T., Hummel, T.M., Rabe, B., Garbers C., Becker-Pauly C., Floss, D.M., Scheller J. (2016): “Human and murine Interleukin 23 receptors are novel substrates for A Disintegrin and Metalloproteases ADAM10 and ADAM17” *JBC* 291(20): 10551-61
- Monhasery N., Moll J., **Franke M.**, Nitz R., Lokau J., Floss D.M., Piekorz R., Garbers C., Scheller J.(2016): “Transcytosis of Interleukin (IL-)11 and apical redirection of gp130 is mediated by IL-11 α -receptor” *CELL-REPORTS-D-15-02673R2*
- Nakhaei-Rad S., Nakhaeizadeh H., Götze S., Kordes C., Sawitzka I., Hoffmann M.J., **Franke M.**, Schulz W.A., Scheller J., Piekorz R.P., Häussinger D., Ahmadian M.R. (2016): “The Role of Embryonic stem cell-expressed RAS (ERAS) in the maintenance of quiescent hepatic stellate cells“ *JBC* 291(16): 8399-413

Reviews:

Floss, D.M., Schröder, J., **Franke, M.**, Scheller, J. (2015): “Insights into IL-23 biology: From structure to function.” *Cytokine & growth factor* 26(5): 569-578

Tagungsbeiträge:

Franke, M., Scheller, J., Garbers, C. (2014): “SAP97 regulates ADAM 17-mediated proteolysis of the Interleukin-6 Receptor.” Interleukin 6 MidTerm Conference of the ICIS, Kiel, Germany

Franke, M., Floss, D.M., Scheller, J., (2015): “Shedding of the IL-23 Receptor by Metalloproteases” Cytokines Congress of the ICIS, Bamberg, Germany

7.5 Danksagungen

Als erstes gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Scheller für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit in seinem Institut anzufertigen. Außerdem möchte ich mich für die gute Betreuung und die schnelle Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Bei Prof. Dr. Thomas Klein möchte ich mich für das Zweitgutachten bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Christoph Garbers für die ausgezeichnete Betreuung, die auch trotz des Wechsels nach Kiel bestehen blieb.

Frau Dr. Doreen Floss und PhD Jens Moll danke ich für die Betreuung und Unterstützung bei der Planung neuer Experimente und der Behebung von auftretenden Problemen.

Für die Erstellung der Plasmide und der stabilen Zelllinien des IL-23R Projektes, bedanke ich mich bei den ehemaligen Mitgliedern der AG Scheller: Theresa Ackfeld, Thorben Hummel und Gregor Ciupka.

Ein weiteren Dank sende ich nach Kiel an Björn Rabe und Christoph Becker-Pauly für die Erstellung der ADAM *Knockout* HEK293T-Zellen und dass sie mir diese so schnell zur Verfügung gestellt hatten.

Für die netten Gespräche und Diskussionen während der Mittagspause und im Labor bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der AG Scheller. Dabei gilt mein besonderer Dank meinen beiden Labornachbarn Paul Baran und Jutta Schröder. Besonders erwähnen möchte ich noch Samadhi Aparicio Siegmund, Niloufar Monhasery und Petra Oprea Jeremic.

Bei all meinen Freunden möchte ich mich aus tiefstem Herzen bedanken. Besonders dem Stammtisch aus Aachen für das lustige Studium und den alljährlichen Weihnachtsfeiern. Den Further Engeln danke für die Freundschaft die schon so lange besteht. Hierbei ein besonderer

7 Anhang

Dank an Thomas Thiel für die langen netten Abende, die wir schon seit unserer Jugend miteinander verbringen.

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie mich während des Studiums und der Promotion immer unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt Sonja. Danke für alles. Die Unterstützung, Korrektur und die Motivation, wenn mal etwas nicht geklappt hat. Ich bin froh, dass ich dich habe und du immer für mich da bist. Ich liebe dich.

7.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die hier vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe unter Beachtung der “Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt habe.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Es wurden bisher keine erfolglosen Promotionsversuche von mir unternommen.

Düsseldorf, im Juni 2016

Manuel Franke