

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Jürgen Scheller

Unterschiede in der proteolytischen Spaltung von Interleukin-6- und Interleukin-11-Rezeptor

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Rebecca Lucia Nitz

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino

Für Anke und Jens

Geld ist rund und rollt weg, aber Bildung bleibt.

Heinrich Heine

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Baran, P., Nitz, R., Grötzinger, J., Scheller, J., Garbers, C. (2013), Minimal Interleukin (IL-)6 receptor stalk composition for IL-6R shedding and IL-6 classic signaling, *J Biol Chem*.

Nitz, R., Lokau, J., Aparicio-Siegmund, S., Scheller, J., Garbers, C. (2015), Modular organization of Interleukin-6 and Interleukin-11 α -receptors, *Biochimie*.

Lokau, J., Nitz, R., Agthe, M., Monhasery, N., Aparicio-Siegmund, S., Schumacher, N. Wolf, J., Möller-Hackbarth, K., Waetzig, G. H., Grötzinger, J., Müller-Newen, G., Rose-John, S., Scheller, J., Garbers, C. (2016), Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling, *Cell Reports*.

Monhasery, N., Moll, J., Cuman, C., Franke, M., Lamertz, L., Nitz, R., Görg, B., Häusinger, D., Lokau, J., Floss, D. M., Piekorz, R., Dimitriadis, E., Garbers, C., Scheller, J (2016), Transcytosis of IL-11 and apical redirection of gp130 is mediated by IL-11 α -receptor, *Cell Reports*.

Zusammenfassung

Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-11 (IL-11) besitzen wichtige Aufgaben bei der Differenzierung und Proliferation von Immunzellen bei Entzündung und Krebsentstehung. Beide Zytokine binden an ihre membranständigen Alpha-Rezeptoren und benötigen zusätzlich die Rekrutierung eines gp130-Homodimers zur Signaltransduktion. Diese verläuft über einen JAK/STAT-Signalweg und reguliert die Transkription im Zellkern. Beim IL-6 ist neben dem klassischen Signalweg auch ein Trans-Signalweg beschrieben. Dabei wird der membranständige IL-6-Rezeptor (IL-6R) von ADAM10 oder 17 (A Disintegrin And Metalloprotease) proteolytisch gespalten (Shedding) und kann als lösliche Rezeptorform freies IL-6 binden. Da gp130 ubiquitär im Körper vorkommt können so nahezu alle Zellen aktiviert werden. Für den IL-11-Rezeptor (IL-11R) wurde bisher kein Shedding beschrieben und damit auch kein Trans-Signalweg.

Um zu untersuchen welcher Rezeptorteil für das Shedding von Bedeutung ist und warum der IL-11R nicht geschnitten wird, wurden Rezeptorchimären aus beiden Rezeptortypen kreiert. Dabei wurden Teile der Stalk-, Transmembran- und Intrazellulär-Region ausgetauscht. Die Wild-Typ-Rezeptoren sowie ihre Chimären wurden in HEK293 und COS7 Zellen transfiziert und Shedding-Stimuli ausgesetzt. Lösliche Rezeptorformen aus den Zellüberständen wurden mittels Immunoprecipitation und ELISA detektiert.

Es zeigte sich, dass die Stalk-Region des IL-6R für das ADAM-17-Shedding benötigt wird. Für alle Rezeptorchimären, die die Stalk-Region des IL-6R besitzen, konnten lösliche Rezeptorformen im Überstand nachgewiesen werden. Umgekehrt gilt dies nicht für Chimären mit dem Stalk-Bereich des IL-11R. Um die Schnittstelle für ADAM17 weiter einzugrenzen wurden zwei Chimären kloniert, bei denen jeweils fünf Aminosäuren ober- und unterhalb der ADAM17-Schnittstelle ausgetauscht sind, der restliche Teil des Rezeptors aber dem Wild-Typ entspricht. Auch hier ließ sich zeigen, dass die Chimäre mit den letzten zehn Aminosäuren aus der IL-6R-Stalk-Region geschnitten wurde. Stammen sie hingegen aus dem IL-11R ließ sich kein Shedding beobachten. Erstaunlicherweise galten diese Beobachtungen nicht für ADAM10 induziertes Shedding. Hier ließen sich auch für den IL-11R und dessen Chimären lösliche Rezeptorformen nachweisen. Diese Arbeit beweist die Annahme, dass die ADAM17-Schnittstelle im membran nahen Teil des Stalk-Bereichs liegt und beim IL-11R nicht vorkommt. Die ADAM10-Schnittstelle liegt wahrscheinlich nicht im selben Bereich und ist auch beim IL-11R zu finden. Zum ersten Mal konnte durch diese

Arbeit gezeigt werden, dass der IL-11R ebenfalls proteolytisch gespalten wird. Ein Trans-Signalweg des IL-11 ist prinzipiell möglich und kann analog zum IL-6 Trans-Signalweg durch lösliches gp130Fc gehemmt werden.

In Zukunft sollte noch genauer untersucht werden, ob das IL-11R-Shedding auch in endogen IL-11R-tragenden Primärzelllinien nachgewiesen werden kann und löslicher IL-11R im menschlichen Blut zu finden ist. Auch sollte gezeigt werden, welche Bedeutung dem löslichen IL-11R zukommt. Zusammenfassend beschreibt diese Studie zum ersten Mal die proteolytische Freisetzung des IL-11R durch die Metalloprotease ADAM10. Der hierdurch initiierte IL-11 Trans-Signalweg erweitert das Spektrum der durch IL-11 aktivierbaren Zellen, mit weitreichenden noch zu untersuchenden Konsequenzen *in vivo*.

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
As	Aminosäure(n)
Ak	Antikörper
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CBM	Zytokin-bindendes Modul
D1-D3	Domäne 1-3
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbant Assay</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FNIII	Fibronectin-Typ-III-Domäne
gp130	Glykoprotein 130
GPL	<i>gp130 like protein</i>
h	human/ Stunde
ICD	Intrazelluläre Domäne
IgG	IgG-ähnliche Domäne
IL-11	Interleukin-11
IL-11R	Interleukin-11-Rezeptor
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor

JAK	Janus-Kinase
LIFR	LIF-Rezeptor
m/V	Masse pro Volumen
μ l	Mikroliter
min	Minuten
ml	Milliliter
ng	Nanogramm
OSMR	OSM-Rezeptor
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Piccogramm
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Stalk-Region
sec	Sekunden
sIL-6R	löslicher Interleukin-6-Rezeptor
SOE-PCR	<i>Splicing by overlapping extensions-PCR</i>
TM	Transmembran-Domäne
U	Units
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Eigenschaften und Klassifizierung von Zytokinen	1
1.2 Die Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-11	3
1.3 Die alpha-Rezeptoren von IL-6 und IL-11	5
1.4 Klassischer und Trans-Signalweg	6
1.5 Intrazelluläre Signaltransduktion	8
1.6 Limitierte Proteolyse und die Proteasen ADAM10 und ADAM17	9
2 Ziel dieser Arbeit	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Material	16
3.1.1 Antibiotika	16
3.1.2 Antikörper	16
Primäre Antikörper	16
Sekundäre Antikörper	17
3.1.3 Chemikalien	18
3.1.4 Enzyme	19
3.1.5 Größenmarker	19
3.1.6 Kits	19
3.1.7 Kulturmedien	20
Bakterien	20
Zellkultur	21
3.1.8 Oligonukleotide	21
3.1.9 Plasmide	22
3.1.10 Puffer und Lösungen	22
3.1.11 Rekombinante Proteine	25
3.1.12 Zelllinien	25
3.2 Methoden	27

3.2.1	Molekularbiologische Methoden	27
	Mini-Präparation von DNA	27
	Midi-Präparation von DNA	27
	Bestimmung von DNA-Konzentrationen	28
	Enzymatische Spaltung von DNA	28
	DNA-Gelelektrophorese	28
	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	29
	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	29
	Herstellung des pMOWS-Vektors	29
	Ligation von DNA-Fragmenten	29
	Transformation von Expressionsvektoren in kompetente <i>XL1 blue</i> <i>E.coli</i>	30
3.2.2	Zellkultur	30
	Kultivierung von Zellen	30
	Transfektion adhärenter Zelllinien	32
	Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen	32
	Shedding-Experimente	32
	Proliferationsassay	33
	Phospho-Stat3-Assay	34
	Isolierung von mononuklearen Zellen aus humanem Blut	34
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	35
	BCA-Assay	35
	SDS-PAGE	35
3.2.4	Immunbiochemische Methoden	35
	Western Blot	35
	ELISA	36
	Präzipitation mittels Concanavalin A Sepharose	37
	Durchflusszytometrie	37
3.2.5	Deglykosylierung von Proteinen	38
3.2.6	Statistische Auswertung	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Klonierung des humanen IL-11-Rezeptors	39
4.2	Transfektion von HEK293-Zellen mit IL-6- und IL-11-Rezeptor und Induktion von ADAM17-Shedding mittels PMA	39
4.3	Klonierung von zehn Rezeptorchimären aus IL-11- und IL-6-Rezeptor	41
4.4	Prüfung der Rezeptorchimären auf Expression und Funktionalität	46
4.5	ADAM17-Shedding nach PMA-Stimulation	51
4.6	ADAM10-Shedding nach Ionomycin-Stimulation	54
4.7	Endogener Nachweis von IL-11R und dessen Shedding	59

4.8	Trans-Signaling des IL-11R in Ba/F3gp130 Zellen	64
4.9	Glykosylierung von IL-11R und IL-6R	65
5	Diskussion	67
5.1	IL-6R- und IL-11R-Shedding <i>in vitro</i>	67
5.2	Endogenes IL-11R-Shedding	69
5.3	Der IL-11R-Trans-Signalweg und Hemmung durch sgp130Fc	70
5.4	Ausblick	71
	Literaturverzeichnis	74
6	Anhang	92
6.1	Alignment von humanem IL-6R und IL-11R	92
6.2	Alignment des IL-11R von Mensch, Ratte und Maus	93
6.3	Übersicht über die monoklonalen Antikörper von IL-6R und IL-11R	94
6.4	Klonierungsverfahren der Rezeptorchimären	95
6.5	Plasmidkarten	100

Abbildungsverzeichnis

1.1	Familie der Typ-IL-6-Zytokinrezeptoren	3
1.2	Struktur und Bindungsverhalten der Zytokine am Beispiel von IL-6	4
1.3	Aufbau von IL-6R und IL-11R	6
1.4	Klassischer und Trans-Signalweg	8
1.5	Schematische Darstellung von gp130 und ADAM	9
4.1	Expression von IL-6R und IL-11R in HEK293-Zellen	40
4.2	ELISA-Messung von HEK293-Überständen von IL-6R und IL-11R	41
4.3	Darstellung der Rezeptorchimären	42
4.4	Klonierungsverfahren von Chimäre I.	44
4.5	Expression der IL-6R-Varianten und IL-11R-Varianten in HEK293-Zellen	47
4.6	Rezeptorvarianten im Proliferationsassay	48
4.7	P-Stat3-Assay der IL-6R-Varianten	49
4.8	P-Stat3-Assay der IL-11R-Varianten	50
4.9	ADAM17-induziertes Shedding der IL-6R-Varianten	52
4.10	ADAM17-induziertes Shedding der IL-11R-Varianten	53
4.11	ADAM10-induziertes Shedding bei IL-6R und IL-11R	55
4.12	ADAM10-induziertes Shedding der IL-6R-Varianten	57
4.13	ADAM10-induziertes Shedding der IL-11R-Varianten	58
4.14	Nachweis und Funktionalität des IL-11R in K562-Zellen	59
4.15	Analyse der Anfärbarkeit und des Sheddings von IL-11R auf der Zelloberfläche humaner Makrophagen	61
4.16	Nachweis und Funktionalität des IL-11R in Rattenhepatozyten	63
4.17	Transsignaling des IL-11R in Ba/F3-gp130-Zellen	65
4.18	Glykosylierung von IL-6R und IL-11R	66
5.1	Hemmung des IL-11/IL-11R-Komplexes durch sgp130-Fc.	71
6.1	Alignment von hIL-6R und hIL-11R	92
6.2	Alignment des IL-11R in Maus, Ratte und Mensch	93
6.3	Übersicht über verwendete Antikörper	94
6.4	Klonierungsverfahren von Chimäre I und II	95
6.5	Klonierungsverfahren von Chimäre III und IV	96

6.6	Klonierungsverfahren von Chimäre V und VI	97
6.7	Klonierungsverfahren von Chimäre VII und VIII	98
6.8	Klonierungsverfahren von Chimäre IX und X	99
6.9	Plasmidkarte des IL-6R	100
6.10	Plasmidkarte des IL-11R	101
6.11	Plasmidkarte von Chimäre I	102
6.12	Plasmidkarte von Chimäre II	103
6.13	Plasmidkarte von Chimäre III	104
6.14	Plasmidkarte von Chimäre IV	105
6.15	Plasmidkarte von Chimäre V	106
6.16	Plasmidkarte von Chimäre VI	107
6.17	Plasmidkarte von Chimäre VII	108
6.18	Plasmidkarte von Chimäre VIII	109
6.19	Plasmidkarte von Chimäre IX	110
6.20	Plasmidkarte von Chimäre X	111

Tabellenverzeichnis

1.1	Übersicht über wichtige Substrate von ADAM10 und ADAM17	12
3.3	Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien	18
3.4	Übersicht der verwendeten Kits	19
3.5	Verwendete Oligonukleotide	21
3.6	In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen	22
3.7	Übersicht Shedding-Experiment	33
3.8	Zytokinkonzentrationen im Proliferationsassay	34
4.1	Ansatz für SOE-PCR/PCR	43
4.2	Temperaturintervalle PCR	43
4.3	Übersicht über das Klonierungsvorgehen aller Rezeptorvarianten	45

1 Einleitung

1.1 Eigenschaften und Klassifizierung von Zytokinen

Zytokine sind Botenstoffe des Körpers, die Abwehrzellen, aber auch anderen Körperzellen, untereinander Signale vermitteln. Zytokine können weiter unterteilt werden in Interleukine, Interferone, Chemokine und Wachstumsfaktoren (GEORG LÖFFLER, 2006). Interleukine dienen der Immunabwehr, Hämatopoese und Apoptose und sind bei Entzündung erhöht. Interferone spielen eine wichtige Rolle bei der Virusabwehr, der Proliferationshemmung und ebenfalls bei Apoptose. Chemokine werden bei Migration und Chemotaxis ausgeschüttet und Wachstumsfaktoren bei Proliferation und Zelldifferenzierung. Diese Arbeit wird sich näher mit der Gruppe der Interleukine befassen, die sehr pleiotrope, d.h. sehr vielfältige Funktionen haben.

Interleukine sind kleine Glykoproteine mit einer Größe von unter 30 kDa. Sie können von Zellen sezerniert werden und wirken auf vielen unterschiedlichen Wegen: Entweder parakrin auf direkte Nachbarzellen, autokrin auf die sezernierende Zelle selbst oder endokrin über die Blutbahn auf auch weit entfernte Zellen. Dabei kann eine Konzentration im Nano- bis Picobereich schon ausreichend sein, um einen Effekt zu erzeugen.

Für die Bindung des Interleukins an die Zelloberfläche sind spezielle Rezeptoren notwendig. Zunächst bindet das Zytokin an dessen alpha-Rezeptor (α -Rezeptor). Zusätzlich wird darauffolgend oft noch ein beta-Rezeptor (β -Rezeptor) rekrutiert, der ebenfalls für die Signaltransduktion notwendig ist.

Da diese Arbeit sich auf Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-11 (IL-11) sowie deren Rezeptoren (IL-6R und IL-11R) bezieht, sollen diese und deren Gruppe hier kurz vorgestellt werden:

Zur Familie der IL-6 ähnlichen Zytokine zählen neben IL-6 und IL-11, IL-27, IL-31, Leukämie-Inhibitor-Factor (LIF), Oncostatin M (OSM), Ciliärer Neurotrophischer Faktor (CNTF), *cardiotrophin-like cytokine* (CLC) und Cardiotrophin (CT)-1. Diese Zytokine haben eine ungefähre Molekularmasse von 20 kDa und sind fast alle (bis auf CNTF) sekretorische Proteine mit N-terminalem Signalpeptid.

Die passenden Rezeptoren dieser Gruppe werden als *IL-6-type cytokine receptor complexes* (HEINRICH et al., 1998) zusammengefasst. Alle Rezeptortypen zählen zur Klasse der Typ I-Membranproteine, mit einem extrazellulären N-terminalem Teil und nur einer Trans-

membrandomäne. Weiter können sie noch in die Zytokin-Rezeptor-Klasse I-Familie eingeteilt werden. Diese zeichnen sich durch eine Ig-ähnliche Domäne (meist am N-Terminus) und mindestens eine Zytokin-Bindungsstelle (CBM) aus, die aus zwei Fibronectin-Typ III-Domänen besteht. Diese enthalten an der N-terminalen Domäne vier konservierte Cysteinreste und an der C-terminalen Domäne ein WSXWS-Motiv (Tryptophan-Serin-beliebige andere Aminosäure-Tryptophan-Serin); in Abbildung 1.3 an IL-6R und IL-11R exemplarisch dargestellt. Zudem benötigen alle Typ-IL-6-Zytokinrezeptoren mindestens ein 130 kDa Glykoprotein (gp130) als β -Rezeptor zur Signaltransduktion (HEINRICH et al., 1998). Ausgenommen von dieser Regel ist das IL-31, das neben dem OSM-Rezeptor (OSMR) den gp130-ähnlichen IL-31 Rezeptor A rekrutiert (*gp130-like* (GPL)).

Die α -Rezeptoren IL-6R und IL-11R benötigen zusätzlich zwei gp130-Moleküle, der CNTF-Rezeptor ein LIF-Rezeptor (LIFR)- und ein gp130-Molekül. OSMR und LIFR benötigen nur ein gp130-Molekül als β -Rezeptor, OSM kann zusätzlich den LIFR als α -Rezeptor nutzen. Eine Besonderheit stellt das lösliche Epstein-Barr-Virus-induzierte Gen 3 (EBI3) mit p28 (IL-30) dar, die zusammen das IL-27 bilden und über ein Molekül gp130 und ein Molekül WSX-1 (IL-27R) signalisieren.

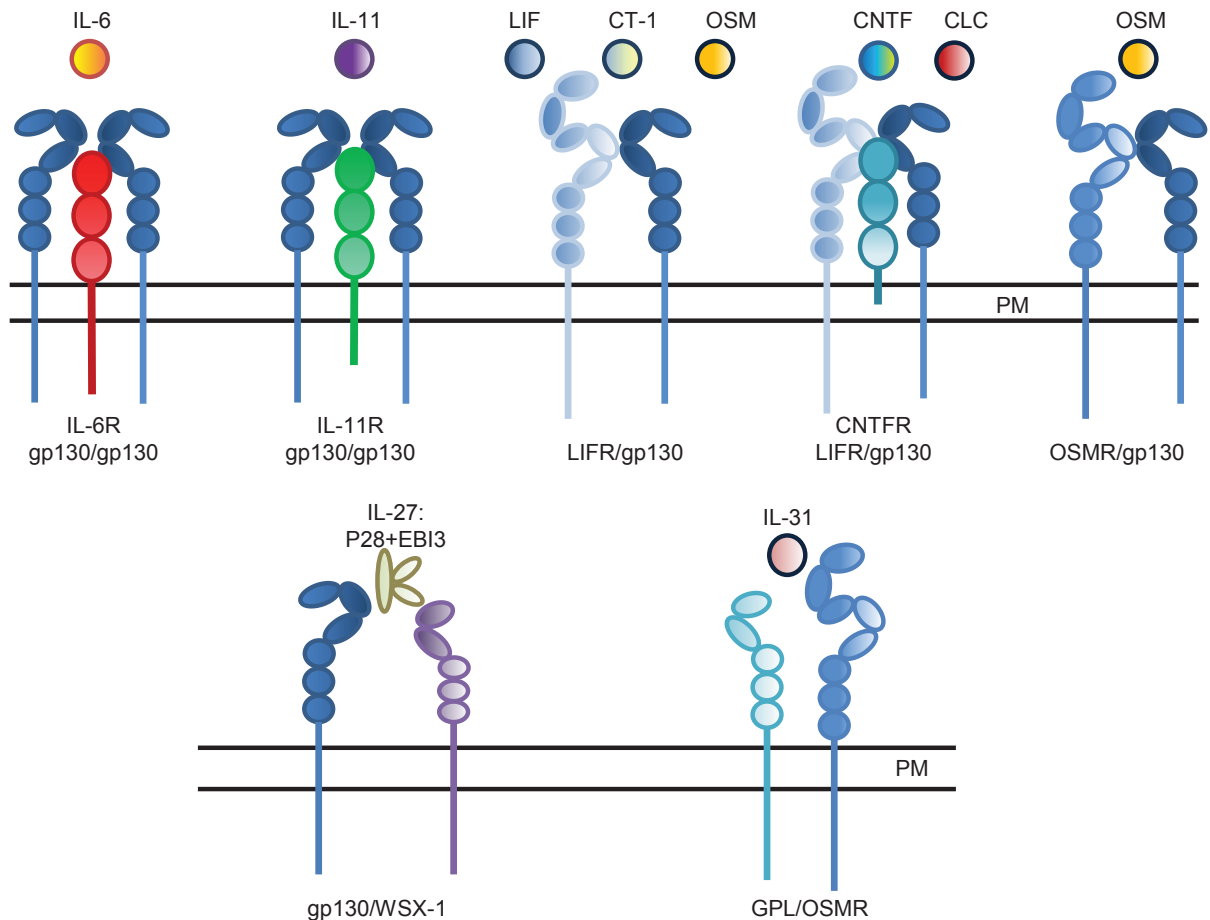


Abbildung 1.1: Übersicht über die Familie der Typ-IL-6-Zytokinrezeptoren. Abbildungen modifiziert aus GARBERS et al., 2012.

1.2 Die Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-11

Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-11 (IL-11) haben eine Struktur aus vier α -Helix-Bündeln. Diese folgen einer *up-up-down-down*-Struktur (HEINRICH et al., 1998). Für IL-6 ist bekannt, dass es drei wesentliche Bindungsstellen besitzt. An Stelle I bindet der α -Rezeptor IL-6R, an Stelle II und III bindet die CBM und IgG-ähnliche Domäne des β -Rezeptors gp130 (GRÖTZINGER et al., 1997; GARBERS et al., 2012). Für IL-11 wurde ähnliches beschrieben (TACKEN et al., 1999; BARTON et al., 2000), sodass beide Zytokine schematisch mit dem in Abbildung 1.2 gezeigten Aufbau dargestellt werden können. Obwohl beide Zytokine in ihrer relativen Positionierung zu gp130 ähnlich sind, konnten Unterschiede im strukturellen Aufbau und im Bindungsverhalten v.a. für Stelle II festgestellt werden (PUTOCZKI et al., 2014).

IL-6 kann entweder pro- oder antiinflammatorisch wirken (SCHELLER et al., 2011b) und

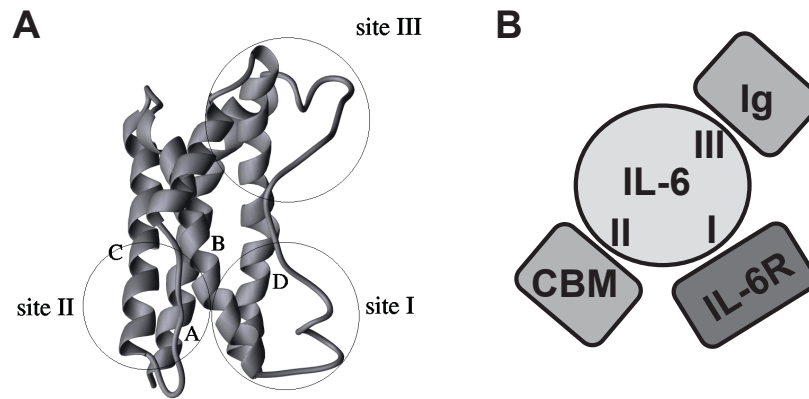


Abbildung 1.2: A: Struktureller Aufbau der Zytokine am Beispiel von IL-6 (A und C stellen die *up-Loops* dar, B und D die *down-Loops*). B: Schematische Übersicht über den Zytokin-Zytoproteinrezeptorkomplex bei Bindung: *site I* von IL-6 bindet an den α -Rezeptor, *site II* an die CBM von gp130, *site III* an die Ig-ähnliche Domäne von gp130. Abbildungen modifiziert aus GARBERS et al., 2012.

wird sezerniert von Makrophagen, Osteoblasten, Myozyten und T-Zellen (BENDTZEN, 1988). Daraus ergibt sich auch dessen pleiotrope Wirkung: IL-6 stimuliert z.B. B-Zellen zur Differenzierung in Plasmazellen, T-Zellen zur Differenzierung in cytotoxische T-Zellen, inhibiert das Wachstum von einigen Tumorzellen und ist beteiligt an der Akute-Phase-Protein-Produktion in der Leber (KAMIMURA et al., 2003). IL-6 ist wesentlich beteiligt an chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis oder Morbus Crohn (CHALARIS et al., 2011).

IL-11 ist ebenfalls in Reaktionen von Entzündung und Immunabwehr involviert. Freigesetzt wird es durch Osteoblasten, Fibroblasten oder Chondrozyten, obwohl die Hauptquelle von IL-11 im Körper bis heute noch ungeklärt ist (PUTOCZKI und ERNST, 2010). Die Funktionen von IL-11 sind ebenso vielfältig wie die von IL-6: Es fördert die IgG-Produktion von Plasmazellen, stimuliert die Hämatopoese, steigert die Knochenabsorption von Osteoklasten und führt zu regenerativen Effekten in der intestinalen Mukosa (PUTOCZKI und ERNST, 2010). IL-11 regt wegen seiner proliferationsfördernden Wirkung insbesondere Krebszellen zum Wachstum an, vor allem gastrointestinale Tumorzellen epithelialer Herkunft (PUTOCZKI und ERNST, 2010). Auf der anderen Seite wirkt es protektiv auf Myokardzellen, indem es über STAT3-Aktivierung Apoptose vermindert, die Kapillarendichte erhöht und übermäßiges Remodeling mit Fibrosierung verhindert (OBANA et al., 2010).

1.3 Die alpha-Rezeptoren von IL-6 und IL-11

Im Folgenden sollen die α -Rezeptoren von IL-6 und IL-11 hinsichtlich ihres Aufbaus und ihres Vorkommens auf humanen Zelltypen näher betrachtet werden.

Analog zu den in Abschnitt 1.2 beschriebenen Wirkungsweisen von IL-6 und IL-11 werden ihre α -Rezeptoren nur auf wenigen Zelltypen exprimiert: IL-6R findet sich z.B. auf Hepatozyten, Leukozyten und Makrophagen (CHALARIS et al., 2011); IL-11R wird z.B. in Kardiomyozyten, Thymus- und Knochenzellen exprimiert (OBANA et al., 2010; PUTOCZKI und ERNST, 2010). Der IL-11R ist auch auf einigen Tumorzellen, wie z.B. bei Leukämie, vermehrt vorhanden (KARJALAINEN et al., 2015; PUTOCZKI und ERNST, 2015). Der für beide Zytokine signaltransduzierende β -Rezeptor gp130 wird im Gegensatz dazu ubiquitär exprimiert.

Beide Rezeptortypen zeigen einen ähnlichen strukturellen Aufbau aus drei extrazellulären Domänen (D1, D2, D3) und jeweils einer Stalk-Region (S), einer Transmembran-Region (TM) und einer intrazellulären Domäne (ICD, siehe Abbildung 1.3). D1 stellt die Ig-ähnliche Domäne (Ig) dar, D2 und D3 die Fibronectin-Typ III-Domänen (FN III), die gemeinsam das Zytokin-bindende Modul (CBM) bilden. Die intrazelluläre Domäne unterscheidet sich wesentlich in der Größe: beim IL-11R enthält sie 31 Aminosäuren, beim IL-6R 82 Aminosäuren (HEINRICH et al., 1998). Obwohl sie nicht an der Rekrutierung von gp130 und der Signaltransduktion beteiligt ist, wird der ICD, zumindest für den IL-6R, eine Funktion bei der basolateralen Sortierung der α -Rezeptoren zugesprochen (MARTENS et al., 2000).

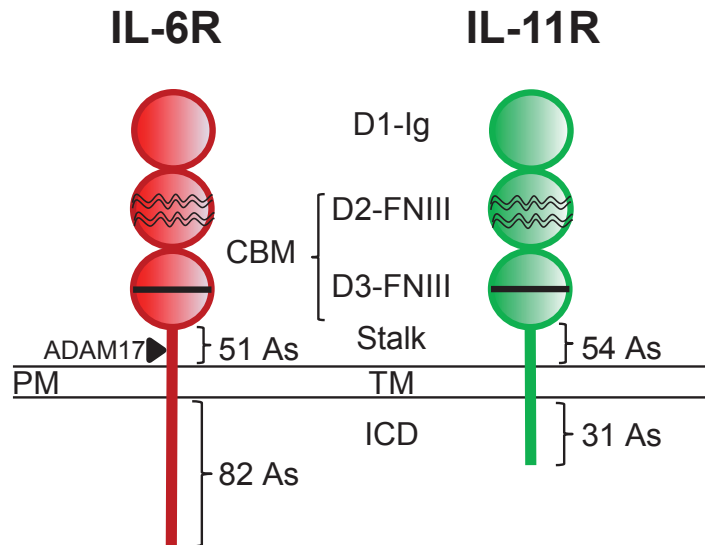


Abbildung 1.3: Aufbau von IL-6R und IL-11R: Die dünnen gewellten Linien stellen die vier konservierten Cysteinreste dar, der dicke schwarze Balken die WSXWS-Motive (modifiziert aus HEINRICH et al., 1998). Der kleine schwarze Pfeil markiert die ADAM17-Schnittstelle zwischen den As Gln357 und Asp358. Die anderen Bezeichnungen sind oben im Text näher erläutert.

1.4 Klassischer und Trans-Signalweg

Wie in den vorherigen Abschnitten bereits erwähnt ist neben dem Zytokin und dem α -Rezeptor des Zytokins auch der β -Rezeptor gp130 für die Signaltransduktion wichtig. Dieser wird ubiquitär exprimiert. Die Signaltransduktion erfolgt über Phosphorylierung von Tyrosinresten in der intrazellulären Domäne von gp130. Gp130 besteht extrazellulär aus sechs Domänen mit einer Ig-ähnlichen- und fünf Fibronectin-Typ III-Domänen. Domäne 2 und 3 bilden das CBM. Der intrazelluläre Teil enthält sechs Tyrosinreste (HEINRICH et al., 2003, siehe Abbildung 1.5A). Zur Rekrutierung von gp130 ist zunächst die Bindung des Zytokins an dessen α -Rezeptor nötig. Über die Art der Rekrutierung von Zytokin und α -Rezeptor gibt es zwei wesentliche Hypothesen: Entweder bilden zwei Zytokin/Zytokinrezeptorkomplexe zusammen mit zwei Molekülen gp130 eine Hexamerstruktur, oder nur ein Zytokin/Zytokinrezeptorkomplex rekrutiert zwei gp130-Moleküle zur Signaltransduktion (als Tetramer, GRÖTZINGER et al., 1999). Dies gilt gleichermaßen für den IL-6- wie für den IL-11-Signalweg. Hier soll der besseren Übersichtlichkeit geschuldet das Modell des Tetramers vorgestellt werden.

Im Anschluss startet die intrazelluläre Signalkaskade des JAK/STAT-, MAPK- und PI3K-Signalwegs (siehe Abschnitt 1.5).

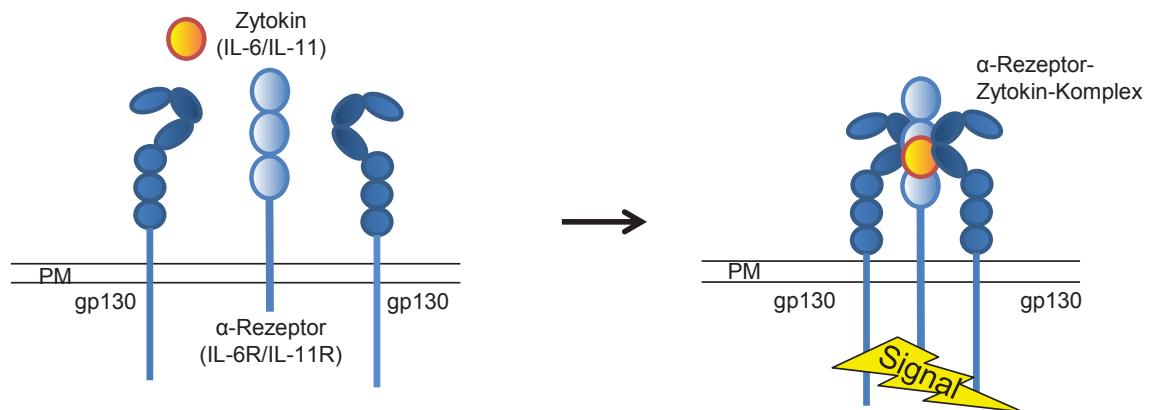
Diese Bindung des Zytokins an den membranständigen Zytokinrezeptor wird als **Klas-**

sischer Signalweg bezeichnet. Das Ansprechen der Körperzellen auf das Zytokin wird durch das Vorhandensein des α -Rezeptors determiniert, da gp130 von allen Zellen exprimiert wird (GARBERS et al., 2012).

Neben dem Klassischen Signalweg ist für IL-6 auch ein **Trans-Signalweg** bekannt. Hier entsteht ein löslicher IL-6R ohne Transmembran- und intrazelluläre Region entweder durch alternatives Splicing der mRNA oder durch limitierte Proteolyse (CHALARIS et al., 2011). Für die proteolytische Prozessierung des IL-6R sind bisher ADAM10 und ADAM17 identifiziert worden. Sie schneiden den Rezeptor von der Zelloberfläche ab und dieser kann dann nach Zytokinbindung auch Zellen erregen, die keinen membranständigen IL-6R besitzen (ROSE-JOHN und HEINRICH, 1994). Für ADAM17 ist die genaue Schnittstelle für den IL-6R bekannt: er wird zwischen den Aminosäuren Gln357 und Asp358 prozessiert (MÜLLBERG et al., 1993b siehe auch Abbildung 1.2). Bei ADAM10 ist die genaue Schnittstelle bisher nicht bekannt.

Der Trans-Signalweg eröffnet die Möglichkeit alle Zellen des Körpers zu erreichen, unabhängig davon, ob sie den α -Rezeptor exprimieren oder nicht. Trans-Signaling findet vor allem bei Entzündung statt, während regenerative Effekte und Akute-Phase-Protein-Bildung über den Klassischen Signalweg des IL-6 vermittelt werden (GARBERS et al., 2012). Bedeutung und Funktion des Trans-Signalwegs gewinnen an Zuwachs, wenn man die Entwicklung eines Fc-Fusionsproteins von löslichem gp130 betrachtet, um diesen zu unterbinden. Therapeutisch ist dies bei chronischen Entzündungen wie Morbus Crohn bedeutsam, wenn dabei nur der Trans-Signalweg unterbunden wird, nicht aber der Klassische Signalweg von IL-6 (ROSE-JOHN et al., 2007; WAETZIG und ROSE-JOHN, 2012). Für IL-11 ist bisher kein Trans-Signalweg beschrieben worden. Dies ist vor allem dadurch erstaunlich, da IL-6R und IL-11R sich strukturell sehr ähnlich sind und vermutet wird, dass z.B. für die Protease ADAM17 eher eine strukturelle Gesamtarchitektur für die Bindung wichtig ist, als eine bestimmte Aminosäuresequenz der Schnittstelle (GARBERS et al., 2011b).

Klassischer Signalweg



Trans-Signalweg

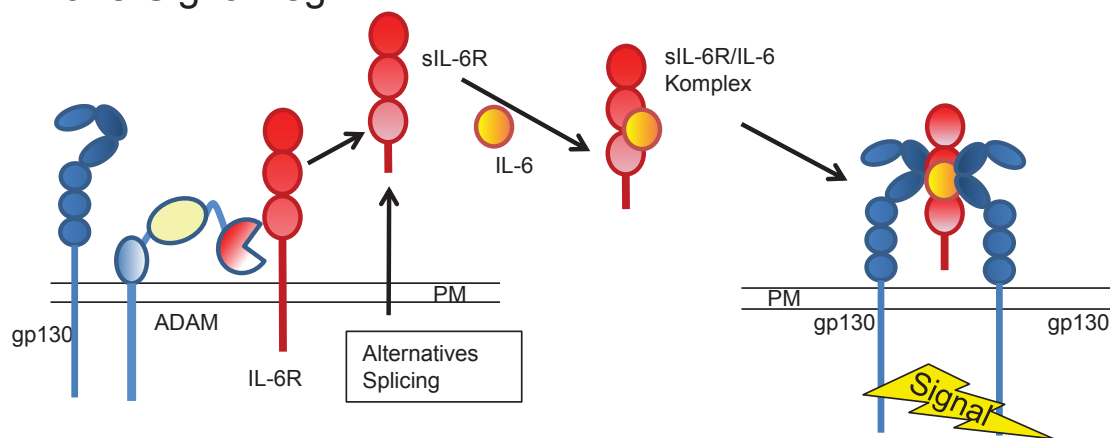


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des klassischen und des Trans-Signalwegs. Der klassische Signalweg findet für den IL-6- und den IL-11-Signalweg statt. Der Trans-Signalweg ist bisher nur für IL-6 beschrieben.

1.5 Intrazelluläre Signaltransduktion

IL-6 und IL-11 führen intrazellulär zu vielfältigen Signalkaskaden. Hier sollen die drei wichtigsten kurz erläutert werden.

Den wichtigsten Signalweg stellt der JAK/STAT-Signalweg dar. Die Janus-Kinase (JAK) bindet am N-terminalen Tyrosinrest (Y683) von gp130. Die *signal transducer and activator of transcription* (STAT) werden an den vier C-terminalen Tyrosinresten phosphoryliert: An allen phosphoryliert die Kinase JAK STAT3, nur an Y905 und Y915 wird auch STAT1 phosphoryliert (EULENFELD et al., 2012, siehe auch Abbildung 1.5A). Zwei phosphorylierte STAT-Moleküle bilden ein Homodimer, wandern in den Zellkern und aktivieren Transkriptionsfaktoren für Proliferation und anti-Apoptose (FUKADA et al., 1998). Für gastrointestinale Tumoren konnte eine erhöhte STAT3-Aktivität vor allem durch IL-11

nachgewiesen werden (PUTOCZKI et al., 2013).

An Tyrosin759 binden zusätzlich *suppressor of cytokine signalling 3* (SOCS3) und SHP2. SOCS3 wirkt durch Inhibition regulierend auf den STAT3-Signalweg, während SHP2 als Adapterprotein für die Aktivierung weiterer Signalkaskaden wie MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Kaskade und PI3K(*phosphatidyl-inositol-3-kinase*)-Kaskade fungiert. Dies geschieht über Rekrutierung des *growth factor receptor bound protein (Grb)2* und Gab1 (EULENFELD et al., 2012). Der MAPK-Signalweg fungiert als Mitose-Signal, PI3K-Signalweg führt zuletzt zu Zellwachstum und Zellüberleben (HEINRICH et al., 2003).

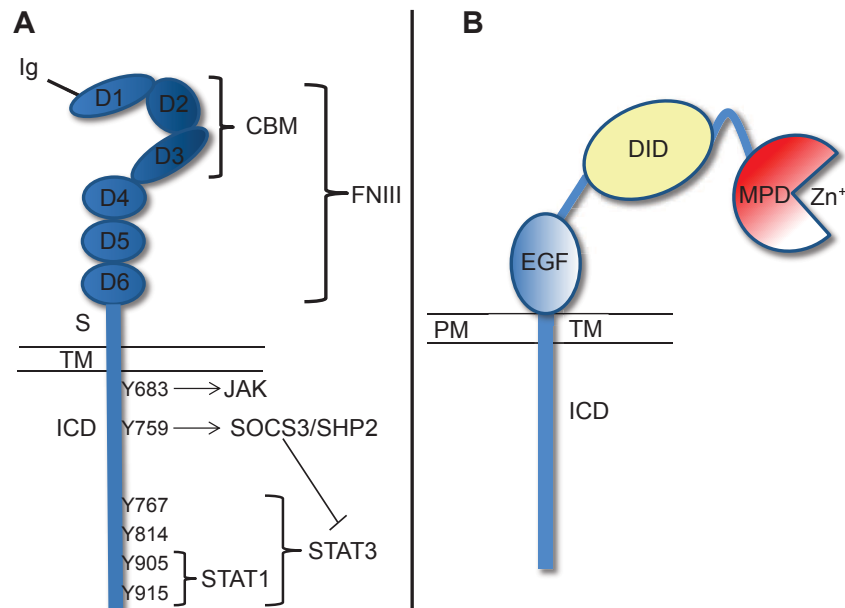


Abbildung 1.5: A: Schematische Darstellung von gp130 und die Phosphorylierungsstellen intrazellulärer Signalmoleküle. Ig: Ig-ähnliche Domäne, FNIII: Fibronectin Typ III-Domänen, CBM: Cytokin-bindendes Modul, TM: Transmembran-Region, ICD: Intrazelluläre Domäne.

B: Aufbau der ADAM-Proteasen. MPD: Metalloprotease-Domäne mit Zink im katalytischen Zentrum, DID: Disintegrin-Domäne, EGF: EGF-ähnliche Domäne, TM: Transmembran-Domäne, ICD: Intrazelluläre Domäne, PM: Plasmamembran.

1.6 Limitierte Proteolyse und die Proteasen ADAM10 und ADAM17

Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben, wird der IL-6R proteolytisch gespalten. Diese Spaltung durch Proteasen wird als *Shedding* bezeichnet und resultiert in löslichen Rezeptorformen.

Es wird vermutet, dass 10% aller Oberflächenproteine von somatischen Zellen proteolytisch prozessiert werden (SCHELLER et al., 2011a). Shedding stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus dar, der Proteine an der Zelloberfläche herunterreguliert, oder freie Zytokine in der Zellumgebung abfängt, indem lösliche Rezeptoren sie binden. In diesem Fall wirkt der lösliche Rezeptor als Antagonist, wie z.B. bei TNF- α . Ein Sonderfall ist hier der lösliche IL-6R, der als Agonist wirkt und im Komplex mit IL-6 andere Zellen erregen kann (SCHELLER et al., 2011a).

Die wichtigsten bisher erforschten Proteasen für das IL-6R-Shedding im Menschen sind ADAM10 und ADAM17. Deren Bedeutung macht sich besonders bei Fehlen der Proteasen bemerkbar, denn sie sind zum Beispiel beteiligt bei der Entwicklung des Nervensystems, der Fertilisation und inflammatorischen Prozessen (SEALS und COURTNEIDGE, 2003). ADAM17-*Knock Out*-Mäuse sind zudem nicht überlebensfähig (PESCHON et al., 1998).

ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) sind glykosylierte Typ I-Transmembranproteine mit einer durchschnittlichen Größe von 750 Aminosäuren, die zur Klasse der Zink-Proteasen-Superfamilie zählen (SEALS und COURTNEIDGE, 2003). Sie zeigen folgenden typischen Aufbau (Abbildung 1.5B):

Als erstes die N-terminale Signalsequenz zur Bestimmung des sekretorischen Weges, gefolgt von einer Prodomäne, die die korrekte Faltung der Protease vermittelt (ROGHANI et al., 1999), aber auch inhibitorisch auf sie einwirken kann (MOSS et al., 2007). Die Prodomäne wird meist schon intrazellulär durch Pro-Protein-Konvertasen im Golgi-Apparat entfernt (LUM et al., 1998). C-terminal der Prodomäne befindet sich die Metalloproteinase-Domäne, die für das Ectodomänen-Shedding verantwortlich ist (SEALS und COURTNEIDGE, 2003), gefolgt von der Disintegrin-Domäne. Die Disintegrin-Domäne interagiert mit Integrinen und beeinflusst so Zelladhäsion und Zell-Zell-Kontakte (EDWARDS et al., 2008). Proximal zur Zellmembran befindet sich eine EGF-ähnliche (cystein-reiche) Domäne. Diese übt eine regulierende Wirkung auf die Funktionen der anderen Domänen aus und ist vermutlich bei der Substraterkennung von Bedeutung (CAESCU et al., 2009). Es folgt die Transmembrandomäne und die intrazelluläre Domäne. Diese ist zwischen den verschiedenen ADAMs sehr variabel in Länge und Sequenz und zuständig für intrazelluläre Signalprozesse (z.B. *inside-out*- und *outside-in*-Signalwege, EDWARDS et al., 2008).

ADAM10 und ADAM17 werden in allen somatischen Zellen des Körpers exprimiert und stellen die wichtigsten 'Sheddases' im Menschen dar (EDWARDS et al., 2008). Da sie auch beide den humanen IL-6R prozessieren (GARBERS et al., 2011b), wurden sie in dieser Arbeit verwendet, um das Shedding von IL-6R und IL-11R zu untersuchen.

Tabelle 1.1 zeigt die bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit identifizierten Substrate von ADAM10 und ADAM17. Es fällt auf, dass sie zwar einige Substrate gemeinsam prozessieren, jedoch auch spezifisch Substrate schneiden. ADAM10 wird induziert durch Calcium-Einstrom (z.B. durch Ionomycin als Calcium-Ionophor (HUNDHAUSEN et al., 2007), oder über den P2X7-Rezeptor nach BzATP-Stimulation (GARBERS et al., 2011b)), ADAM17 durch den

Phorbol-Esther PMA (*phorbol-12-myristate-13-acetate*, WALEV et al., 1996), Apoptose (CHALARIS et al., 2007) und Cholesterol-Depletion (MATTHEWS et al., 2003). Für diese Arbeit wurde für ADAM10 zur Stimulation Ionomycin eingesetzt, für ADAM17 PMA. Für beide Proteasen existieren zudem spezifische Inhibitoren. ADAM17-Inhibitoren sollen teilweise zur Therapie von rheumatoider Arthritis eingesetzt werden und befinden sich in klinischen Studien (BMS-561392, TMI-005, GI5402, R618, MOSS et al., 2008). In LUDWIG et al., 2005 ist der Inhibitor GW280264X beschrieben, der ADAM10 und ADAM17 gleichermaßen hemmt. Ebenfalls entwickelte diese Arbeitsgruppe den ADAM10-spezifischen Inhibitor GI254023X, der ADAM10 100 x potenter hemmt als ADAM17. GI254023X wird in dieser Arbeit eingesetzt, um spezifische ADAM10-vermittelte Reaktionen nachzuweisen.

Nach Fertigstellung dieser Arbeit wurden weitere Inhibitoren von ADAM10 und ADAM17 identifiziert: Der murine Antikörper 8C7 (ATAPATTU et al., 2012) blockiert die Substrat-Bindestelle der ADAM10-C-Domäne (Cystein-reiche Domäne, in dieser Arbeit als Teil der EGF-Domäne bezeichnet) und unterbindet somit die Eph/ephrin Signalbildung. Humaner D1(A12) Antikörper (TAPE et al., 2011) wurde als spezifischer Inhibitor von ADAM17 neu entdeckt und bindet als *cross-domain*-Ak die gesamte Ektodomäne.

Beide Antikörper binden im Gegensatz zu den bisherigen nicht oder nicht nur die katalytische Domäne, können aber trotzdem das Shedding inhibieren. Ob sich diese Ak im Vergleich zu den oben beschriebenen Ak als Inhibitoren der ADAM-Proteasen besser eignen konnte in dieser Arbeit nicht mehr überprüft werden.

Tabelle 1.1: Übersicht über wichtige Substrate von ADAM10 und ADAM17

Protease	Substrate	Referenzen
ADAM10	ACE2	JIA et al., 2009
	Amyloid precursor protein (APP)	SLACK et al., 2001; ALLINSON et al., 2003
	Annexin A1	BLUME et al., 2012
	Axl	BUDAGIAN et al., 2005
	Betacellulin	SAHIN et al., 2004
	Bri2/Itm2b	MARTIN et al., 2008
	CADM1	NAGARA et al., 2012
	CD23	MOSS und RASMUSSEN, 2007; LEMIEUX et al., 2007
	CD30	EICHENAUER et al., 2007
	CD44	NAGANO et al., 2004
	CD91/LRP1/APOER	LIU et al., 2009
	Cellular prion protein PrP ^c	CISSÉ et al., 2005
	c-Met	KOPITZ et al., 2007; SCHELTER et al., 2010
	Collagen IV	MILLICHIP et al., 1998
	Collagen XVII	FRANZKE et al., 2004
	CXCL1/Fractalkine	SCHULTE et al., 2007; HUNDHAUSEN et al., 2007
	CXCL16	SCHULTE et al., 2007
	Delta-like ligand-1 (Dll-1)	SIX et al., 2003
	Desmoglein-2	BECH-SERRA et al., 2006
	E-Cadherin	MARETZKY et al., 2005a
	EGF	SAHIN et al., 2004
	Ephrin A2	HATTORI et al., 2000
	Ephrin A5	JANES et al., 2005
	F11R, JAM-A	KOENEN et al., 2009
	Fas-ligand	KIRKIN et al., 2007
	FcalphaR, CD89	PENG et al., 2010
	GNPMB/Osteoactivin	ROSE et al., 2010
	GPVI	BENDER et al., 2010
	Her2/neu (ERBB2)	Li et al., 2007
	IL-6R α	MATTHEWS et al., 2003
	Klotho	CHEN et al., 2007
	L1-CAM	MECHTERSHEIMER et al., 2001
	LAG-3	Li et al., 2007
	LOX-1	MITSUOKA et al., 2009
	LYPD3, C4.4A	ESSELENS et al., 2008
	MICA	WALDHAUER et al., 2008
	N-Cadherin	REISS et al., 2005
	Nectin-1	KIM et al., 2010
	Notch	PAN und RUBIN, 1997
	NRP-1	SWENDEMAN et al., 2008
	PDGRF β	MENDELSON et al., 2010
	Pmel17	KUMMER et al., 2009
	Pro-betacellulin	SAHIN et al., 2004
	Pro-EGF	SAHIN et al., 2004
	Proto-cadherin- γ C3 und B4	REISS et al., 2006
	Protocadherin-12	BOUILLOT et al., 2011
RAGE	ZHANG et al., 2008	
Robo	COLEMAN et al., 2010	
Thyrotropin Receptor (TSHR)	KACZUR et al., 2007	
TNF	HIKITA et al., 2009	
TRANCE/RANKL	HIKITA et al., 2006	
VE-Cadherin	SCHULZ et al., 2008	

	VEGFR2	DONNERS et al., 2010
ADAM17	ACE2/ SARS-CoV Rezeptor	HAGA et al., 2008; LAMBERT et al., 2008
	ALCAM	BECH-SERRA et al., 2006
	Amyloid precursor protein (APP)	BUXBAUM et al., 1998; SLACK et al., 2001
	APLP2	JACOBSEN et al., 2010
	AREG	SUNNARBORG et al., 2002
	CA9	ZATOVICOVA et al., 2005
	CD163	ETZERODT et al., 2010
	CD30	HANSEN et al., 2004
	CD40	CONTIN et al., 2003
	CD44	NAGANO et al., 2004
	CD62L	PESCHON et al., 1998
	CD91/LRP1/APOER	LIU et al., 2009
	Cellular prion protein PrP ^c	ALFA CISSÉ et al., 2007
	Collagen XVII	FRANZKE et al., 2004
	Colony stimulating factor-1 CSF-1	HORIUCHI et al., 2007
	CSF1R, M-CSFR	ROVIDA et al., 2001
	CX3CL1/Fractalkine	SCHULTE et al., 2007
	Delta-like ligand-1 (Dll1)	DYCYNSKA et al., 2007
	Desmoglein-2	BECH-SERRA et al., 2006
	EpCAM	MAETZEL et al., 2009
	EPCR	QU et al., 2007
	Epigen	SAHIN und BLOBEL, 2007
	ErbB4/HER4	MÄÄTTÄ et al., 2006
	EREG	SAHIN et al., 2004
	F11R, JAM-A	KOENEN et al., 2009
	FcalphaR, CD89	PENG et al., 2010
	FLT3L	HORIUCHI et al., 2009
	GP	DOLNIK et al., 2004
	GPIba	BERGMEIER et al., 2004
	GPV	RABIE et al., 2005
	GPVI	BENDER et al., 2010
	HB-EGF	MERLOS-SUÁREZ et al., 2001
	ICAM-1	TSAKADZE et al., 2006
	IL-1 Rezeptor-II	REDDY et al., 2000
	IL-6R α	ALTHOFF et al., 2000
	Jagged	PARR-STURGESS et al., 2010
	KDR, VEGFR2	SWENDEMAN et al., 2008
	Kit ligand-1 und -2	KAWAGUCHI et al., 2007
	Klotho	CHEN et al., 2007
	L1-CAM	MARETZKY et al., 2005b
	LAG-3	LI et al., 2007
	L-selectin	PESCHON et al., 1998
	LTA	YOUNG et al., 2010
	LYPD3, C4.4A	ESSELENS et al., 2008
	M6P/ IGF2R	LEKSA et al., 2011
	MICA	WALDHAUER et al., 2008
	MICB	BOUTET et al., 2009
	MUC-1	THATHIAH et al., 2003
	N-CAM	KALUS et al., 2006
	Nectin-4, PVRL4	FABRE-LAFAY et al., 2005
	Neuroregulin	YOKOZEKI et al., 2007
	Neurotrophin Rezeptor p75NTR	WESKAMP et al., 2004
	Notch1	BROU et al., 2000

NPR (neuronal pentraxin receptor)	CHO et al., 2008
NRG1, Heregulin	MONTERO et al., 2000
P55 TNF Rezeptor	REDDY et al., 2000
P75 TNF Rezeptor	PESCHON et al., 1998; REDDY et al., 2000
Pmel17	KUMMER et al., 2009
Pre-adipocyte factor-1 (Pref-1)	WANG und SUL, 2006
Pro-Amphiregulin	SAHIN et al., 2004; GSCHWIND et al., 2003
Pro-epiregulin	SAHIN et al., 2004
Pro-HB-EGF	SAHIN et al., 2004; SCHÄFER et al., 2004
Pro-TGF- α	KENNY und BISSELL, 2007; PESCHON et al., 1998; SAHIN et al., 2004
Pro-TNF- α	BLACK et al., 1997; MOSS et al., 1997
PTP-LAR	RUHE et al., 2006
Ptpz	CHOW et al., 2008
SDC1, SDC4	PRUESSMEYER et al., 2010
Semaphorin 4D	ZHU et al., 2007
SORCS-1,-3	HERMEY et al., 2006
SORL1, SORLA	HERMEY et al., 2006
SORT1	HERMEY et al., 2006
TGF α	PESCHON et al., 1998
TMEFF2	ALI und KNAÜPER, 2007
TRANCE/RANKL	LUM et al., 1999
TrkA Neurotrophin Rezeptor	DÍAZ-RODRÍGUEZ et al., 2002
Vacuolar protein sorting Vps10-p	HERMEY et al., 2006
VASN	MALAPEIRA et al., 2011
VCAM-1	GARTON et al., 2003; SINGH et al., 2005
Wachstumshormonrezeptor	SCHANTL et al., 2004

2 Ziel dieser Arbeit

Diese Arbeit befasst sich mit der proteolytischen Prozessierung von IL-6R und IL-11R. Dabei sollen die für den Menschen wichtigen Proteasen ADAM10 und ADAM17 als Sheddasen dieser beiden Rezeptoren betrachtet werden.

Für den IL-6R ist bekannt, dass er von ADAM17 (MÜLLBERG et al., 1994) und ADAM10 (GARBERS et al., 2011b) prozessiert wird. Allerdings ist nach wie vor unklar, wodurch ADAM17 zwischen Substrat und Nicht-Substrat unterscheiden kann.

Für den IL-11R wurde bisher kein Shedding durch ADAM17 nachgewiesen (TACKEN, 2002). Diese Arbeit soll sich diesem Umstand näher widmen, da IL-6R und IL-11R sich strukturell sehr ähnlich sind. Weiter werden andere Proteasen gesucht, die den IL-11R prozessieren.

Drittens soll ein IL-6R entstehen, der nicht mehr durch ADAM17 prozessiert wird. Bisherige Versuche, den IL-6R Trans-Signalweg durch Veränderungen an der ADAM17-Protease zu unterbinden, waren nicht erfolgreich. Die embryonale Lethalität von ADAM17^{-/-}-Mäusen unterstreicht die große Bedeutung dieser Protease. Ein IL-6R, der den klassischen Signalweg noch vermitteln kann, nicht aber den Trans-Signalweg, stellt ein gutes *in vivo*-Modell dar, um in Mausmodellen die Bedeutung des IL-6 Trans-Signaling zu untersuchen. Effekte eines fehlenden Trans-Signalwegs auf Immunsystem und Entzündungsreaktionen könnten so in Zukunft betrachtet werden, ohne dass wichtige Funktionen von ADAM17 ausgeschaltet werden.

Viertens soll umgekehrt ein IL-11R entstehen, der durch ADAM17 geshedded werden kann. Ein Trans-Signalweg des IL-11R ist bisher nicht beschrieben und dessen Auswirkungen auf den Organismus deshalb bisher auch nicht untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antibiotika

Ampicillin Carl Roth GmbH, Karlsruhe f.c. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Puromycin PAA Laboratories GmbH, Cölbe f.c. 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

3.1.2 Antikörper

Primäre Antikörper

- α -humaner IL-6-Rezeptor** Monoklonaler Antikörper aus der Maus (Klon 4-11). Bindet ein Epitop an Domäne 1 des extrazellulären Teils des IL-6-Rezeptors. Herstellung beschrieben in CHALARIS et al., 2007. Konzentration 1 mg/ml, verwendete Verdünnungen: Western Blot 1:1000, ELISA 1:1000.
- α -humaner IL-11-Rezeptor** Monoklonale Antikörper gegen extrazelluläre Epitope des IL-11-Rezeptors (C4.2 und E24.2 Stalk-Region, E27 Domäne 1). Zur Verfügung gestellt von Gerhard Müller-Newen (RWTH Aachen, TACKEN, 2002; BLANC et al., 2000). Zur Verdeutlichung der Bindeeigenschaften dieser Antikörper befindet sich ein Cartoon im Anhang (Abbildung 6.3). Konzentrationen der Stocklösungen: C4.2 2,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS, E24.2 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, bei E27 war die Konzentration der Stocklösung unbekannt.

α-humaner IL-11-Rezeptor E24.2 biot.	Biotinylierter, monoklonaler Antikörper, bindet in der Stalk-Region des extrazellulären Teils des IL-11-Rezeptors. Zur Verfügung gestellt von Gerhard Müller-Newen (RWTH Aachen, BLANC et al., 2000). Konzentration der Stocklösung 925 $\mu\text{g/ml}$.
α-β-actin	Monoklonaler Antikörper aus der Maus (C4, sc-4778, Santa Cruz Biotechnology) zur Ladekontrolle, Konzentration 200 $\mu\text{g/ml}$ PBS, Verdünnung für Western Blot: 1:1000.
α-Phospho-Stat3	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, gelöst in 5% BSA/TBS-T, Konzentration 150 $\mu\text{g/ml}$, Verdünnung für Western Blot: 1:1000, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA).
α-Stat3	Monoklonaler Antikörper aus der Maus, gelöst in 5% BSA/TBS-T, Konzentration 79 $\mu\text{g/ml}$, Verdünnung für Western Blot: 1:1000, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA).
α-Myc-Tag 71D10	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, Konzentration 125 $\mu\text{g/ml}$, Verdünnung für Western Blot: 1:1000, Immunopräzipitation: 1:200, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA).
 Sekundäre Antikörper	
α-mouse-POD	ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat Anti-mouse IgG (H+L), Konzentration 0,8 mg/ml, Verdünnung 1:5000 (Western Blot), Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland, Bonn.
α-rabbit-POD	ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat Anti-rabbit IgG (H+L), Konzentration 0,8 mg/ml, Verdünnung 1:5000 (Western Blot), Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland, Bonn.
FACS-α-mouse IgG (H+L)	Fluorescein (FITC)-conjugated Affini Pure F(ab') ₂ Fragment aus der Ziege, Konzentration 1,5 mg/ml, Verdünnung 1:100, Jackson Immuno Research, West Grove, PA (USA).

**Baf227/ α -humaner
IL-6-Rezeptor-Alpha**

Biotinylierter IgG Antikörper aus der Ziege,
Konzentration 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Verdünnung für ELISA:
1:1000, R&D Systems, Minneapolis (USA).

3.1.3 Chemikalien

Tabelle 3.3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acrylamid-Mix	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
BSA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ficoll-Paque	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycine	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt

Potassium acetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Schwefelsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sucrose	Merck KGaA, Darmstadt
TEMEM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Trypan Blue	Biochrom AG, Berlin
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.1.4 Enzyme

Alle Enzyme (Restriktionsenzyme, Polymerasen etc.) wurden von Fermentas GmbH (St. Leon-Roth) oder Thermo Fisher Scientific (Perbio Science Deutschland, Bonn) bezogen.

3.1.5 Größenmarker

Die für diese Arbeit verwendeten Größenmarker stammen alle von der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Roth). Für die Größenbestimmung von DNA wurden der *GeneRuler 1 kb DNA-Ladder* (250-10.000 bp) oder der *GeneRuler Express DNA ladder* (100-5000 bp) verwendet; für Proteine der *PageRuler prestained protein ladder* (10-170 kDa).

3.1.6 Kits

Folgende Kits wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 3.4: Übersicht der verwendeten Kits

Methoden	Verwendetes Kit
Bestimmung von Proteinkonzentrationen	BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Perbio Science Deutschland, Bonn)
DNA-Extraktion aus Agarosegelen, Reinigung von PCR-Produkten, Entfernung von Enzymen aus einem Reaktionsansatz	NucleoSpin Extract II (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)

Proliferationsassay	CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega GmbH, Mannheim)
Midi-Präparation von Plasmid DNA	NucleoBond Xtra Midi (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
Deglykosylierung von Proteinen	PNGaseF-Kit, New England Biolabs Inc., Ipswich, Großbritannien
Isolierung von Monozyten	Monocyte Isolation Kit II und CD14 MicroBeads human, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

3.1.7 Kulturmedien

Bakterien

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

Die Zusammensetzung der Medien wurde BERTANI, 1951 entnommen.

Zellkultur

DMEM (-/-)	Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine
DMEM (+/+)	Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine, zusätzlich mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin
Williams E Medium für Rattenhepatozyten	2 mmol/L Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 0,1 μ mol/l Dexamethason, 0,1 μ mol/l Insulin, 5% FCS
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, L-Glutamin, ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin

Alle benutzten Medien sowie Trypsin/EDTA und Penicillin/Streptomycin stammen von Life Technologies GmbH, Darmstadt.

3.1.8 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Tabelle 3.5: Verwendete Oligonukleotide

Name des Primers	Nukleotidsequenz
I-1	5'-GTACCAGGTTACCCCCGACGCCTGCGAGCC-3'
I-2	5'-AGAAAGGATTCCCAAAGAGGGCAGTGGTACTGAAGA-3'
I-3	5'-TCTTCAGTACCACTGCCCTCTTTGGGAATCCTTTCT-3'
I-4	5'-CTCGAGCGGCCGCCTACAGGTTTGGAGCTCCTGG-3'
IV-1	5'-GTACCAGGTTACCCCCGACGCCTGCGAGCC-3'
IV-2	5'-TGGAGGACTCCTGGATTCTGTGCTCGGAGTTCCCCAGGC-3'
IV-3	5'-GCCTGGGGAACCTCCGAGCACAGAATCCAGGAGTCCTCCA-3'
IV-4	5'-CGAGCGGCCGCTTATCTGGGGAAGAAGTAGTC-3'

VII-2	5'-AGCAACCAGGAATGTCGCCAGCACAGCTAC-3'
VII-3	5'-GTAGCTGTGCTGGCGACATTCCTGGTTGCT-3'
6TM-1	5'-TCAGTACCACTGCCCTCTTTGGGAATCCTT-3'
6TM-2	5'-CGTCTTCTTGAACCTCAGCCAGAGCCCCAG-3'
6TM-3	5'-CTGGGGCTCTGGCTGAGGTTCAAGAAGACG-3'
6TM-6	5'-AAGGATTCCCAAAGAGGGCAGTGGTACTGA-3'
V-1	5'-TGGAGCGGCCTGAGGCACGTGGTG-3'
V-2	5'-ACCCCGTCTCAGCCTCAGAACAATGGCAAT-3'
V-3	5'-ATTGCCATTGTTCTGAGGCTGAGACGGGGT-3'
VIII-2	5'-TGGTATGGTCCCAGTCCAAGGCGTGCCCAT-3'
VIII-3	5'-ATGGGCACGCCTTGGACTGGGACCATACCA-3'
IX-2	5'-AGAAGAATCTTGCACCCTGTGATCAAGTAG-3'
IX-3	5'-CTACTTGATCACAGGGTGCAAGATTCTTCT-3'
X-2	5'-CTGCTCCACAGAGTCTGGGAGGCTTGTCGC-3'
X-3	5'-GCGACAAGCCTCCCAGACTCTGTGGAGCAG-3'

3.1.9 Plasmide

pcDNA3.1 Vektor für transiente und stabile Proteinexpression in Säugetierzellen von Invitrogen (Carlsbad, California (USA))

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

3.1.10 Puffer und Lösungen

Tabelle 3.6: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Bestandteile/Zusammensetzung
Blocking Puffer (Western Blot)	5% Milchpulver in TBS-T

DNA-Probenpuffer (6-fach) für Agarosegele	20% (m/V) Glycerol in TBE-Puffer 0,1% (m/V) Bromphenolblau 0,1% Xylencyanol
FACS-Puffer	0,5% BSA in PBS
Laemmli-Puffer (5-fach) (SDS-PAGE)	10% (m/V) SDS 5% (m/V) β -Mercaptoethanol 50% (m/V) Glycerol 0,13% (m/V) Bromphenolblau 312 mM Tris-HCl (pH 6,8)
Lysis Puffer (Zellyse)	150 mM NaCl 2 mM EDTA 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1% (m/V) Triton X-100 1% (m/V) NP-40 1 mM Na_3VO_4 1 mM NaF Proteaseinhibitoren
Phosphate Buffered Saline (PBS)	150 mM NaCl 8 mM Na_2HPO_4 (pH 7,4) 1,7 mM NaH_2PO_4 (pH 7,4)
PBS-T	0,05% (V/V) Tween-20 in PBS
Proteaseinhibitoren	COMPLETE Tabletten, Roche (Mannheim) eine Tablette gelöst in 2 ml PBS ergibt eine 25-fache Stocklösung
Sammelgelpuffer (5%) (SDS-PAGE)	1,72 ml H_2O 0,5 ml 30% Acrylamid-Mix 380 μl 1 M Tris (pH 6,8) 50 μl 10% SDS 30 μl 10% APS 3 μl TEMED
SDS Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris-HCl (pH 8,3) 192 mM Glycin 0,1% (m/V) SDS

Solution 1 (S1) (DNA Mini-Präparation)	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM EDTA (pH 8.0) 100 nM RNase Gelagert bei 4°C
Solution 2 (S2) (DNA Mini-Präparation)	0,2 M NaOH 1% SDS Gelagert bei Raumtemperatur
Solution 3 (S3) (DNA Mini-Präparation)	60 ml 5 M Kaliumacetat (CH ₃ CO ₂ K) 11,5 ml Essigsäure (CH ₃ COOH) 28,5 ml H ₂ O Gelagert bei 4°C
Stripping Puffer (Western Blot)	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2% (m/V) SDS 0,1% β-Mercaptoethanol
TAE-Puffer (50-fach) (Agarosegele)	2 M Tris 100 mM EDTA 1 M Essigsäure ad 1000 ml H ₂ O _{dd} (pH 8,0)
TBE-Puffer	88 mM Tris 88 mM Borsäure 2,5 mM EDTA pH 8,0
Transferpuffer (1l) (Western Blot)	25 mM Tris 0,1% SDS 20% Methanol 192 mM Glycin ad 1l H ₂ O
Trenngelpuffer (10%) (SDS-PAGE)	4 ml H ₂ O 3,3 ml Acrylamid-Mix 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 100 μl 10% SDS 100 μl APS 4 μl TEMED

Tris Buffered Saline (TBS)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl
TBS-T	1% (V/V) Tween-20 in TBS

3.1.11 Rekombinante Proteine

hIL-6 Produziert wie in DAM et al., 1993 beschrieben.

Hyper IL-6 Fusionsprotein aus humanem IL-6 und humanem löslichen IL-6-Rezeptor. Hergestellt wie von SCHROERS et al., 2005 beschrieben (vergleiche auch FISCHER et al., 1997).

hIL-11 Bezogen von Immuno Tools GmbH, Friesoythe (Deutschland).

löslicher hIL-11R *Recombinant Human IL-11 R α Fc Chimera*, bestellt von R&D Systems Inc., Minneapolis (Minnesota, USA), Katalognummer: 1977-MR.

3.1.12 Zelllinien

COS7 Immortalisierte Nierenfibroblastenzellen aus dem Affen (*Cercopithecus aethiops*, Grüne Meerkatze).

HEK293 Immortalisierte humane embryonale Nierenzellen; etablierte Zelllinie für transiente Transfektionen (ATCC-Nummer: CRL-1573).

Phoenix-Eco Verpackungszelllinie (HEK293T) zur retroviralen Transduktion von Ba/F3-Zellen, stabil mit cDNA transfiziert (KETTELER et al., 2002); zur Verfügung gestellt von Garry P. Nolan, Stanford University, Palo Alto (CA, USA).

Ba/F3-gp130 Murine prä-B-Zelllinie, stabil mit cDNA für humanes gp130 transduziert; kann somit in Abhängigkeit von humanem IL-6 und löslichem IL-6R bzw. Hyper IL-6 wachsen. War zum Zeitpunkt der Arbeit schon fertiggestellt.

Ba/F3-gp130-hIL-6R Ba/F3-gp130-Zellen, stabil mit cDNA für humanen IL-6R transduziert; können somit in Abhängigkeit von humanem IL-6 wachsen; beschrieben in FISCHER et al., 1997 und VOLLMER et al., 1999.

Folgende Ba/F3-gp130-Zelllinien wurden selbst hergestellt:

Ba/F3-gp130-hIL-11R Ba/F3-gp130-Zellen, stabil mit cDNA für humanen IL-11R transduziert; können somit in Abhängigkeit von humanem IL-11 wachsen.

- Ba/F3-gp130-hIL-11R-S (Chimäre I)** Ba/F3-gp130-Zellen, stabil mit cDNA für humanen IL-11R mit Stalk-Region des IL-6-Rezeptors transduziert; können somit in Abhängigkeit von humanem IL-11 wachsen.
- Ba/F3-gp130-hIL-11R-TM (Chimäre II)** Ba/F3-gp130-Zellen, stabil mit cDNA für humanen IL-11R mit Transmembran-Region des IL-6-Rezeptors transduziert; können somit in Abhängigkeit von humanem IL-11 wachsen.
- Ba/F3-gp130-hIL-11R-ICD (Chimäre III)** Ba/F3-gp130-Zellen, stabil mit cDNA für humanen IL-11R mit intrazellulärer Region des IL-6-Rezeptors transduziert; können somit in Abhängigkeit von humanem IL-11 wachsen.
- Ba/F3-gp130-hIL-11R-S-TM-ICD (Chimäre IV)** Ba/F3-gp130-Zellen, stabil mit cDNA für humanen IL-11R mit Stalk-, Transmembran- und Intrazellular-Region des IL-6-Rezeptors transduziert; können somit in Abhängigkeit von humanem IL-11 wachsen.
- Ba/F3-gp130-hIL-6R-S (Chimäre V)** Ba/F3-gp130-Zellen, stabil mit cDNA für humanen IL-6R mit Stalk-Region des IL-11-Rezeptors transduziert; können somit in Abhängigkeit von humanem IL-6 wachsen.
- Ba/F3-gp130-hIL-6R-TM (Chimäre VI)** Ba/F3-gp130-Zellen, stabil mit cDNA für humanen IL-6R mit Transmembran-Region des IL-11-Rezeptors transduziert; können somit in Abhängigkeit von humanem IL-6 wachsen.
- Ba/F3-gp130-hIL-6R-ICD (Chimäre VII)** Ba/F3-gp130-Zellen, stabil mit cDNA für humanen IL-6R mit intrazellulärer Region des IL-11-Rezeptors transduziert; können somit in Abhängigkeit von humanem IL-6 wachsen.
- Ba/F3-gp130-hIL-6R-S-TM-ICD (Chimäre VIII)** Ba/F3-gp130-Zellen, stabil mit cDNA für humanen IL-6R mit Stalk-, Transmembran- und Intrazellular-Region des IL-11-Rezeptors transduziert; können somit in Abhängigkeit von humanem IL-6 wachsen.
- Ba/F3-gp130-hIL-11R-S (10As) (Chimäre IX)** Ba/F3-gp130-Zellen, stabil mit cDNA für humanen IL-11R, bei dem die letzten zehn Aminosäuren der Stalk-Region vom IL-6-Rezeptor stammen, transduziert; können somit in Abhängigkeit von humanem IL-11 wachsen.
- Ba/F3-gp130-hIL-6R-S (10As) (Chimäre X)** Ba/F3-gp130-Zellen, stabil mit cDNA für humanen IL-6R, bei dem die letzten zehn Aminosäuren der Stalk-Region vom IL-11-Rezeptor stammen, transduziert; können somit in Abhängigkeit von humanem IL-6 wachsen.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Mini-Präparation von DNA

Verfahren um ligierte Plasmide in kleinen Mengen zu vermehren, um deren Richtigkeit mittels enzymatischer Spaltung zu überprüfen.

Zu Beginn wurden 2 ml Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) mit einer einzelnen Bakterienkolonie von einer LB-Platte beimpft. Üblicherweise wurden *E.coli* des Stammes *XL1 blue* verwendet. Die Bakterien wuchsen über Nacht bei 37°C bei 1400 rpm in einem Schüttler. Am nächsten Tag wurde von jeder Kultur 500 µl abpipettiert und bei 4°C für eventuelle Midi-Präparation gelagert. Danach wurden die Bakterien in einer Zentrifuge mit 13000 rpm für 15 min bei Raumtemperatur geerntet. Der Überstand wurde verworfen. Die Bakterienpellets wurden nun weiter auf Eis behandelt: Zunächst wurden die Pellets mit 100 µl S1 resuspendiert und vorgetextet, bis keine Zellklumpen mehr zu sehen waren. Anschließend wurden 200 µl S2 zugegeben und durch vier- bis sechsmaliges Wenden gut gemischt (Lyse der Bakterienzellen). Dann wurden 150 µl S3 zugegeben und durch abermaliges Wenden gemischt (Neutralisation). Die Lösungen inkubierten 10 min auf Eis um das Ausfällen von Proteinen, chromosomaler DNA, und Kalium-Acetat zu verbessern. Die Proben zentrifugierten dann bei 13000 rpm für 10-15 min bei 4°C um den Überstand von den o.g. Zellresten zu entfernen und ihn dann in neue Reaktionsgefäße zu überführen. Danach wurde 1 ml 100%iger Ethanol dazugegeben, vorgetextet und wieder 5 min auf Eis inkubiert. Um die DNA zu pelletieren wurde bei 13000 rpm 10-15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol bei 13000 rpm und 4°C fünf Minuten gewaschen. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet bei Raumtemperatur 5-10 min getrocknet. Die DNA wurde in 30 µl H₂O_{dd} gelöst.

Midi-Präparation von DNA

Um größere DNA-Mengen zu erhalten wurden 100 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit einer einzelnen Bakterienkolonie oder 100 µl Bakterien-suspension aus der Mini-Kultur (s.o.) beimpft. Die Bakterien wuchsen unter ständigem Schütteln (180 rpm) und bei 37°C ca. 16 h über Nacht. Die Bakterien wurden bei 4000 rpm und 4°C 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Plasmid wurde mithilfe des Kits NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Herstellerangaben isoliert und in 100 µl H₂O_{dd} gelöst. Es folgte eine Konzentrationsbestimmung wie unten beschrieben.

Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Bestimmung erfolgte spektrometrisch unter Verwendung eines NanoDrop ND-1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Die Reinheit der DNA wurde durch das Absorptionsverhältnis A260/A280 überprüft. Dabei galten Werte über 1,8 als angemessen.

Enzymatische Spaltung von DNA

Um DNA-Plasmide auf ihre Richtigkeit zu überprüfen wurde mithilfe von Enzymen eine gezielte Spaltung der DNA durchgeführt:

10 U Enzym

1 μ l enzyspezifischer Puffer (nach Herstellerempfehlung)

2-5 μ g DNA

7,5 μ l H₂O_{dd}

Der Ansatz wurde bei 37°C ca. 2 h inkubiert.

Um aus DNA-Plasmiden ein bestimmtes Fragment herauszuschneiden wurde ein größerer Ansatz verwendet:

10 U Enzym

5 μ l enzyspezifischer Puffer

10 μ g DNA

H₂O_{dd} ad 50 μ l

Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

Enzyme und die dazugehörigen Puffer wurden bei der Firma Fermentas bezogen. Mussten zwei Enzyme für eine DNA-Spaltung verwendet werden, wurden die auf der Herstellerseite im Internet empfohlenen Puffer- und Enzymkonzentrationen verwendet.

DNA-Gelelektrophorese

Um DNA und ihre Fragmente sichtbar zu machen wurde sich die Gelelektrophorese zunutze gemacht. In 100 ml einfachem TAE-Puffer wurde für ein 1%iges Gel 1 g Agarose gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Die Agarose-Gele wurden in horizontale Gelelektrophoresekammern (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gegossen, je nach DNA-Menge mit fünfzehn oder acht Taschen und mit 0.001% Ethidiumbromid versetzt. Die Proben wurden mit 6-fach Ladepuffer versehen und auf das erkaltete Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 90 V und je nach Größe der Fragmente für 20-45 min durchgeführt.

DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um nach Restriktion die DNA-Fragmente zu isolieren wurden sie zunächst in oben genannter Weise über Gelelektrophorese voneinander getrennt. Danach wurden die Fragmente auf einem UV-Tisch visualisiert, mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Weitere Schritte erfolgten nach Anleitung des Kits NucleoSpin ExtractII (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren).

Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um nach der Restriktion eine Ligation des 3'- und 5'-Endes des Vektors ohne Insert zu verhindern, wurde zu dem Reaktionsansatz 1 U FastAP mit entsprechendem Puffer dazugegeben, um den Vektor an seinen Enden zu dephosphorylieren. Der Ansatz wurde bei 37°C 1 h inkubiert und anschließend durch Zugabe von DNA-Probenpuffer gestoppt.

Herstellung des pMOWS-Vektors

Für die retrovirale Transduktion in Ba/F3-Zellen wurden alle Rezeptor-Chimären in pMOWS umklontiert. 10 µg des Vektors pMOWS-puro-GFP (KETTELER et al., 2002) wurden mit 3,3 U *Bam*HI und 1,7 U *Eco*NI in *Bam*HI-Puffer über Nacht bei 37°C enzymatisch gespalten. Die entstehenden Fragmente (5721 bp und 806 bp) wurden über Gelelektrophorese voneinander getrennt und das 5721 bp-Fragment extrahiert. Nach der Aufreinigung wurden mithilfe des Klenow-Fragments (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth) die überstehenden 5'-Enden aufgefüllt und die 3'-Enden abgebaut, um sogenannte *blunt ends* zu erzeugen. Im Reaktionsansatz wurden 5 U Klenow-Fragment, 3 µl zehnfach Puffer für Klenow-Fragment, 0,5 µl dNTP-Mix (2 mM), 25 µl DNA aus der Gelextraktion und 1 µl H₂O_{dd} verwendet. Die Reaktion verlief bei 37°C 10 min und wurde dann für 10 min bei 95°C gestoppt. Es folgte eine Dephosphorylierung wie oben beschrieben, um den Vektor auf die Insert-Ligation vorzubereiten. Die gewonnene Menge an vorpräpariertem pMOWS-Vektor reichte für alle Umklonierungen von pcDNA3.1 in pMOWS aus. Alle Inserts für den pMOWS-Vektor wurden durch enzymatische Spaltung der pcDNA3.1 mit *Pme*I/*Mss*I erzeugt. Die entstandenen *blunt end* Inserts wurden in den vorpräparierten pMOWS-Vektor ligiert und nach Vermehrung mittels Enzymspaltung durch *Hind*III auf Richtigkeit überprüft. Danach erfolgte eine Sequenzierung bei GATC Biotech, Düsseldorf.

Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von zwei DNA-Fragmenten wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:2, 2 µl T4-Ligase Puffer, 2,5 U T4 DNA Ligase und H₂O_{dd} auf 20 µl

Reaktionsansatz verwendet. Für *sticky end*-Fragmente (mit überstehenden 3'- oder 5'-Enden) wurde der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur 1 h inkubiert, für *blunt end*-Fragmente (mit glatten DNA-Enden) bei 4°C über Nacht. Hier wurden zusätzlich 2 µl einer 50%igen (m/V) PEG 4000-Lösung verwendet.

Transformation von Expressionsvektoren in kompetente *XL1 blue E.coli*

Hitzeschock-Transformation Chemisch kompetente *XL1 blue* wurden auf Eis 30 min aufgetaut. Danach wurden 20-50 ng Vektor dazugegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 42°C für 30 sec 'hitzegeshockt' und abermals 10 min auf Eis inkubiert. Zuletzt erholten sich die Bakterien in 500 µl LB-Medium unter ständiger Bewegung bei 37°C 60 min, um dann auf einer Agar-Platte mit Ampicillin ausgestrichen zu werden (Wachstum über Nacht bei 37°C).

Elektroporation Elektrisch kompetente *XL1 blue* wurden auf Eis 30 min aufgetaut. Danach wurden 20-50 ng Vektor dazugegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 1500 V 'elektroporiert' und in 500 µl LB-Medium resuspendiert. Danach inkubierten sie unter ständiger Bewegung bei 37°C 60 min um dann auf einer Agar-Platte mit Ampicillin ausgestrichen zu werden (Wachstum über Nacht bei 37°C).

3.2.2 Zellkultur

Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einem Inkubator mit 5% CO₂, einer gesättigten Wasserdampfatosphäre und 37°C kultiviert. Die verwendeten Kunststoffmaterialien wie Zellkulturschalen und Absaugpipetten stammten von den Firmen TPP *Techno Plastic Products* AG, Trasadingen, Schweiz und Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande.

Adhärenz Zelllinien

HEK293/ Phoenix-Eco HEK293 Zellen wurden in 10 ml DMEM +/+ in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert. Alle fünf Tage wurden sie im Verhältnis 1:20 gesplittet. Dazu wurden 2 ml 1-fache Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und circa 2 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DMEM +/+ gestoppt. Die Zellen

wurden von der Platte ab gespült, durch Zentrifugation vom Trypsin-haltigen Medium getrennt und in neue Schalen mit frischem Medium umgesetzt. Analog hierzu wurden auch Phoenix-Eco Zellen behandelt.

COS7 Zellen wurden ebenfalls in 10 cm Schalen mit 10 ml DMEM +/+ kultiviert. Zum Splitten wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um dann 5 min im Brutschrank mit Trypsin/EDTA zu inkubieren. Nach Mediumzugabe zur Inaktivierung des Enzyms wurden die Zellen vorsichtig vom Schalenboden ab gespült und bei 1500 rpm 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit frischem DMEM +/+ resuspendiert und dann, üblicherweise in einem Verhältnis von 1:20, in neue 10 cm Schalen mit frischem Medium umgesetzt.

Rattenhepatozyten Zellen wurden präpariert und zur Verfügung gestellt durch Annika Sommerfeld, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Tierversuchsantragsnummer **AZ 84-02.04.2012.A214**. Wir erhielten die Zellen auf Kollagen-I-beschichteten Schalen mit einer Zelldichte von ca. 300×10^6 in Williams E Medium ca. 12 Stunden nach Aussaat. Trotzdem soll die Präparation der Rattenleber hier kurz erläutert werden: Nach der Betäubung mit Isofluran wurde den Ratten 0,5 ml Heparinlösung in die Beinvene gegeben. Dann konnte der Situs der Ratte freipräpariert, die Pfortader punktiert und die Perfusion der Leber angeschlossen werden. Die Anperfusion erfolgte mit einer collagenasehaltigen Lösung mit 20-25 ml/min. Das Gewebe dissoziierte und wurde von fremdem Gewebe gereinigt. Nach mehrmaligem Filtrieren der Zellen wurden diese in Kollagen I-beschichtete Schalen gesetzt und mit Williams E Medium genährt. Weiteres Vorgehen siehe Ergebnis-Teil (Abschnitt 4.7).

Suspensionszellen

Ba/F3-gp130 Alle Ba/F3 Zellen die im Rahmen dieser Arbeit benutzt wurden waren stabil mit gp130 transduziert und enthielten zusätzlich IL-6-Rezeptor, IL-11-Rezeptor oder die beschriebenen Rezeptorchimären. Ba/F3-gp130 Zellen wuchsen stabil in DMEM +/+ mit Hyper IL-6 (10 ng/ml). Üblicherweise wurden sie in 10 cm Schalen mit 10 ml DMEM +/+ Medium kultiviert und wöchentlich im Verhältnis 1:10.000 gesplittet.

K562 Immortalisierte Leukämiezelllinie zum endogenen Nachweis von IL-11R. Wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ute Fischer (Universitätsklinikum Düsseldorf, Klinik für Kinder-Onkologie, Hämatologie und Immunologie).

Transfektion adhärenter Zelllinien

Um IL-11R, IL-6R und ihre Chimären in adhärenente Zellen zu transfizieren, wurden diese in 10 cm-Schalen ausgesät (HEK293: 2×10^6 , COS7: 5×10^5). Nach 24 h erfolgte die Transfektion mit $5 \mu\text{g}$ DNA (Vektor: pcDNA3.1) und $10 \mu\text{l}$ TurboFect (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth) in 1 ml DMEM -/- nach Herstellerangaben, indem das 'Transfekt' tröpfchenweise auf die Zellen gegeben wurde. Am nächsten Tag wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben von der Schale abgelöst und üblicherweise in 6-Well-Schalen ausgesät. So konnten Zellen mit gleicher Transfektionsrate unter verschiedenen Stimuli untersucht und miteinander verglichen werden.

Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen

Um in Ba/F3 Zellen, die bereits stabil mit gp130 transduziert waren, die Rezeptorvarianten einzubringen wurde sich der retroviralen Transduktion bedient. Hierzu wurden 8×10^5 Phoenix-Eco-Zellen in 6-Well-Schalen ausgesät und am nächsten Tag mit $1 \mu\text{g}$ DNA (pMOWs Vektor) und $2 \mu\text{l}$ TurboFect (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth) in $200 \mu\text{l}$ DMEM -/- transfiziert.

Nach 6 h wurde ein Mediumwechsel mit 2 ml 30% FCS DMEM +/+ durchgeführt.

Am dritten Tag wurden $50 \mu\text{l}$ Ba/F3-gp130 Zellen mit einer Konzentration von $2 \times 10^6/\text{ml}$ in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, mit $3 \mu\text{l}$ Polybren und $250 \mu\text{l}$ der Phoenix-Eco-Überstände vermischt und 2 h bei Raumtemperatur und 1800 rpm zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen, die Zellen in 1 ml DMEM +/+ resuspendiert und in 6-Well-Schalen überführt.

Am fünften Tag erfolgte die Selektion positiv-transduzierter Zellen durch Zugabe von Puromycin.

Shedding-Experimente

Shedding-Experimente wurden mit HEK293- (5×10^5) und COS7- (3×10^5) Zellen durchgeführt. Das Medium enthielt kein FBS/FCS oder Penicillin/Streptomycin (DMEM -/-). Üblicherweise wurde in 6-Well-Schalen mit 1 ml Medium stimuliert, dafür galten die in Tabelle 3.7 aufgeführten Konzentrationen und Inkubationszeiten (für beide Zelllinien gleich).

Tabelle 3.7: Übersicht über Stimulationszeit und Konzentration der Shedding-Experimente

Stimulanz	Konzentration	Inkubationszeit
PMA	100 nM	2 h
DMSO (Negativkontrolle für PMA und Ionomycin)	1:1000	1 oder 2 h
Ionomycin	1 μ M	1 h
GI Hemmung von ADAM10	3 nM	30 min vor Ionomycingabe

Nach Stimulation wurden die Überstände abgenommen, bei 4°C 15 min bei 13000 g zentrifugiert um Zellreste zu entfernen und bei -20°C gelagert. Zur Zellyse wurden adhärenente Zellen mit 1 ml PBS von der Schale abgekratzt und 20 sec bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das PBS wurde entfernt und die Zellen mit 100 μ l Lysis-Puffer resuspendiert. Die Zellen lysierten 1 h bei 4°C unter ständiger Bewegung. Danach wurden sie 30 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert, die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und ebenfalls zur Lagerung eingefroren. Wenn nötig wurde an dieser Stelle eine Messung zur Proteinkonzentrationsbestimmung der Lysate vorgenommen.

Proliferationsassay

Um die Funktionalität der Rezeptorchimären und der Wild-Typ-Rezeptoren zu überprüfen, wurde ein Proliferationsassay (Viabilitätsassay) mit stabil transduzierten Ba/F3-gp130-Zellen durchgeführt:

Ba/F3 Zellen wurden nach Zentrifugation (1200 rpm, 22°C, 5 min) dreimal mit 10 ml PBS gewaschen, um Zytokine zu entfernen. Die Zellen wurden in DMEM +/+ auf eine Konzentration von $5 \times 10^3 / 100 \mu$ l gebracht und dann in einer 96-Well-Platte ausgesät (100 μ l/well). Dann erfolgte die Zytokinzugabe, jeweils drei Wells mit dem gleichen Stimulus (siehe Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Übersicht über die gängigen im Proliferationsassay verwendeten Zytokinkonzentrationen

Zytokin	Konzentration
Hyper IL-6	10 ng/ml
IL-6	10 ng/ml
IL-11	10 ng/ml

Als Negativkontrolle blieben drei Wells pro Zelllinie ohne Stimulus.

Nach 48 h wurden 20 μ l CellTiter-Blue (siehe Abschnitt 3.1.6) pro Well zugegeben wurde und die Messung erfolgte auf einem Lambda Fluoro 320 Florimeter (ex-filter 530/25, em-filter 590/35). Die Messwerte nach 0 min wurden von den Messwerten nach 60 min subtrahiert und die Proliferation in RLU (*Relative Light Units*) angegeben.

Phospho-Stat3-Assay

Eine andere Methode um die Funktionalität der Rezeptoren zu beweisen stellten Phospho-Stat3-Assays dar.

Hierzu wurden stabil transduzierte Ba/F3-gp130 Zellen oder auch K562 Zellen 5 h in Medium ohne FCS und Antibiotikum 'gehungert'. Dann wurden ca. 3×10^5 Zellen/ml in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 10 ng/ml Zytokin (s.o.) für 10 min stimuliert. Die Zellen wurden 10 min bei max. g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in 50 μ l Lämmli-Puffer resuspendiert und bei 95°C für 10 min aufgekocht. Die Auswertung erfolgte über Western Blot mit α -Phospho-Stat3 Antikörper und nach 'Strippen' mit α -Stat3 Antikörper zur Ladekontrolle.

Isolierung von mononuklearen Zellen aus humanem Blut

Isolierung humaner Makrophagen für endogenes IL-11R-Shedding-Experiment. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Katja Möller-Hackbarth im Biochemischen Institut der Universität Kiel und im Rahmen ihrer Projekte mit der Ethikantragsnummer **AD404/12** durchgeführt.

Ca. 70 ml Blut wurde der Autorin von einer Ärztin entnommen und zur Untersuchung verwendet. Isolierung der PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) und deren Bearbeitung erfolgte nach Herstellerprotokoll (*Isolation of mononuclear cells from human peripheral blood by density gradient centrifugation, Monocyte Isolation Kit human* und *CD14 MicroBeads human*, alle von Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach). Isolierte

Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und mit entsprechenden Beads inkubiert (s.u.). Nach der Bindungszeit wurden die Beads mit gebundenen Zellen über eine Magnetsäule gegeben, sodass Zellen, die an Beads gebunden hatten in der Säule verblieben. Die Positivselektion wurde über spezifische Bindung der Makrophagen an CD14-Beads durchgeführt. Die Negativselektion fand über Bindung der restlichen Zellen im Blut an CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 und Glycophorin A gekoppelte Beads statt, sodass nur die Makrophagen die Säule passieren konnten. Um Zellen aus der Säule zu ernten, wurde diese mehrmals mit Medium gespült.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

BCA-Assay

Um Proteinkonzentrationen in Zelllysaten zu bestimmen wurde ein BCA-Assay angewendet. Hierzu wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific angewendet (siehe 3.1.6); Standardreihe und Durchführung gemäß des Herstellerprotokolls.

SDS-PAGE

Um Proteine nach ihrer Größe voneinander zu trennen wurden SDS-PAGE-Gele verwendet. Die Gele wurden wie in Abschnitt 3.1.10 beschrieben hergestellt (Sammel- und Trenngel). 50 μ g Zelllysate wurden vorher mit 5-fach Lämmli-Puffer bei 95°C für 10 min aufgekocht. Die Auftrennung erfolgte mit 90 V (konstanter Ampere-Wert) ca. 2,5 h. Nachdem sich die Proteine im Gel ihrer Größe nach voneinander getrennt hatten erfolgte die Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran via Western Blot.

3.2.4 Immunbiochemische Methoden

Western Blot

Für die Übertragung von Proteinen aus einem SDS-PAGE-Gel auf eine Nitrocellulosemembran wurde das Western-Blotting angewendet.

Die Nitrocellulosemembran wurde für 2 min in Methanol aktiviert und das Gel darauf plaziert. Unter und über Gel und Membran wurden vier Streifen Whatman-Papier gelegt, die vorher mit Transferpuffer befeuchtet wurden. Das Blotting erfolgte bei 20 V (und konstantem Ampere) 90 min. Danach wurden die Membranen 2 h in 5% Milchpulver/TBS-T geblockt und über Nacht bei 4°C mit entsprechenden Antikörpern (meist gelöst in 5% Milchpulver/TBS-T, ansonsten in 5% BSA/TBS-T) inkubiert. Am nächsten Tag wurde

der erste Antikörper dreimal mit TBS-T (10 min) abgewaschen und der zweite Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur zugegeben. Dieser wurde zweimal mit TBS-T und einmal mit PBS abgewaschen.

Die Entwicklung erfolgte mit Hilfe eines *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) nach Herstellerprotokoll. Die Visualisierung wurde mithilfe einer INTAS Chemocam (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) durchgeführt.

ELISA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene *Enzyme Linked Immunosorbant Assays* (ELISA) verwendet:

Anti-hIL-6-Rezeptor-ELISA, um geschnittenen humanen IL-6-Rezeptor und dessen Rezeptorchimären im Überstand von Zelllysaten nachzuweisen.

Zunächst wurde der *coating antibody* auf eine 96-Well-ELISA-Platte (Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert: α -hIL-6R 4-11 (siehe 3.1.2) in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS gelöst, 50 μ l pro Well.

Am nächsten Tag wurde der Antikörper dreimal mit PBS-T abgewaschen (200 μ l pro Well) und es folgte die Absättigung mit einer 5%-Succrose-1%BSA-in PBS-T-Lösung (200 μ l pro Well, 2 h, RT).

Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T wurden die Proben und die Standardreihe aufgetragen (50 μ l pro Well, 2 h, RT).

Für die Standardreihe wurde verdünnt:

1 μ l Hyper IL-6 (Konzentration 100 ng/ μ l) in 999 μ l 1% BSA/PBS-T, davon 40 μ l in 960 μ l BSA/ PBS-T, dann 1:1 Verdünnungen. Für die Standardreihe wurden in dieser Arbeit Konzentrationen von 2000 pg/ml bis 15,625 pg/ml verwendet, Proben mit höheren Proteinkonzentrationen mussten entsprechend verdünnt werden.

Die Proben wurden nach der Inkubationszeit dreimal mit PBS-T abgewaschen und der biotinylierte *detection antibody* Baf227 1:1000 verdünnt in 1% BSA/PBS-T auf die Platte gegeben (50 μ l pro Well, 2 h, RT).

Der Detektions-Ak wurde wie beschrieben dreimal abgewaschen und POD-gekoppeltes Streptavidin (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, 1:200 verdünnt, 100 μ l pro Well, 30 min, RT) auf den ELISA gegeben.

Nach abermaligem Waschen erfolgte die Zugabe von POD-Substrat (Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Whylen, 75 μ l pro Well, 20 min, RT). Die Reaktion wurde durch 75 μ l/Well 1,8 M Schwefelsäure gestoppt und mithilfe eines Tecan Spectra Rainbow Plattenreader (Tecan, Maennedorf, Schweiz) bei 450 nm colorimetrisch ausgewertet.

Anti-hIL-11-Rezeptor-ELISA, um geschnittenen humanen IL-11-Rezeptor und dessen Rezeptorchimären im Überstand nachzuweisen.

Protokoll und Antikörper wurden zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Gerhard Müller-Newen (Biochemisches Institut, RWTH Aachen).

Erster Schritt war der *coating antibody*: 2,1 μl C4.2- α -hIL-11R/ml PBS, 100 μl pro Well, inkubierte über Nacht bei Raumtemperatur.

Der erste Antikörper wurde dreimal mit PBS-T abgewaschen (200 μl /Well) und mit einer 20%igen Saccharose-, 1 M Tris-Lösung (pH 7,5) abgesättigt (100 μl /Well, 1 h, RT).

Dann wurden die Proben aufgetragen: 100 μl /Well, die Standard-Reihe, entsprechend dem hIL-6R-ELISA verdünnt in 1% BSA/PBS-T, mit sIL-11R.

Der *detection antibody* wurde direkt mitaufgetragen: E24.2 biotinyliert 0,54 μl /100 μl BSA-PBS-T, 10 μl /Well. Inkubiert wurden die Proben 2 h bei 37°C.

Die weiteren Schritte entsprachen denen im Anti-hIL-6R-ELISA beschriebenen mit Waschen, Streptavidin-POD, POD-Substrat und der colorimetrischen Messung bei 450 nm.

Präzipitation mittels Concanavalin A Sepharose

Die Präzipitation diente dem Nachweis löslicher Rezeptorformen aus Zellüberständen.

Zunächst wurde 1 ml Zellüberstand mit 50 μl Concanavalin A Sepharose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) über Nacht bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Sepharose durch Zentrifugation (5 min, 4°C, 14000 rpm) vom Überstand getrennt, der Überstand abgenommen und das Sepharose-Pellet zweimal mit PBS gewaschen (10 min, 4°C, 14000 rpm).

Die Sepharose wurde mit 50 μl Lämmli-Puffer resuspendiert und bei 95°C für 10 min aufgekocht.

Der Nachweis erfolgte über Western Blot mit entsprechenden Antikörpern.

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie diente dem Nachweis von IL-11R auf der Zelloberfläche und dessen Reduzierung nach Shedding-Experimenten.

Hierzu wurde eine Zellzahl von 5×10^5 bis 1×10^6 verwendet. Zentrifugiert wurde immer bei 300 g, 5 min, bei 4°C.

Zum Anfärben des IL-11R wurden die Zellen mit 3 μl E27 Antikörper in 100 μl FACS-Puffer 1 h auf Eis inkubiert. Der Antikörper wurde zweimal mit 500 μl FACS-Puffer abgewaschen und die Zellen anschließend wieder in 100 μl FACS-Puffer resuspendiert. Der

zweite Antikörper, *Fluorescein-Conjugated-Anti-Mouse*, wurde zugegeben: 1 μl , 1 h, auf Eis unter Lichtausschluss.

Dieser wurde ebenfalls zweimal mit 500 μl FACS-Puffer abgewaschen und die Zellen letztendlich in 500 μl Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt.

Die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche wurde mit einem BD FACS Canto II (Becton Dickson GmbH, Heidelberg) detektiert.

3.2.5 Deglykosylierung von Proteinen

Um die Glykosylierungsdichte von IL-6- und IL-11-Rezeptor zu untersuchen und vergleichen zu können, wurden glykosylierter und deglykosylierter Rezeptoren im Western Blot visualisiert. Die Änderung des Molekulargewichts wies auf hohe oder niedrige Glykosylierung hin. Um die Rezeptoren zu deglykosylieren wurde das *Enzymatic Protein Deglycosylation Kit* (EDEGLY) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim benutzt und nach Herstellerangaben angewendet.

3.2.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der ELISA und Proliferationsassays wurde der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Zusätzlich wurde für alle ELISA die statistische Signifikanz berechnet. Hierzu wurde ein *student's unpaired t-test* durchgeführt und p-Werte $\leq 0,05$ als statistisch signifikant angenommen (mit '*' gekennzeichnet).

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung des humanen IL-11-Rezeptors

Für diese Arbeit wurden zunächst der humane IL-6R und der IL-11R in einem Expressionsplasmid benötigt, um diese in Zellen zu exprimieren und weitergehende Experimente zu starten. Beide Rezeptoren sollten in das Expressionsplasmid pcDNA3.1 kloniert werden. Der humane IL-6R wurde bereits als fertiger Expressionsvektor in pcDNA3.1 zur Verfügung gestellt. Humaner IL-11R wurde von Geneart AG, Regensburg synthetisiert, subkloniert in einen pMA(ampR)-Vektor und mit einem myc-Tag versehen, der sich N-terminal zwischen Signalpeptid und IL-11R befindet. Die hIL-11R cDNA wurde dann über die Enzyme *NotI* und *KpnI* in pcDNA3.1-Vektor subkloniert. Nach Aufreinigung, Konzentrationsbestimmung und Sequenzierung konnte das pcDNA3.1-myc-hIL-11R-Plasmid eingesetzt werden.

4.2 Transfektion von HEK293-Zellen mit IL-6- und IL-11-Rezeptor und Induktion von ADAM17-Shedding mittels PMA

Wie auch schon aus veröffentlichten Arbeiten bekannt, wird der IL-6R nach ADAM17-Stimulation geschnitten (ALTHOFF et al., 2000). Bislang gibt es keine publizierten Daten, ob der IL-11R ebenfalls von ADAM17 oder einer anderen Protease gespalten wird.

Der hIL-6R und der hIL-11R wurden in HEK293-Zellen transfiziert, die Zellen nach 48 h lysiert und die Rezeptorexpression wurde mittels Western Blot kontrolliert. Humaner IL-6R wurde mittels hIL-6R 4-11-Antikörper detektiert, IL-11R mittels E27-Antikörper. Beide Rezeptoren können in HEK293-Zellen exprimiert und anschließend auch dargestellt werden (siehe Abbildung 4.1). Dies galt als Voraussetzung um das ADAM17-induzierte Shedding mittels PMA-Stimulation zu untersuchen. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit IL-6R und IL-11R transfiziert, am nächsten Tag gleichmäßig auf 6-Well-Schalen verteilt und 48 h später für 2 h mit 100 nM PMA stimuliert. Als Negativkontrolle wurden Zellen

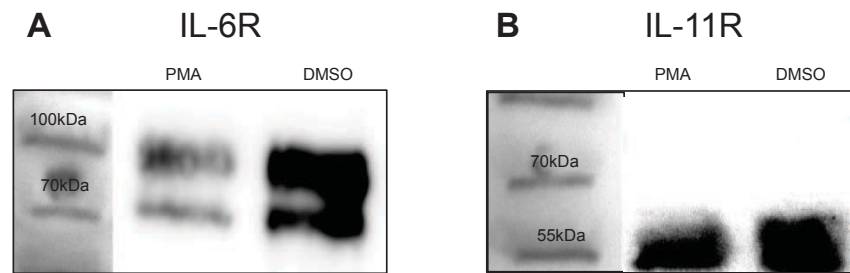


Abbildung 4.1: Zelllysate von mit (A) IL-6R und (B) IL-11R transfizierten HEK293-Zellen. Aufgetragen wurden $50 \mu\text{g}$ Zelllysate pro Kammer, dargestellt ist die Anfärbbarkeit der Rezeptoren mit und ohne ADAM17-Aktivierung durch PMA, DMSO dient als Negativkontrolle. Die Messungen sind repräsentativ für drei Wiederholungen.

mit dem Lösungsmittel DMSO inkubiert. Nach der Stimulation wurden die Zellüberstände abgenommen und die HEK293-Zellen lysiert. Die Überstände wurden mit dem entsprechend-spezifischen ELISA analysiert (Abbildung 4.2). Deutlich wird, dass der IL-6R wie erwartet nach Aktivierung von ADAM17 durch PMA geschnitten wird. Lösliche IL-6R sind in den Überständen vorzufinden, drei bis viermal so häufig wie in der Negativkontrolle. Für den IL-11R gilt dies allerdings nicht: Nach PMA-Stimulation finden sich in den Zellüberständen kaum mehr lösliche Rezeptoren als in der Negativkontrolle. Der IL-11R wird also nicht von ADAM17 geschnitten.

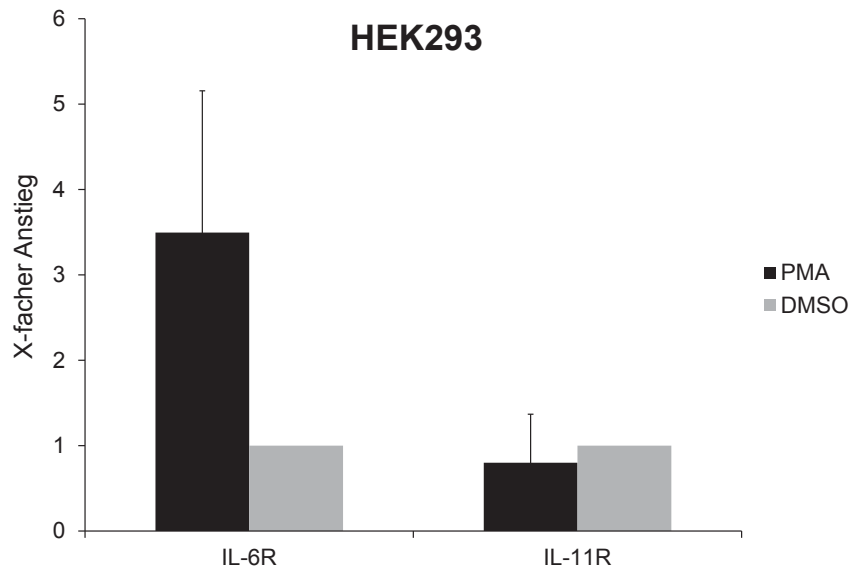


Abbildung 4.2: ELISA-Messung löslicher Rezeptorformen des IL-6Rs und IL-11Rs in HEK293-Überständen nach und ohne PMA Stimulation. Die Zunahme der löslichen Rezeptoren ist als x-facher Anstieg im Vergleich zur Negativkontrolle mit DMSO (=1) dargestellt und durch den Mittelwert \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

4.3 Klonierung von zehn Rezeptorchimären aus IL-11- und IL-6-Rezeptor

Um zu untersuchen welche Region des IL-6R für das ADAM17-Shedding von Bedeutung ist und ob es ebenfalls möglich ist, einen durch ADAM17 spaltbaren IL-11R zu erzeugen, wurden zehn verschiedene Varianten beider Rezeptoren generiert. Hierzu wurden Stalk-, Transmembran- und/oder intrazelluläre Region ausgetauscht und neu kombiniert. Eine Übersicht aller erzeugter Rezeptorvarianten bietet Abbildung 4.3.

Alle Chimären sind Kombinationen aus pcDNA3.1 hIL-6-Rezeptor und pcDNA3.1-myc-IL-11-Rezeptor, bei denen Bereiche aus der Stalk-, Transmembran- und intrazellulären Region ausgetauscht und neu kombiniert sind. Die Identifizierung der genannten Regionen erfolgte durch ein Alignment von IL-11R und IL-6R und Bestimmung der Domänengrenzen durch Prof. Dr. Joachim Grötzinger (Biochemisches Institut Kiel; Anhang 6.1). Die meisten Chimären wurden mithilfe von *Splicing by Overlapping Extension* (SOE-) PCR kloniert, indem die Primer an die gewünschten Regionen von IL-6R und IL-11R banden und diese DNA-Abschnitte nach Gelextraktion in einer weiteren PCR zusammengefügt wurden. Für die Durchführung der SOE-PCRs wurde nach denen in Tabelle 4.1 und 4.2

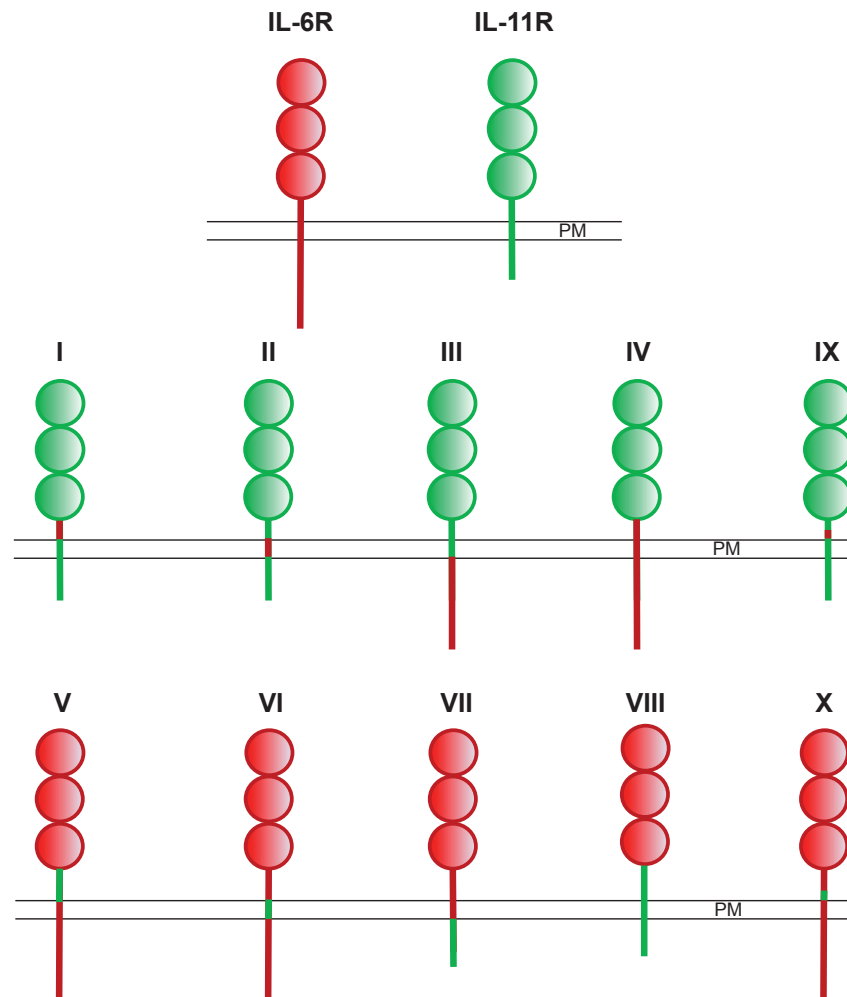


Abbildung 4.3: Darstellung aller Rezeptorvarianten in der Übersicht: Grün dargestellt sind Rezeptoranteile des IL-11R, rot die des IL-6R.

dargestellten Schemata verfahren. Das PCR-Produkt und der gewünschte Vektor wurden dann mit denselben Enzymen geschnitten, die Fragmente aus Agarose-Gelen extrahiert und ligiert. Die Inserts der Chimären I bis IV und IX wurden in den Vektor pcDNA3.1-myc-IL-11R integriert, die Varianten V bis X in pcDNA3.1-hIL-6R. Alle Chimären wurden in chemisch oder elektrisch kompetenten *XL1 blue E.coli*-Stämmen transformiert, mittels Antibiotikum selektiert und durch Mini- und Midi-Präparation aus den Bakterien isoliert. Die DNA wurde zur Sequenzierung an GATC Biotech in Düsseldorf geschickt und zwecks retroviraler Transduktion auch in einen pMOWS-Vektor kloniert. Für alle Klonierungsverfahren der Rezeptorvarianten befinden sich Schemata im Anhang (6.4). Die zugehörigen Plasmidkarten befinden sich in Abschnitt 6.5. Eine Auflistung und Sequenzierung der verwendeten Primer befindet sich in Tabelle 3.5.

Tabelle 4.1: Üblicher Ansatz für SOE-PCR/PCR:

Template-DNA:	1:10 verdünnt, 1 μ l (Konzentration: 150-900 ng/ μ l)
5'-Primer:	10 μ M
3'-Primer:	10 μ M
dNTP Mix:	10 μ M
Pfu Polymerase Puffer + MgSO ₄ :	5 μ l
Pfu Polymerase:	1,25 U
ad 50 μ l H ₂ O _{dd}	

Tabelle 4.2: Die PCR erfolgte in folgenden Temperaturintervallen:

1)	Primäre Denaturierung	95°C, 2 min
2)	Denaturierung	95°C, 1 min
3)	Primer-Annealing	68°C, 1 min
4)	Elongation (2 min pro 1 kb)	72°C, 0,5-2 min
5)	Finale Elongation	72°C, 10 min

Die Schritte 2) bis 4) werden 30 x durchlaufen.

Eine Übersicht über das Klonierungsvorgehen zeigt Tabelle 4.3. Das genaue Verfahren soll einmal exemplarisch an Chimäre I mit Text und Klonierungsschema erläutert werden:

Chimäre I (pcDNA3.1-myc-IL-11R-S): IL-11R mit Stalk-Region des IL-6R.

Die erste PCR erfolgte mit Primer I-2 (5') und I-1 (3', entspricht Primer IV-1) mit pcDNA3.1-myc-IL-11R-S-TM-ICD (Chimäre IV) als Template (Fragmentgröße 414 bp). Die zweite PCR wurde mit Primer I-3 (5') und I-4 (3') und pcDNA3.1-myc-IL11R angesetzt (Fragmentgröße 167 bp). Die PCR-Produkte wurden auf 2%iges Agarose-Gel aufgetragen und 30 min bei 90 V laufen gelassen. Anschließend wurden die Fragmente unter UV-Beleuchtung mit dem Skalpell ausgeschnitten und mithilfe eines Kits extrahiert und gereinigt. Beide PCR-Produkte wurden nun mit Primer IV-1 und I-4 zusammenpipettiert und als dritte PCR angesetzt (Fragmentgröße 581 bp). Wieder wurde das Produkt über ein

Agarose-Gel extrahiert. Nach Aufreinigung wurden das finale PCR-Produkt als Insert und das Plasmid pcDNA3.1-myc-IL11R als Vektor mit *Eco91I* (*BstEII*) und *NotI* über Nacht bei 37°C enzymatisch gespalten. Die Fragmente wurden über Agarose-Gel aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt. Der Vektor wurde zusätzlich dephosphoryliert. Es folgte Ligation, Transformation, Mini- und Midi-Präparation mit Testverdau und Sequenzierung. Das Insert wurde auch in einen pMOWS-Vektor zur retroviralen Transduktion umkloniert.

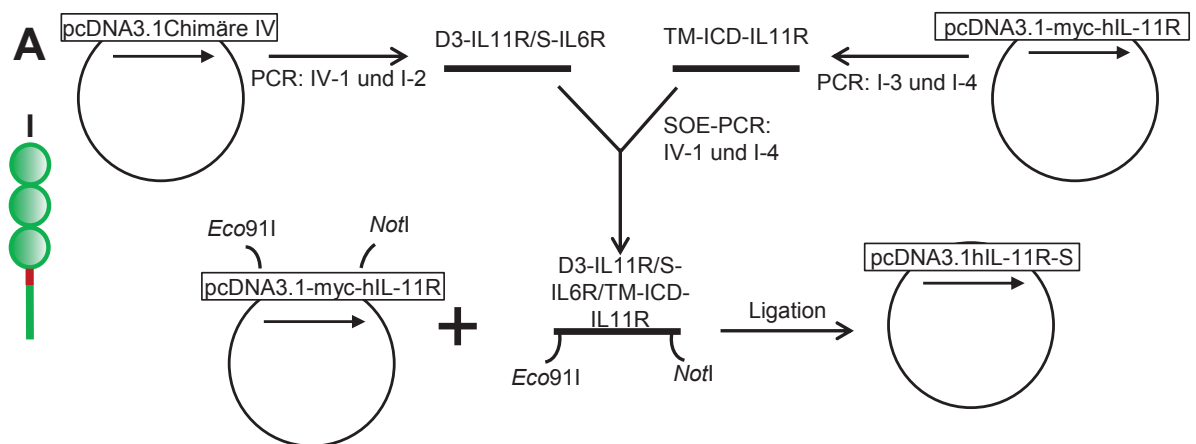


Abbildung 4.4: Klonierungsverfahren von Chimäre I.

Die weiteren Chimären sind:

Chimäre II (pcDNA3.1-myc-IL-11R-TM): IL-11R mit transmembraner Region des IL-6R.

Chimäre III (pcDNA3.1-myc-IL-11R-ICD): IL-11-Rezeptor mit intrazellulärer Domäne des IL-6-Rezeptors.

Chimäre IV (pcDNA3.1-myc-IL-11R-S-TM-ICD): IL-11-Rezeptor mit Stalk-, Transmembran- und intrazellulärer Region des IL-6-Rezeptors.

Chimäre V (pcDNA3.1-hIL-6R-S): IL-6-Rezeptor mit Stalk-Region des IL-11-Rezeptors.

Chimäre VI (pcDNA3.1-hIL-6R-TM): IL-6-Rezeptor mit transmembraner Region vom IL-11-Rezeptor.

Chimäre VII (pcDNA3.1-hIL-6R-ICD): IL-6-Rezeptor mit intrazellulärer Domäne des IL-11-Rezeptors.

Chimäre VIII (pcDNA3.1-hIL-6R-S-TM-ICD): IL-6-Rezeptor mit Stalk-, Transmembran- und intrazellulärer Region des IL-11-Rezeptors.

Chimäre IX (pcDNA3.1-myc-IL-11R-10As): IL-11-Rezeptor, bei dem die letzten zehn Aminosäuren vor der Transmembranregion gegen jeweils fünf ober- und unterhalb der ADAM17-Schnittstelle des IL-6-Rezeptors ausgetauscht sind. Die ADAM-17-Schnittstelle befindet sich im membranahen Teil der Stalk-Region zwischen dem Aminosäuren Gln357 und Asp358.

Chimäre X (pcDNA3.1-hIL-6R-10As): IL-6-Rezeptor, bei dem jeweils fünf As ober- und unterhalb der ADAM17-Schnittstelle gegen die letzten zehn As des Stalks vor der Transmembranregion des IL-11-Rezeptors ausgetauscht sind.

Tabelle 4.3: Übersicht über das Klonierungsvorgehen aller Rezeptorvarianten

Nr.	Template-DNA	Primer	Fragmentlänge	Restriktionsenzyme
I	pcDNA3.1-myc-IL-11R-S-TM-ICD (Chimäre IV) pcDNA3.1-myc-IL-11R	PCR 1: I-2 und IV-1	414 bp	<i>Eco91I</i> und <i>NotI</i>
		PCR 2: I-3 und I-4	167 bp	
		PCR 3: IV-1 und I-4	581 bp	
II	pcDNA3.1 hIL-6R pcDNA3.1-myc-IL-11R	PCR 1: VII-3 und V-2	62 bp	<i>Bsu36I</i> und <i>NotI</i>
		PCR 2: V-3 und I-4	103 bp	
		PCR 3: VII-1 und I-4	165 bp	
		PCR 4: IV-1 und VII-2	420 bp	
		PCR 5: IV-1 und I-4	585 bp	
III	pcDNA3.1-myc-IL-11R 1052618-IL-11R-pMA	keine PCR		<i>Bsu36I</i> und <i>NotI</i>
IV	pcDNA3.1-myc-IL-11R pcDNA3.1-hIL-6R	PCR 1: IV-1 und IV-2	274 bp	<i>Eco91I</i> und <i>NotI</i>
		PCR 2: IV-3 und IV-4	521 bp	
		PCR 3: IV-1 und IV-4	795 bp	
V	pcDNA3.1-IL-6R-S-TM-ICD (Chimäre VIII) pcDNA3.1-IL-6R	PCR 1: V-1 und V-2	302 bp	<i>PmlI</i> und <i>NotI</i>
		PCR 2: VII-3 und IV-4	103 bp	
		PCR 3: V-1 und IV-4	405 bp	

VI	pcDNA3.1 hIL-6R pcDNA3.1-myc-IL-11R	PCR 1: 6TM-1 und 6TM-2 PCR 2: 6TM-3 und IV-4 PCR 3: 6TM-1 und IV-4 PCR 4: V-1 und 6TM-6 PCR 5: V-1 und IV-4	62 bp 246 bp 308 bp 234 bp 542 bp	<i>Bsu36I</i> und <i>NotI</i>
VII	pcDNA3.1-hIL-6R pcDNA3.1-myc-IL-11R	PCR 1: V-1 und V-2 PCR 2: V-3 und I-4 PCR 3: V-1 und I-4	302 bp 103 bp 405 bp	<i>Bsu36I</i> und <i>NotI</i>
VIII	pcDNA3.1-IL-6R pcDNA3.1-myc-IL-11R	PCR 1: V-1 und VIII-2 PCR 2: VIII-3 und I-4 PCR 3: IV-1 und I-4	99 bp 319 bp 418 bp	<i>PmlI</i> und <i>NotI</i>
IX	pcDNA3.1-myc-IL-11R pcDNA3.1-myc-IL-11R-S (Chimäre I)	PCR 1: IV-1 und IX-2 PCR 2: IX-3 und I-4 PCR 3: IV-1 und I-4	388 bp 192 bp 581 bp	<i>Eco91I</i> und <i>NotI</i>
X	pcDNA3.1-hIL-6R pcDNA3.1-hIL-6R-S (Chimäre V)	PCR 1: V-1 und X-2 PCR 2: X-3 und IV-4 PCR 3: V-1 und IV-4	200 bp 343 bp 543 bp	<i>Bsu36I</i> und <i>NotI</i>

4.4 Prüfung der Rezeptorchimären auf Expression und Funktionalität

Um zu überprüfen, ob die hergestellten Chimären in Zellkulturzelllinien exprimiert werden und in der Lage zur Signaltransduktion sind, wurden Zellysate analysiert, Proliferations- und Phospho-Stat3-Assays angefertigt.

Um die Expression in HEK293-Zellen zu untersuchen wurden die Rezeptorvarianten zunächst transient transfiziert und die Zellysate im Western-Blot mit IL-6R- oder IL-11R-spezifischen Antikörpern dargestellt. Abbildung 4.5A zeigt alle IL-6R-Varianten in

HEK293-Zellen. Deutlich wird, dass alle IL-6R-Varianten in HEK293-Zellen im ausreichenden Maße exprimiert werden. Ebenso gelingt die Darstellung im Western-Blot durch den IL-6R-spezifischen Antikörper 4-11. Der IL-6R selbst hat eine molekulare Größe von 80 kDa, daher laufen er und seine Varianten meist etwas oberhalb der 70 kDa-Bande. Auch für die in Abbildung 4.5B dargestellten IL-11R-Varianten kann eine deutliche Expression in HEK293-Zellen festgestellt werden. Weiterhin lassen sich die Zelllysate gut durch den IL-11R-spezifischen Antikörper E27 darstellen. IL-11R und dessen Varianten laufen auf Höhe der 55 kDa-Bande. Durch den β -actin-Antikörper kann ein gleichwertiger Einsatz von Protein aus den Lysaten nachgewiesen werden, obwohl die Transfektionsraten der verschiedenen Rezeptoren voneinander abweichen.

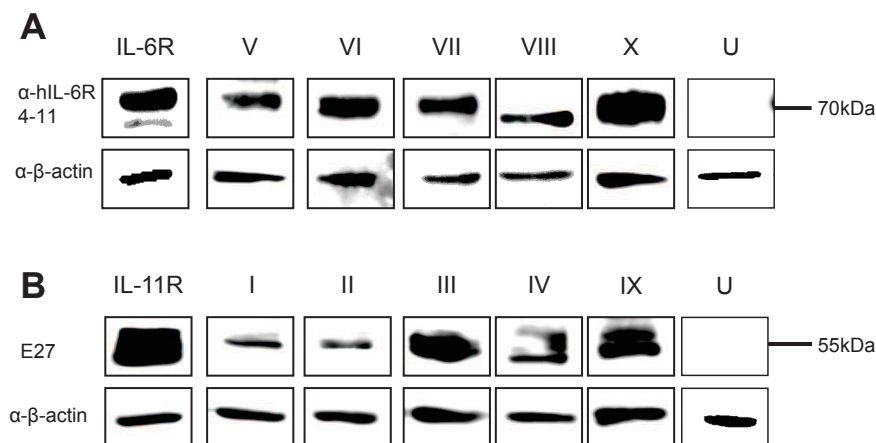


Abbildung 4.5: Darstellung der Expression aller Rezeptorvarianten: HEK293-Lysate von transfizierten IL-6R-Varianten (A) und IL-11R-Varianten (B) im Western-Blot. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei Versuchsansätzen mit β -actin als Ladekontrolle. 'U' kennzeichnet die untransfizierte Negativkontrolle.

Nach der Überprüfung der Expression sollte nun auch die Funktionalität der Rezeptorchimären überprüft werden. Dazu wurde die murine Prä-B-Zelllinie Ba/F3 verwendet. Ba/F3 Zellen wachsen nur zytokinabhängig. Unter normalen Bedingungen benötigen sie IL-3 zum Zellwachstum, nach Transduktion mit gp130 können sie auch mit IL-6 und sIL-6R oder IL-11 und sIL-11R wachsen. Die verwendeten Ba/F3 Zellen waren bereits stabil mit gp130 transduziert, sodass zur Signaltransduktion nur noch die Rezeptorvarianten und die Wild-Typ-Rezeptoren IL-6R und IL-11R in die Zellen eingebracht werden mussten, um ein Zellwachstum mit alleiniger Gabe von IL-6 und IL-11 zu erzeugen.

Dazu wurde der zur retroviralen Transduktion fähige Vektor pMOWS verwendet, beschrieben durch KETTELER et al., 2002. Die DNA aller Rezeptorvarianten musste also aus pcDNA3.1 in pMOWS umklontiert werden (siehe Abschnitt 3.2.1). Der pMOWS-Vektor wurde zunächst in die zur retroviralen Transduktion fähigen Phoenix-Eco Zellen eingebracht. Nach einem Tag wurden dann die Zellüberstände auf Ba/F3-gp130 Zellen gegeben. Die

Selektion der richtigen Rezeptorvarianten erfolgte mittels Puromycin (3.2.2). Entstanden waren nun zwölf verschiedene Ba/F3 Zelllinien mit stabil transduziertem gp130 und den Rezeptoren IL-6R, IL-11R und deren Rezeptorvarianten.

Um die Funktionalität der Rezeptortypen festzustellen wurde sich zwei verschiedener Methoden bedient. Die erste war ein Proliferationsassay oder auch Zellviabilitätsassay. Für den Proliferationsassay wurden die Zellen mit Hyper-IL-6, einem Fusionsprotein aus löslichem IL-6R und IL-6 als Positivkontrolle, IL-6, IL-11 und ohne Zytokin als Negativkontrolle 48 h stimuliert (96-Well-Patte mit je 5000 Zellen in 100 μ l Medium). Nach dieser Zeit wurde den Zellen *Cell Titer Blue* zugegeben und durch den Umsatz dieses Stoffes wurde auf die Zellproliferation geschlossen. Die Zellproliferation wurde dann in *Relative Light Units (RLU)* angegeben.

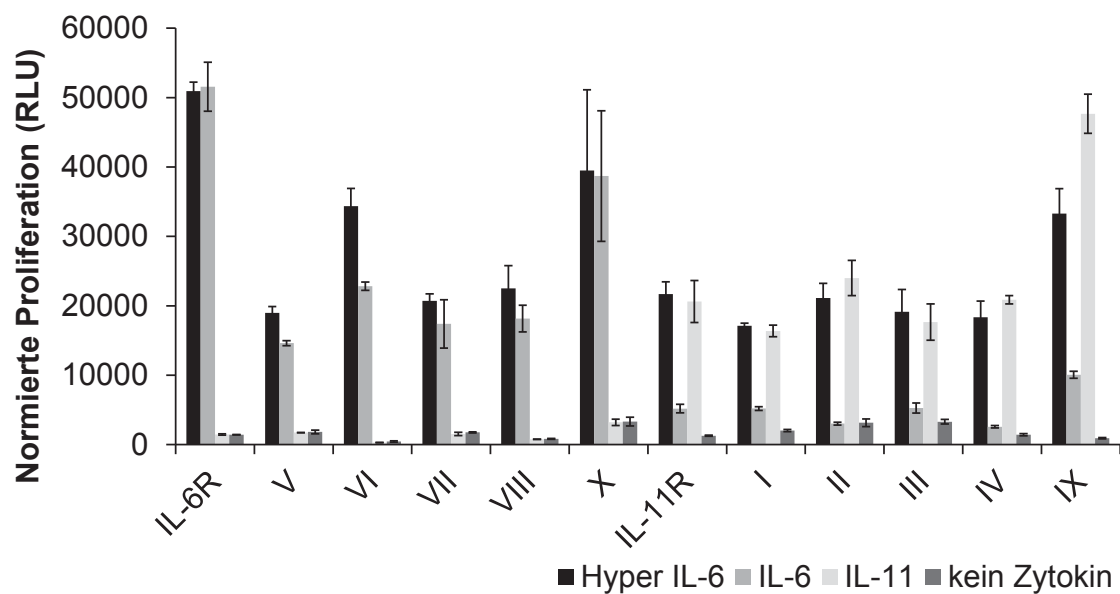


Abbildung 4.6: Rezeptorvarianten in Ba/F3-gp130 Zellen im Proliferationsassay.

Dargestellt ist die normierte Proliferation nach 48 h Zellwachstum mit Hyper-IL-6, IL-6, IL-11 und ohne Zytokin. Die Messung erfolgte nach Ablauf der Stimulationszeit durch Zugabe von *CellTiter blue* nach 0 min und 60 min. Die normierte Proliferation wird als Subtraktionswert der zweiten und ersten Messung angegeben. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unterschiedliche Messungen \pm SD.

Die Abbildung 4.6 zeigt, dass alle Varianten mit Stimulation durch Hyper IL-6 wachsen können. Das rekombinante Protein aus löslichem IL-6R und IL-6 bindet an die gp130 Moleküle, die sich auf allen Ba/F3-Zellen befinden und kann so das Wachstum stimulieren. Die Rezeptorvarianten, die Domäne eins bis drei des IL-6R besitzen (Chimären V, VI, VII, VIII und X) wachsen auch, wenn sie nur mit IL-6 stimuliert werden. Diese Varianten

wachsen nicht mit IL-11 und auch nicht ohne Zytokin, was eine unspezifische Reaktion ausschließt. Umgekehrt verhält es sich mit den IL-11R-Chimären, die mit IL-11 wachsen können, aber nicht mit IL-6 (Chimären I, II, III, IV und IX). Alle Rezeptorvarianten reagieren also auf Zytokinbindung und sind in der Lage intrazellulär Signale weiterzuleiten. Zur genaueren Darstellung dieser intrazellulären Signalwege diente die zweite Methode: Phospho-Stat3-Assays (P-Stat3-Assay). Hierzu wurden die gleichen Ba/F3-gp130-Zelllinien verwendet: Nachdem die Zellpopulation eine Zahl von ca. 1×10^7 erreicht hatte wurden die Zellen ohne FCS für 5 h 'gehungert'. Dann erfolgte die Stimulation mit den gleichen Zytokinen wie oben: Hyper IL-6, IL-6, IL-11 und kein Zytokin. Die Zelllysate wurden mittels Western Blot ausgewertet. Anti-Phospho-Stat3 stellte die positive Aktivität der Rezeptoren nach bestimmter Stimulation dar. Stat-3 Antikörper diente nach Strippen der Membranen als Ladekontrolle.

IL-6R und dessen Varianten leiten nach Hyper IL-6- (Positivkontrolle) und IL-6-Stimulation die intrazelluläre Phosphorylierung von Stat3 ein (siehe Abbildung 4.7). Die Rezeptoren können also das Signal von der Zytokinbindung über den JAK/STAT-Weg weiterleiten. Dies geschieht nicht bei Stimulation mit IL-11 oder ohne Zytokin, ist also eine spezifische Rezeptor-Zytokin-Aktivität.

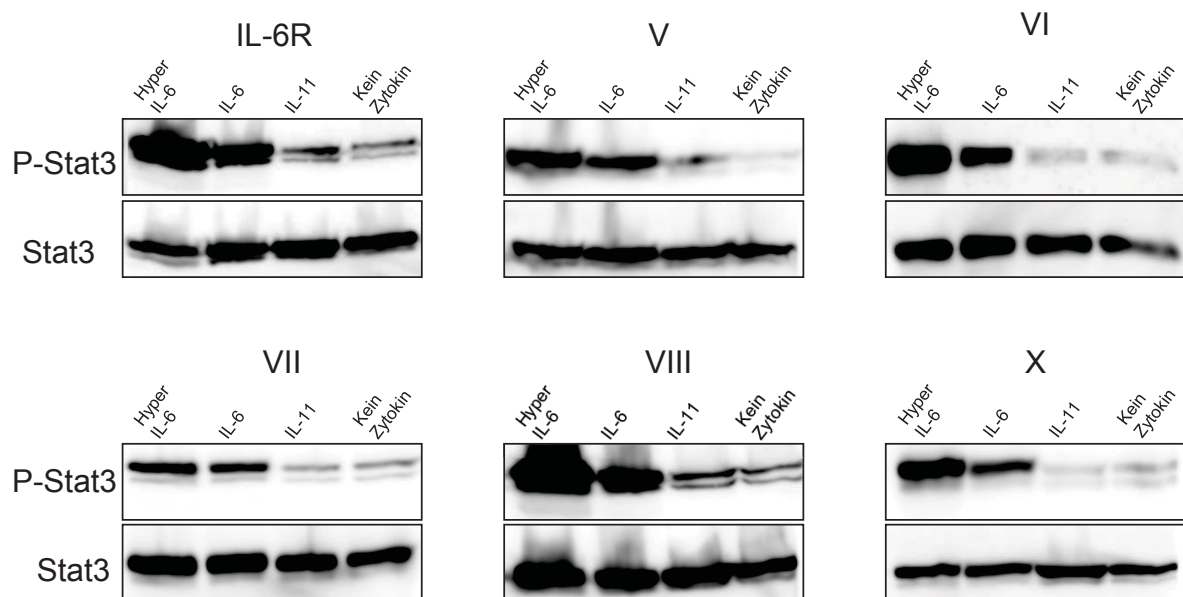


Abbildung 4.7: Rezeptorvarianten des IL-6R im P-Stat3-Assay: Oben ist das phosphorylierte Stat3 angefärbt, unten Stat3 zur Ladekontrolle. Alle Varianten wachsen mit der Positivkontrolle Hyper IL-6, aber auch mit IL-6. Es findet keine Stat3-Phosphorylierung nach IL-11-Stimulation oder ohne Zytokingabe statt. Die IL-6R-Chimären sind biologisch aktiv und reagieren zytokinspezifisch. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei Experimente.

Umgekehrt gilt diese spezifische Rezeptor-Zytokin-Aktivität für die IL-11R-Varianten nach Stimulation mit IL-11 (Abbildung 4.8): Diese Chimären führen zu einem vielfach erhöhtem P-Stat3 intrazellulär, aber nicht nach IL-6-Stimulation und ohne Zytokin. Hyper-IL-6 dient hier ebenfalls als Positivkontrolle, da es unabhängig von den transduzierten Rezeptoren über gp130 signalisiert.

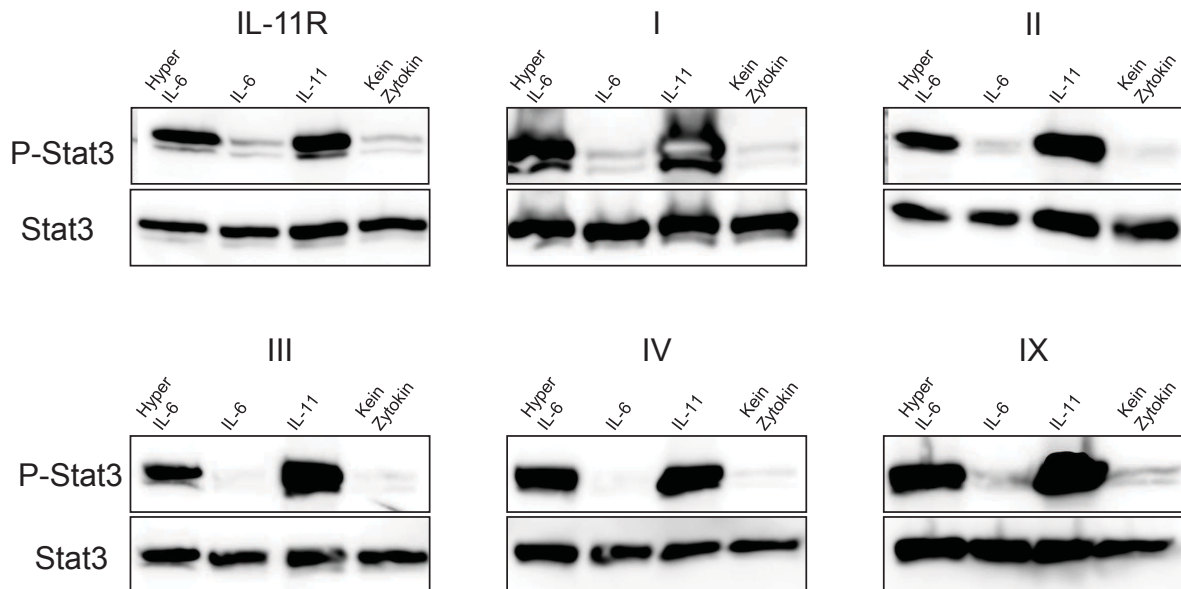


Abbildung 4.8: Rezeptorvarianten des IL-11R im P-Stat3-Assay: Oben ist das phosphorylierte Stat3 angefärbt, unten Stat3. Alle Rezeptorchimären werden durch Hyper IL-6 angeregt, Phosphorylierung von Stat3 findet aber auch nach IL-11-Stimulation statt. Keine Reaktion der intrazellulären Signalwege zeigt sich nach IL-6-Stimulation und ohne Zytokingabe. Die IL-11R-Varianten reagieren also ebenfalls zytokinspezifisch. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei Messungen.

Beide Methoden, der Proliferationsassay und Phospho-Stat3-Assay, wiesen die Rezeptorfunktionalität für intrazelluläre Signalkaskaden nach. Die Stat3-Ladekontrolle zeigt, dass alle Stimulationsansätze die gleiche Materialmenge enthielten und die stärkere P-Stat3-Bande nicht etwa durch einen größeren Einsatz von Ba/F3-gp130-Zellen zu erklären ist. Zwei unterschiedliche Methoden kommen also auf dasselbe Ergebnis: Alle Chimären sind aktiv und lassen sich durch dieselben Zytokine stimulieren (IL-6R-Varianten durch IL-6 und IL-11R-Varianten durch IL-11), bzw. nicht stimulieren (IL-6R-Varianten nicht durch IL-11 und die IL-11R-Varianten nicht durch IL-6).

Der nächste Schritt war dann die Untersuchung des Shedding-Verhaltens von IL-6R und IL-11R und dessen Chimären.

4.5 ADAM17-Shedding nach PMA-Stimulation

Zur Untersuchung des ADAM17-Sheddings wurde der Phorbolester PMA verwendet. HEK293 oder COS7 Zellen wurden mit den Wildtyp-Rezeptoren und den Rezeptorchimären transfiziert und am nächsten Tag von einer 10 cm-Schale in 6-well-Platten umgesetzt. So konnte eine gleichmäßige Transfektionsrate für alle Stimulationsansätze einer Rezeptorvariante gewährleistet werden. 48 h nach Transfektion konnten die Zellen stimuliert werden. Als Negativkontrolle diente das Lösungsmittel DMSO, das ebenso wie PMA 2 h auf den Zellen belassen wurde. Nach der Stimulationszeit wurden die Überstände abgenommen und die Zellen lysiert. Die Überstände konnten mittels ELISA oder durch Concanavalin A-Sepharose-Fällung ausgewertet werden (siehe Abschnitt 3.2.4 und 3.2.4). Die Lysate dienten als Kontrolle einer gleichmäßigen Transfektionsrate.

Wie in Abbildung 4.2 bereits dargestellt, findet für den IL-6R Shedding statt, nicht aber für den IL-11R. Die Rezeptorchimären erlauben eine nähere Eingrenzung der Ursache.

Abbildung 4.9A zeigt ELISA-Messungen für die IL-6R-Varianten in HEK293-Zellen. ADAM17 schnitt diejenigen Rezeptorchimären, die die Stalk-Region des IL-6R besitzen: Chimäre Nr. VI und VII weisen lösliche Rezeptorformen in den Zellüberständen nach ADAM17-Aktivierung auf. Bei Chimäre V, VIII und X sind diese nicht wesentlich erhöht. Sie enthalten die Stalk-Region des IL-11Rs. Gleiche Ergebnisse lassen sich auch mit COS7-Zellen erzielen (siehe Abbildung 4.9B).

Neben den ELISA-Messungen wurden die Zellüberstände von HEK293-Zellen auch mittels Fällung durch Concanavalin A-Sepharose ausgewertet. Diese bindet an Glykosilierungsreste der Rezeptoren und kann durch Zentrifugation die löslichen Rezeptorformen aus den Überständen trennen. Diese Methode war leider nur bedingt auf alle Rezeptorvarianten anwendbar (siehe Abschnitt 4.18), da die Chimären unterschiedlich glykosyliert waren.

Darstellung 4.9C zeigt die Präzipitation der löslichen Rezeptoren von IL-6R und dessen Chimären V, VI, VII, VIII und X. Die obere Zeile zeigt die Zellüberstände von HEK293-Zellen und stellt die löslichen Rezeptorformen dar, falls vorhanden. In der Mitte sind die Zelllysate dargestellt, sie enthalten den membrangebundenen Rezeptor. Ganz unten ist β -actin zur Ladekontrolle angefärbt.

Im Western Blot ist nach PMA-Stimulation in den Zellüberständen für Chimäre Nr. VI und VII und den IL-6R Protein nachweisbar. Chimäre Nr. V, VIII und X enthalten die Stalk-Region des IL-11Rs, bzw. die letzten zehn Aminosäuren und werden somit nicht durch ADAM17 geschnitten. Daher lässt sich für diese Varianten auch kein Protein nachweisen.

Nun sollte auch für die IL-11R-Chimären betrachtet werden, wie sie sich unter ADAM17-Aktivierung verhalten. Die Erwartung war, dass nun diejenigen Chimären geshedded werden, die die Stalk-Region des IL-6R enthalten. Und tatsächlich konnte dieser Umstand gezeigt werden. Abbildung 4.10A zeigt zusammengefasste ELISA-Daten von HEK293-

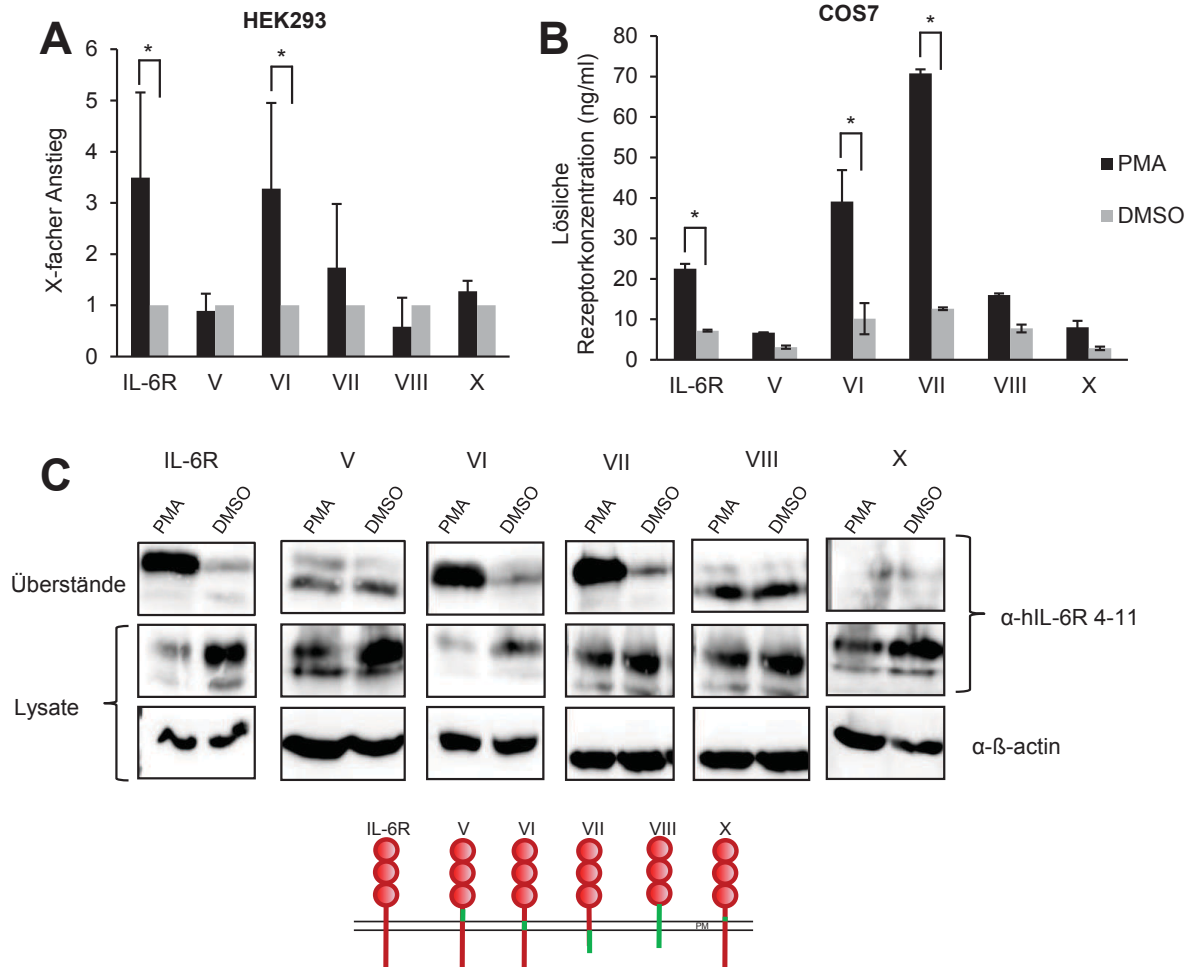


Abbildung 4.9: A: Zusammengefasste ELISA-Daten aus HEK293-Zellen der IL-6R-Varianten. Dargestellt ist der x-fache Anstieg löslicher Rezeptorformen nach PMA-Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle mit DMSO (=1). Die Daten sind aus den Mittelwerten drei unabhängiger Experimente zusammengefasst, \pm SD.

B: ELISA-Daten von COS7-Zellen. Dargestellt ist der Anstieg löslicher Rezeptorformen in den Zellüberständen nach und ohne ADAM17-Aktivierung in ng/ml. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei Messungen \pm SD.

C: Präzipitation der IL-6R-Chimären durch Concanavalin A-Sepharose aus HEK293-Überständen. Die löslichen Rezeptorformen aus den Zellüberständen wurden mittels Concanavalin A-Sepharose über Nacht gefällt und mittels hIL-6R 4-11 Antikörper im Western Blot dargestellt. Zelllysate wurden zur Expressionskontrolle durch ein Acrylamidgel aufgetrennt und via Western Blot detektiert. Die Nitrocellulosemembran wurde für die Ladekontrolle gestrippt und mit β -actin-AK erneut im Western Blot dargestellt.

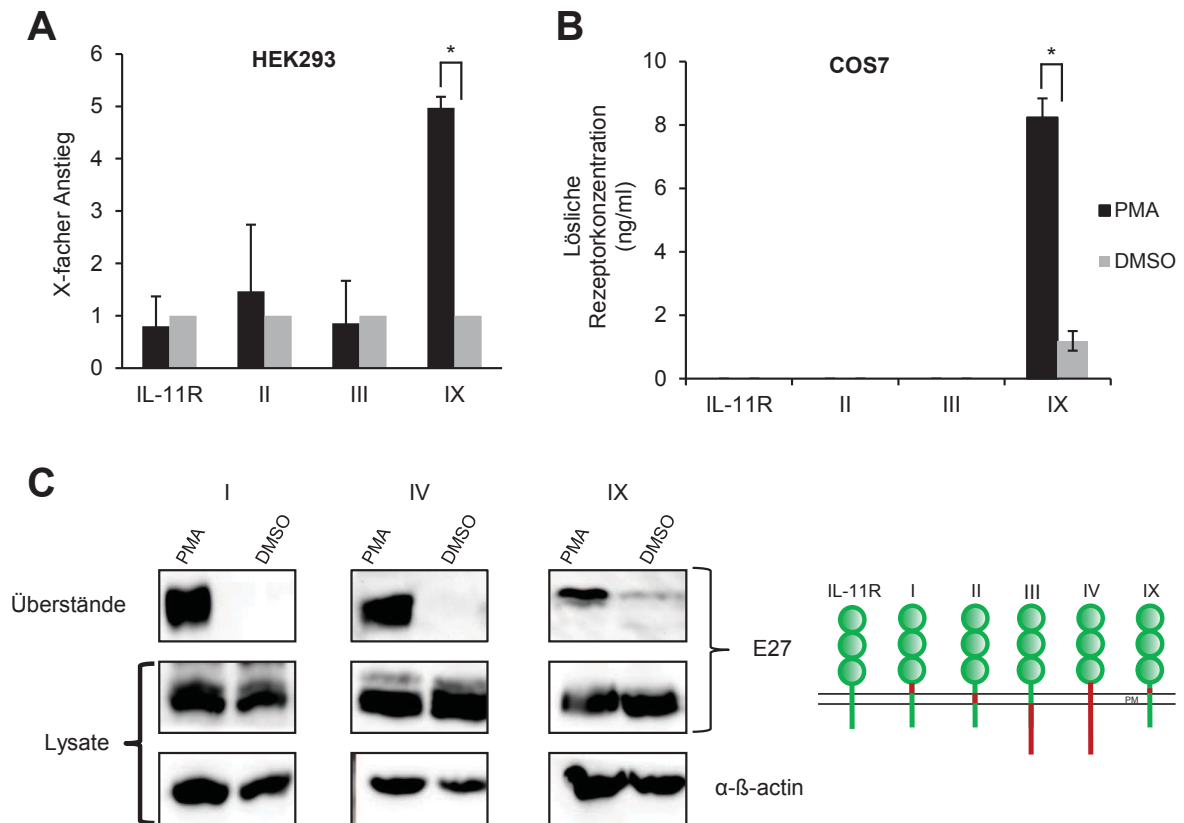


Abbildung 4.10: A: Zusammengefasste ELISA-Daten aus HEK293-Zellen der IL-11R-Varianten. Dargestellt ist der x-fache Anstieg löslicher Rezeptorformen nach PMA-Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle mit DMSO (=1). Die Daten sind aus den Mittelwerten drei unabhängiger Experimente zusammengefasst, \pm SD.

B: ELISA-Daten von COS7-Zellen. Dargestellt ist der Anstieg löslicher Rezeptorformen in den Zellüberständen nach und ohne ADAM17-Aktivierung in ng/ml. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei Messungen \pm SD. Für den IL-11R und die Varianten II und III waren die Messwerte so niedrig, dass sie von dem entsprechenden ELISA nicht mehr detektiert werden konnten.

C: Präzipitation der IL-11R-Chimären I, IV und IX durch Concanavalin A-Sepharose aus HEK293-Überständen. Überstände wurden mittels Concanavalin A-Sepharose über Nacht unter ständiger Bewegung gefällt und die löslichen Rezeptoren mit E27 Antikörper im Western Blot dargestellt. Die Rezeptorexpression aus den Zelllysaten wurde ebenfalls via Western Blot gemessen und zusätzlich die Ladekontrolle nach Strippen der Membran mit α - β -actin durchgeführt.

Zellen die mit den IL-11R-Chimären transfiziert wurden. Die Varianten mit Stalk-Region des IL-11R, Chimäre Nr. II und III, werden nicht durch ADAM17 geschnitten. Diejenigen aber mit der Stalk-Region des IL-6R werden nach ADAM17-Aktivierung prozessiert. Im Anti-hIL-11R-ELISA mit E24.2 als Antikörper konnten leider nicht die Chimären detektiert werden, die den vollständigen Stalk des IL-6R besitzen (I und IV), da der Antikörper in der Stalk-Region des IL-11R bindet. Glücklicherweise konnte Chimäre IX durch diesen Antikörper noch detektiert werden, da das Bindungsepitop hier noch enthalten war (siehe Abbildung 6.3 im Anhang).

Gleiche Ergebnisse im ELISA konnten auch in COS7 produziert werden (Abbildung 4.10B): Lösliche Rezeptorformen finden sich nur bei Chimäre IX wieder. Für den IL-11R und Chimäre II und III konnten keine Messwerte erfasst werden. Die Absorption der Proben im ELISA war so gering, dass die Standardreihe für eine quantitative Bestimmung der Rezeptormenge nicht sensitiv war. Das Shedding von Chimäre IX macht insbesondere die Funktion der fünf Aminosäuren ober- und unterhalb der ADAM17-Schnittstelle in der Stalk-Region des IL-6R für das ADAM17-Shedding deutlich.

Um nun das Problem der fehlenden Detektierbarkeit von Chimäre I und IV zu beseitigen, wurde sich der Präzipitation durch Concanavalin A-Sepharose bedient. Da der IL-6R auch in der Stalk-Region glykosyliert ist (MÜLLBERG et al., 1994), können diese Chimären so nachgewiesen werden. Die Zellüberstände von HEK293-Zellen zeigen für Chimäre I und IV lösliche Rezeptorformen im Western Blot nach ADAM17-Aktivierung durch PMA. Das ist also der Beweis, dass Chimäre I und IV im Stalk des IL-6R ebenfalls geschnitten werden können (Abbildung 4.10C). Ergänzend zur ELISA-Methode ließ sich über Präzipitation auch für Chimäre IX ein ADAM17-induziertes Shedding nachweisen.

4.6 ADAM10-Shedding nach Ionomycin-Stimulation

Neben der ADAM17-Protease sollte auch eine andere Protease auf ihr Sheddingverhalten bezüglich des IL-6R und IL-11R und deren Chimären untersucht werden. Aus früheren Arbeiten war ADAM10 schon als Sheddase des IL-6R bekannt (GARBERS et al., 2011b). Darum wurde entschieden, diese Protease dahingehend zu untersuchen, ob sie den IL-11R schneiden kann. Als Stimulator von ADAM10 wurde in dieser Arbeit das Calcium-Ionophor Ionomycin verwendet. Zusätzlich zum ADAM10-Aktivator wurde der ADAM10 spezifische Inhibitor GI254023X (weiter nur als 'GI' bezeichnet) benutzt. Durch Einsatz des Inhibitors können beobachtete Effekte der Ionomycin-Stimulation ausschließlich auf ADAM10 zurückgeführt werden, wenn dieser Effekt durch gleichzeitige Gabe von Ionomycin und GI nicht mehr beobachtet werden kann.

Die Shedding-Experimente wurden wie für das ADAM17-Shedding mit HEK293- und COS7-Zellen durchgeführt. Ionomycin wurde wegen seiner apoptotischen Wirkung nur

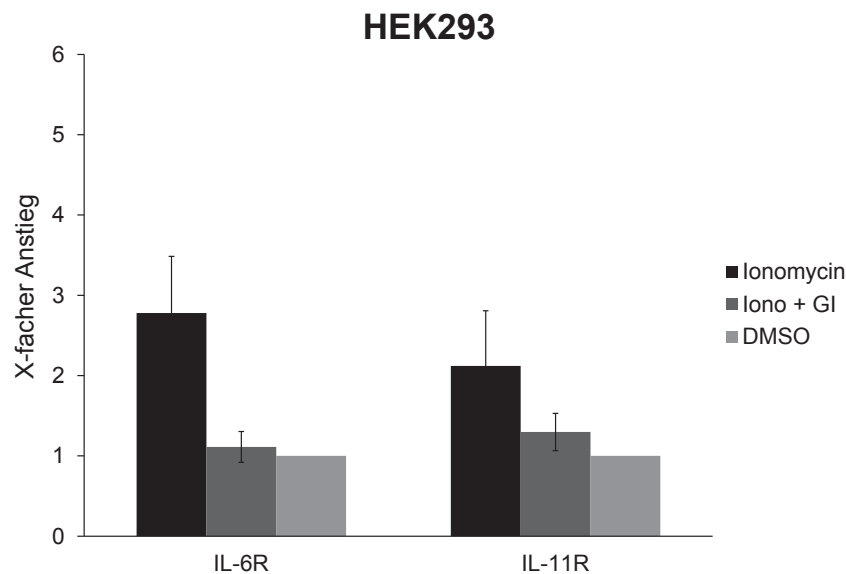


Abbildung 4.11: ADAM10-Shedding in HEK293-Zellen: ELISA-Messungen aus Zellüberständen mit IL-6R und IL-11R cDNA transfizierten Zellen. Dargestellt sind ELISA-Daten aus mindestens drei Experimenten, dessen Mittelwerte aus dem x-fachen Anstieg löslicher Rezeptoren in den Zellüberständen nach Ionomycin- und Ionomycin+GI254023X-Stimulation (Iono+GI) im Vergleich zu DMSO (=1), \pm SD zusammengefasst sind. Es findet für den IL-6R sowie für den IL-11R nach ADAM10-Aktivierung ein zwei- bis dreifach erhöhtes Shedding statt. Dieser Effekt ist nicht beobachtbar nach DMSO-Stimulation und wenn ADAM10 vorher durch GI254023X inhibiert wurde.

1 h auf den Zellen belassen, als Negativkontrolle diente ebenfalls das Lösungsmittel DMSO. GI wurde 30 min vor Ionomycingabe zu den Zellen gegeben, um die Protease hemmen zu können. Die Zellüberstände wurden mittels ELISA und die der HEK293-Zellen auch über Concanavalin A-Sepharose-Fällung ausgewertet. Zelllysate dienten zum Vergleich einer gleichmäßigen Transfektionsrate.

Zunächst wurde das ADAM10-Shedding nur für die beiden Wildtyp-Rezeptoren IL-6R und IL-11R untersucht (siehe Abbildung 4.11). Bestätigt wurde das bekannte Shedding des IL-6Rs durch ADAM10. Erstaunlicherweise wurde jedoch auch der IL-11R durch ADAM10 geschnitten. Nach Ionomycin-Stimulation konnten zwei bis dreimal so viele lösliche IL-11R-Moleküle in den Zellüberständen nachgewiesen werden als nach DMSO-Inkubation. Zusätzlich konnte das Shedding durch GI-Gabe unterbunden werden, was ein Hinweis für ein ADAM10 induziertes Shedding ist.

Die Tatsache dass ADAM10 sehr wahrscheinlich in der Lage ist, IL-6R und IL-11R zu schneiden, sollte nun auch für die Rezeptorvarianten untersucht werden. Die Erwar-

tung war, dass auch alle Chimären durch die Protease geschnitten werden können. Zunächst wurde das ADAM10-Shedding für die IL-6R-Chimären untersucht. In HEK293-Zellen konnte für alle Varianten ein ADAM10 induziertes Shedding gezeigt werden: Nach Ionomycin-Stimulation erhöhten sich die löslichen Rezeptorformen in den Zellüberständen und dies konnte durch vorherige Gabe von GI gehemmt werden. Auch in COS7-Zellen zeigte sich dieser Effekt (Abbildungen 4.12A und 4.12B). Zusätzlich wurden auch für das ADAM10 induzierte Shedding Präzipitationen aus den Zellüberständen von HEK293-Zellen durchgeführt (Abbildung 4.12C). Für die IL-6R-Varianten ist zu beobachten, dass der IL-6R und Chimären VI und VII lösliche Rezeptorformen nach PMA und Ionomycin-Stimulation in den Zellüberständen aufweisen. Chimäre V, VIII und X zeigen nur nach ADAM10-Aktivierung einen Proteinnachweis im Western-Blot. Dies ist nicht mehr zu sehen, wenn gleichzeitig GI zu den Zellen gegeben wird. Dies bestätigt wieder die Annahme, dass ADAM10 in der Lage ist beide Rezeptortypen, IL-11R und IL-6R, zu schneiden.

Wie für die IL-6R-Varianten konnte im ELISA auch für die IL-11R-Varianten ein Shedding durch ADAM10 festgestellt werden. Abbildungen 4.13A und 4.13B zeigen, dass alle Chimären in HEK293-Zellen sowie in COS7 Zellen nach Ionomycin-Stimulation geschnitten werden und dies bei gleichzeitiger Hemmung von ADAM10 durch GI nicht der Fall ist. Chimäre II, III und der IL-11R konnten nicht mittels Concanavalin A-Sepharose detektiert werden, da sie zu gering oder gar nicht glykosyliert sind (siehe 4.9). Trotzdem wurde der Versuch unternommen, für den IL-11R eine Immunpräzipitation zu etablieren (Abbildung 4.13C). Die Zellüberstände wurden über Nacht mit dem Anti-myc-Antikörper 71D10 inkubiert und am nächsten Tag mittels Protein A-Sepharose gefällt. Deutlich wird, dass zumindest für den IL-11R nach Ionomycin-Stimulation Protein im Western Blot sichtbar wird, hingegen nach PMA- und DMSO-Stimulation gar keine bzw. viel schwächere Nachweise zu detektieren sind. Hiermit gelang also neben dem ELISA, als zusätzliche Methode für den IL-11R, das ADAM10-Shedding mittels Präzipitation und anschließendem Western Blot zu beweisen. Leider wurde diese Methode erst zum Ende dieser Arbeit etabliert und konnte so für den IL-11R nur einmal und für dessen Varianten gar nicht durchgeführt werden. Die deutliche Detektion von Protein nach Ionomycin-Stimulation zeigt aber, dass nur nach ADAM10-Aktivierung eine signifikante Steigerung löslicher Rezeptorformen des IL-11Rs in den Zellüberständen zu finden ist.

Zusammenfassend kann hier festgestellt werden, dass ADAM10 IL-6R, IL-11R und alle Chimären schneidet. Dies kann sowohl über ELISA, als auch über Präzipitation der Rezeptoren aus den Zellüberständen festgestellt werden. So wurde ein neues Substrat der ADAM10-Protease entdeckt, dessen Konsequenzen *in vivo* noch unbekannt sind. Um nun genauer das ADAM10-Shedding am IL-11R zu untersuchen, sollten endogen IL-11R-tragende Zellen eingesetzt werden.

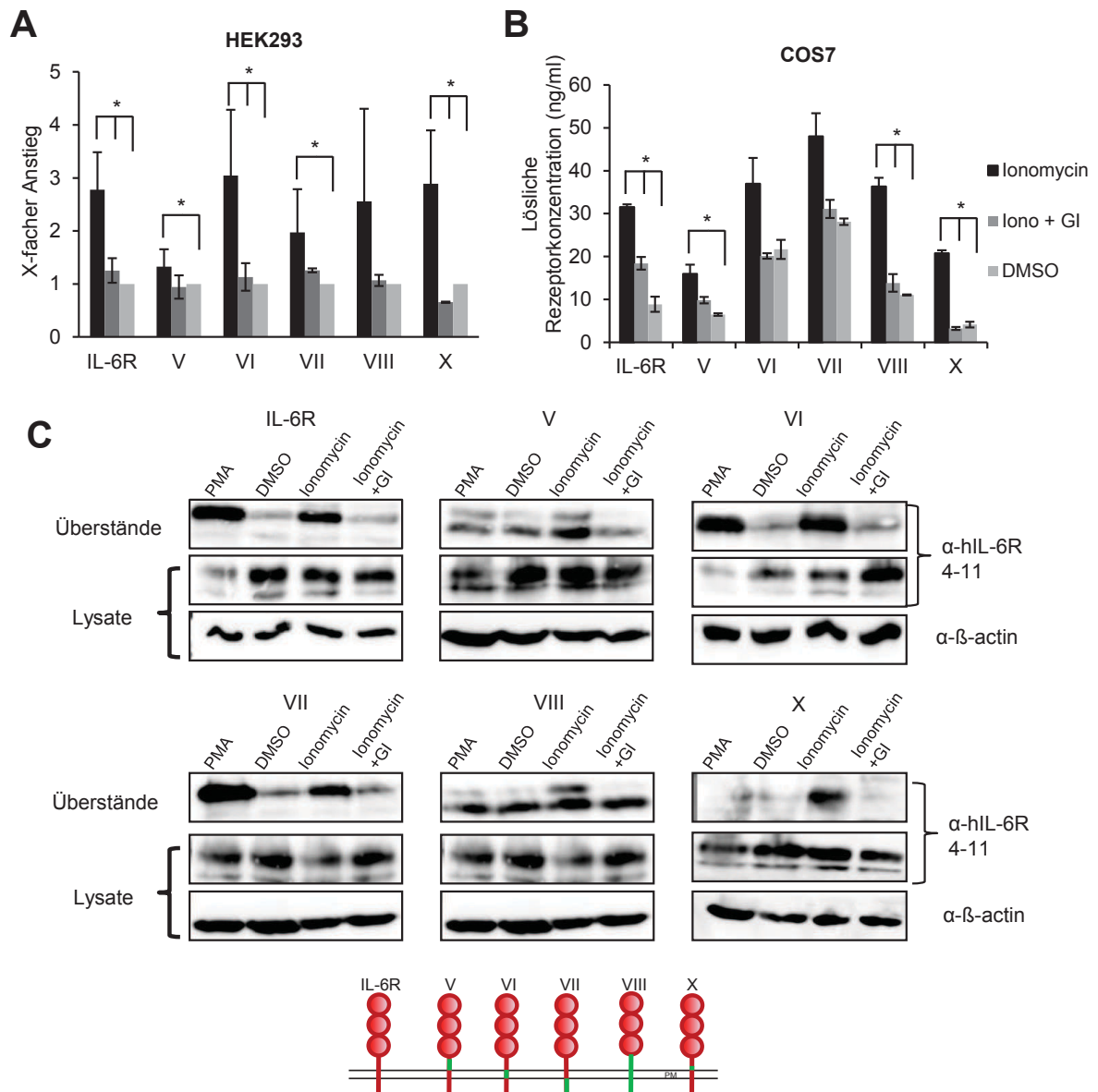


Abbildung 4.12: A: ELISA-Daten der IL-6R-Varianten von HEK293-Zellen mit Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist der x-fache Anstieg löslicher Rezeptorformen nach Ionomycin- und nach Ionomycin+GI-Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle mit DMSO (=1), \pm SD.

B: ELISA-Daten von COS7-Zellen. Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für mindestens zwei Experimente und stellt die löslichen Rezeptoren aus den Zellüberständen nach Ionomycin-, Ionomycin+GI- und DMSO-Stimulation in ng/ml dar, \pm SD.

C: Übersicht aller Präzipitationen mit Concanavalin A-Sepharose der IL-6R-Chimären. Überstände wurden mittels Concanavalin A-Sepharose über Nacht unter ständiger Bewegung gefüllt und die löslichen Rezeptoren mit hIL-6R 4-11 Antikörper im Western Blot dargestellt. Die Rezeptorexpression aus den Zelllysaten wurde ebenfalls via Western Blot gemessen und zusätzlich die Ladekontrolle nach Strippen der Membran mit α - β -actin durchgeführt.

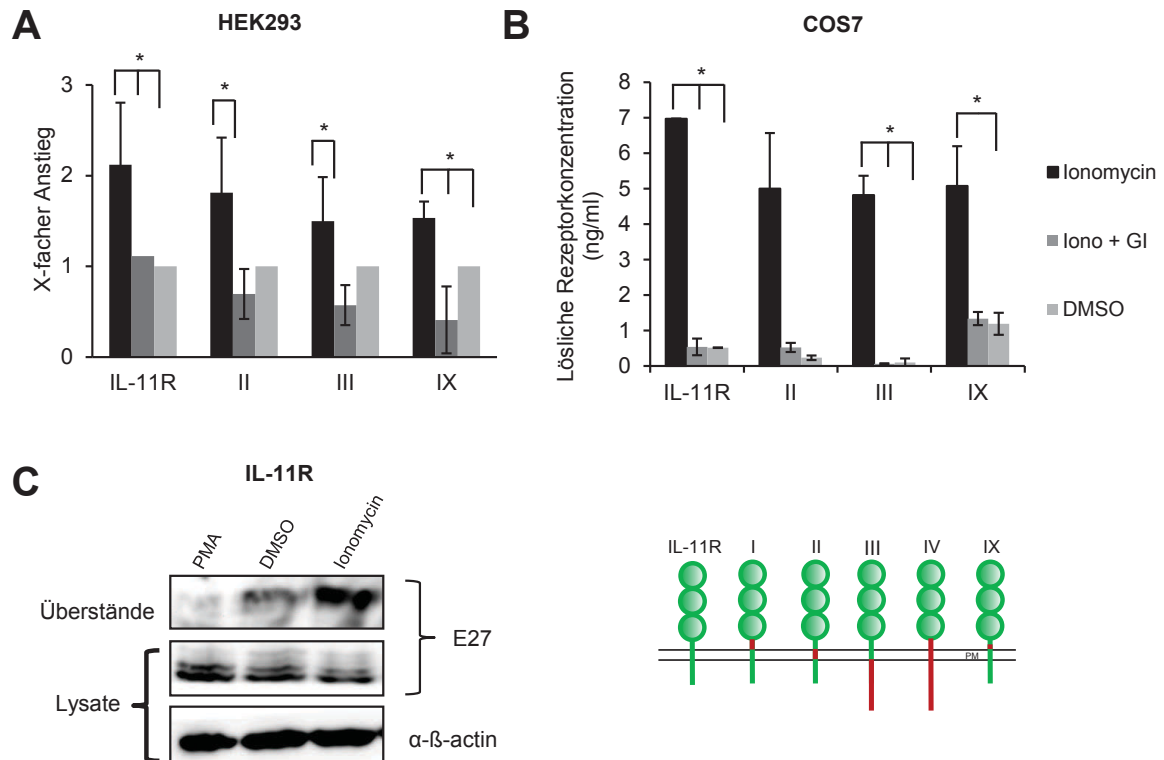


Abbildung 4.13: ADAM10 induziertes Shedding der IL-11R-Chimären. A: ELISA-Daten von mit IL-11R und dessen Varianten transfizierten HEK293-Zellen. Gezeigt ist der x-fache Anstieg der löslichen Rezeptoren in den Zellüberständen nach Ionomycin- und Ionomycin+GI-Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle mit DMSO (=1). Die Daten entsprechen den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten \pm SD.

B: Zellüberstände von COS7-Zellen ebenfalls im ELISA gemessen. Dargestellt sind die löslichen Rezeptorformen nach Ionomycin-, Ionomycin+GI- und DMSO-Stimulation in ng/ml \pm SD. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei Messungen.

C: Immunopräzipitation des IL-11R mittels Anti-myc und Protein A-Sepharose. Proben der Zellüberstände von mit IL-11R transfizierten HEK293-Zellen, die anschließend mit Ionomycin, PMA und DMSO stimuliert wurden, inkubierten über Nacht mit Anti-myc bei 4°C unter ständiger Bewegung. Nach gründlichem Waschen der Proben wurden sie mittels Protein A-Sepharose für 5 h gefällt. Die Proben wurden mit Lämmli-Puffer bei 95°C aufgekocht und auf ein Acrylamidgel aufgetragen. Die Darstellung des Rezeptors erfolgte mit E27 Ak im Western Blot. Zelllysate desselben Ansatzes dienen zur Expressions- und Ladekontrolle (nach Stippen der Membran und Detektion mit α - β -actin).

4.7 Endogener Nachweis von IL-11R und dessen Shedding

Als erstes wurde die humane Leukozytenzelllinie K562 auf endogenes IL-11R-Shedding untersucht. Aus bekannter Literatur sollte diese IL-11R auf der Zelloberfläche tragen (CHÉREL et al., 1995). Zur Untersuchung der Funktionalität und Ansprechbarkeit der Rezeptoren wurde ein P-Stat3-Assay mit Zytokinstimulation angefertigt (siehe Abbildung 4.14A). Leider konnte für diese Zelllinie nur eine sehr verhaltene Ansprechbarkeit auf IL-

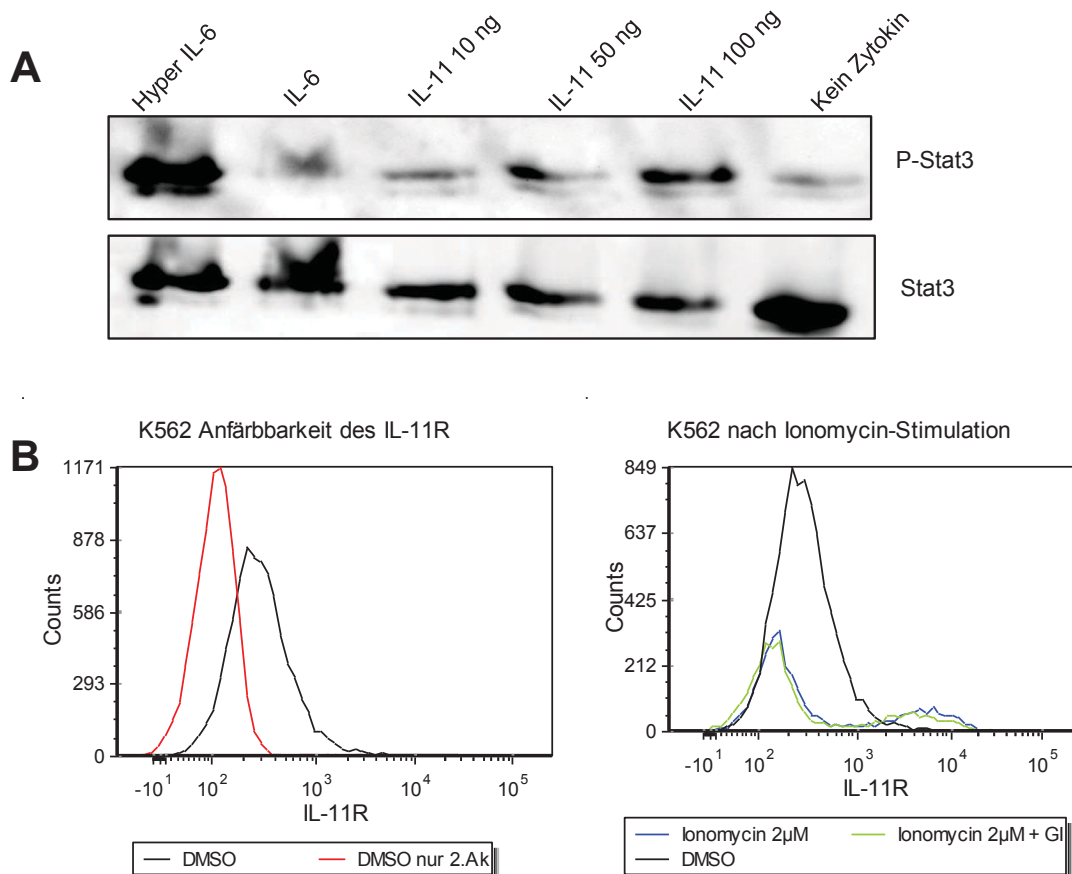


Abbildung 4.14: A: Phospho-Stat3-Assay der Leukozytenzelllinie K562. Oben ist das P-Stat3 angefärbt unten Stat3 zur Ladekontrolle. Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei Messungen.

B: FACS-Analyse des IL-11R-Sheddings nach Ionomycin- (blau), Ionomycin+GI- (grün) und DMSO-Stimulation (schwarz). Rot dargestellt ist die Negativkontrolle, bei der DMSO stimulierte Zellen nur mit zweitem Ak angefärbt sind.

11 dargestellt werden. Erst durch Stimulationen mit 100 ng/ml IL-11 lässt sich eine leichte Stat-3-Phosphorylierung feststellen.

Für K562 wurde zudem eine durchflusscytometrische Analyse durchgeführt. Zunächst wurde getestet, ob IL-11R auf der Zelloberfläche überhaupt anfärbbar ist. Abbildung 4.14B zeigt K562-Zellen mit E27-Antikörper und zweitem Antikörper (α -mouse-Fluorescein) angefärbt. Rot dargestellt ist die Färbung bei der nur der zweite Antikörper verwendet wurde. Schwarz die Zellen, an die E27 und der zweite Antikörper gebunden hat. Die schwarze Kurve ist im Vergleich zur roten nur leicht nach rechts verschoben. Es ist daher wahrscheinlich nur eine sehr geringe Rezeptordichte von IL-11R auf der Zelloberfläche zu finden. Trotzdem wurden nun auch Shedding-Experimente mit diesen Zellen durchgeführt. K562 reagierten sehr empfindlich auf Ionomycin-Stimulation und es war schwierig keine Apoptose auszulösen. Bei dieser Zelllinie war es nicht möglich, ein Shedding nach ADAM10-Aktivierung auszulösen. Die rechte Graphik der Abbildung zeigt K562-Zellen nach Stimulation mit Ionomycin (schwarz), DMSO (grün) und Ionomycin mit vorheriger GI-Gabe (rot). Es findet keine Verschiebung der Kurve statt und somit reduziert sich die angefärbte IL-11R-Dichte auf der Zelloberfläche nicht. Wie oben bereits beschrieben, könnte dies auch an nicht ausreichendem Vorhandensein von IL-11R auf der Zelloberfläche von K562-Zellen für dieses Experiment liegen.

Als zweiter Ansatz zum endogenen IL-11R-Shedding wurden humane Makrophagen untersucht. Dies geschah in Zusammenarbeit mit Katja Möller vom Biochemischen Institut der Universität Kiel. Makrophagen wurden mithilfe der Kits *Isolation of mononuclear cells from human peripheral blood by density gradient centrifugation*, *Monocyte Isolation Kit II human* und *CD14 Micro Beads human* (alle von Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) nach Herstellerprotokoll isoliert und selektiert. Die Stimulation erfolgte mit PMA (100 nM, 2 h), Ionomycin (1 μ M, 30 min), DMSO und Ionomycin mit vorheriger ADAM10-Inhibition durch GI (30 min vor Ionomycin-Gabe). Die Zellen wurden dann wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, mit 1. (E27) und 2. Antikörper (α -mouse-Fluorescein) angefärbt und in einem FACS Canto Becton Dickson GmbH, Heidelberg ausgewertet. Abbildung 4.15 A und C zeigen die über positive Selektion isolierten Makrophagen, B und D die negativ selektierten (für Erklärungen der Methode siehe 3.2.2). A und B stellen die Anfärbbarkeit des IL-11R auf der Zelloberfläche dar: Durch Zugabe des E27-Antikörpers verschiebt sich die Kurve nach rechts. PMA sollte eigentlich als Negativkontrolle dienen, um die Aktivierung weiterer Proteasen als Ursache für das IL-11R-Shedding auszuschließen. Warum hier eine Linksverschiebung der Kurve nach PMA-Stimulation zu beobachten ist, ist unklar. Da jedoch eine viel geringere Zellzahl gemessen wurde, ist nicht auszuschließen, dass die Makrophagen nach 2 h PMA-Stimulation apoptotisch werden und der 2. Antikörper unspezifisch bindet. In der Zellkultur konnte klar nachgewiesen werden dass ADAM17 nicht in der Lage ist, IL-11R zu schneiden. Abbildungen C und D zeigen das Ionomycin-Experiment. Bei positiv sowie bei negativ selektierten Zellen konnte nach

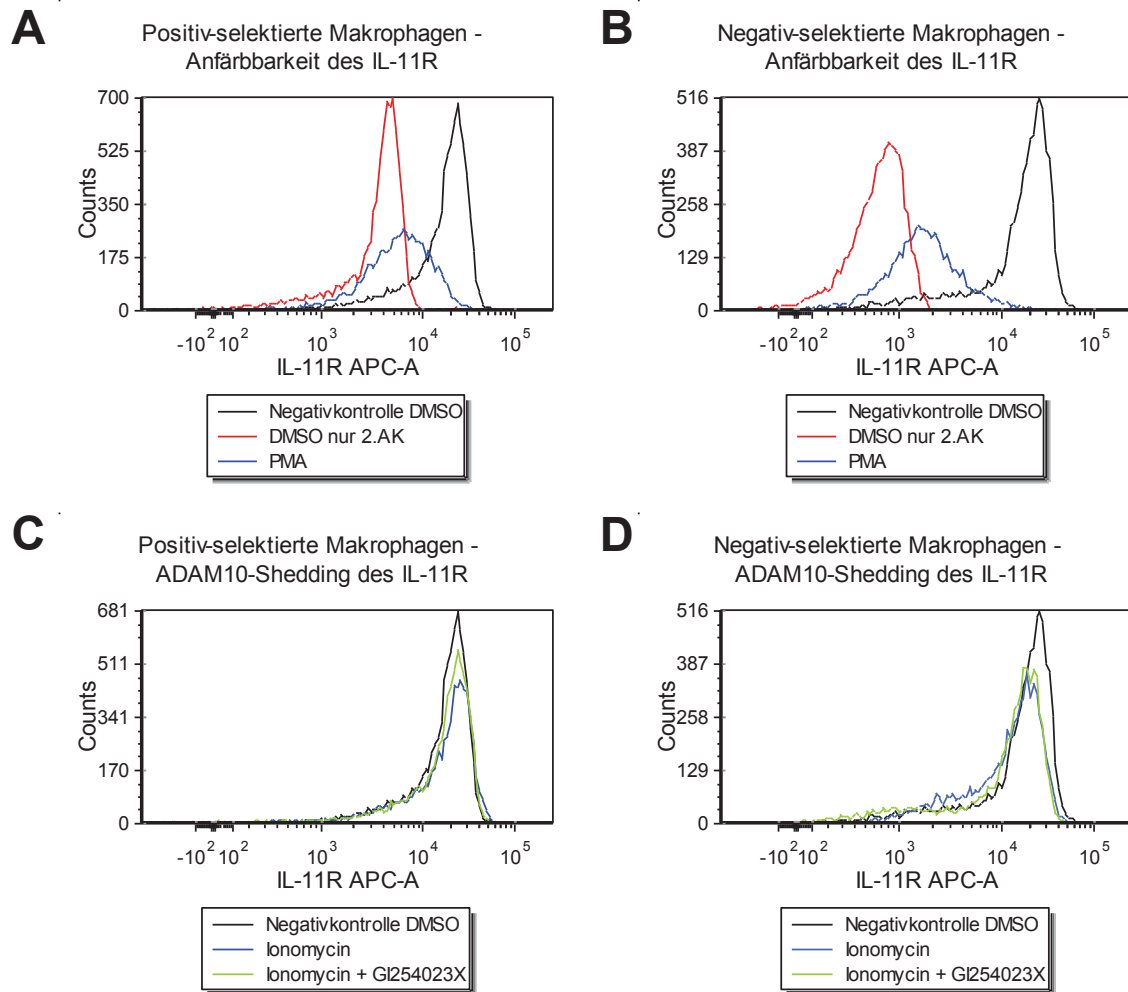


Abbildung 4.15: Analyse der Anfärbarkeit und des Sheddings von IL-11R auf der Zelloberfläche humaner Makrophagen via FACS-Analyse. A+C: Positiv selektierte Makrophagen. B+D: Negativ selektierte Makrophagen. Schwarz: DMSO stimulierte Zellen. Rot: DMSO stimulierte Zellen, aber nur mit zweitem Ak angefärbt (Darstellung unspezifischer Ak-Bindung). Blau: PMA-Stimulation/Ionomycin-Stimulation. Grün: Ionomycin+GI.

Ionomycin-Stimulation keine Reduktion der IL-11-Rezeptordichte auf den Zelloberflächen gemessen werden. Die Kurve der DMSO-, der Ionomycin-, sowie der Ionomycin- mit vorheriger GI-Stimulation liegen alle übereinander. Es wurde also kein IL-11R-Shedding durch ADAM10 auf humanen Makrophagen nachgewiesen (Ergebnisse wurden zweimal reproduziert).

Insgesamt müsste die Versuchsreihe mit humanen Makrophagen nochmals wiederholt werden, um wirklich wissen zu können, ob das ADAM10-Shedding nicht nachweisbar ist. Wie auch schon in oben genanntem Experiment war die optimale Ionomycinkonzentration und

-stimulationszeit für PBMCs nicht bekannt. Daher könnte es möglich sein, dass andere Versuchsbedingungen auch andere Ergebnisse liefern.

Als dritte endogenen IL-11R tragende Zellen wurden Rattenhepatozyten verwendet. Diese wurden von Dr. Annika Sommerfeld (Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) präpariert und angezüchtet (siehe auch Abschnitt 3.2.2). Die Hepatozyten wurden zur Verfügung gestellt, nachdem sie bereits einen halben Tag angewachsen waren.

Zunächst sollte getestet werden, ob die Hepatozyten ausreichend IL-11R auf der Zelloberfläche tragen und diese durch Zytokinstimulation auch ein Signal weiterleiten können. Dazu wurde der bereits in Abschnitt 4.4 beschriebene Phospho-Stat3-Assay verwendet. Das Williams E Medium wurde 36 h nach Präparation von den Zellen abgesaugt und durch DMEM-/- ersetzt: die Zellen wurden für ca. 5 h ohne Serum 'gehungert'. Dann wurden die Zellen mit Zytokin stimuliert: 10 ng/ml IL-6, 10, 50 und 100 ng/ml IL-11 und 10 ng/ml Hyper IL-6 als Positivkontrolle. In den Versuchen zeigte sich, dass eher höhere Konzentrationen von Zytokin notwendig waren, um einen messbaren Effekt zu erzeugen (Abbildung 4.16A, daher auch keine Stat3-Phosphorylierung durch 10 ng/ml IL-6).

Es konnte aber eine P-Stat3-Aktivierung nach 50-100 ng/ml IL-11 gemessen werden. Das bedeutet, dass die Hepatozyten IL-11R in ausreichender Menge auf der Zelloberfläche tragen und durch menschliches IL-11 aktiviert werden können.

Der nächste Schritt bestand darin, nachzuweisen ob nach ADAM10-Aktivierung ein Shedding des IL-11R auf den Rattenhepatozyten beobachtet werden kann. Dazu wurden die Hepatozyten wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben mit Ionomycin, DMSO und Ionomycin mit zusätzlichem ADAM10-Inhibitor stimuliert. Nach der Stimulationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 10 min mit dem Enzymgemisch Accutase inkubiert, um sie schonend von der Zellkulturschale abzulösen. Die Accutase wurde durch milde Zentrifugation bei 300 g von den Zellen getrennt und diese wurden in FACS-Puffer resuspendiert. Danach folgte die erste Färbung mit dem E27-Antikörper, da dessen Bindemotiv in einem Bereich des Rezeptors liegt, der zwischen Mensch und Ratte stark konserviert ist (siehe Alignment im Anhang: 6.2). Nach der Inkubationszeit wurde der erste Antikörper durch Zugabe des fluoreszierenden Antikörpers α -mouse-Fluorescein angefärbt. Als Negativkontrolle wurden einige Proben auch nur mit dem zweiten Antikörper angefärbt, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Nach der Färbung wurden die Antikörper mit FACS-Puffer abgewaschen und in spezielle Röhrchen überführt. Die Fluoreszenz wurde mit dem FACS CantoII der Firma Becton Dickson GmbH, Heidelberg gemessen. Es stellte sich als schwierig dar, diese Methode zu etablieren, da einerseits die notwendige Menge Ionomycin zur ADAM10-Aktivierung eingesetzt werden musste, ohne dass die Zellen aber in Apoptose übergehen. Diese Schwierigkeit versuchten wir durch verschiedene Konzentrationen und Inkubationszeiten zu lösen. Andererseits war die Antikörperkonzentration ein Problem, da nicht bekannt war wie viel benötigt würde um eine vernünftige Färbung

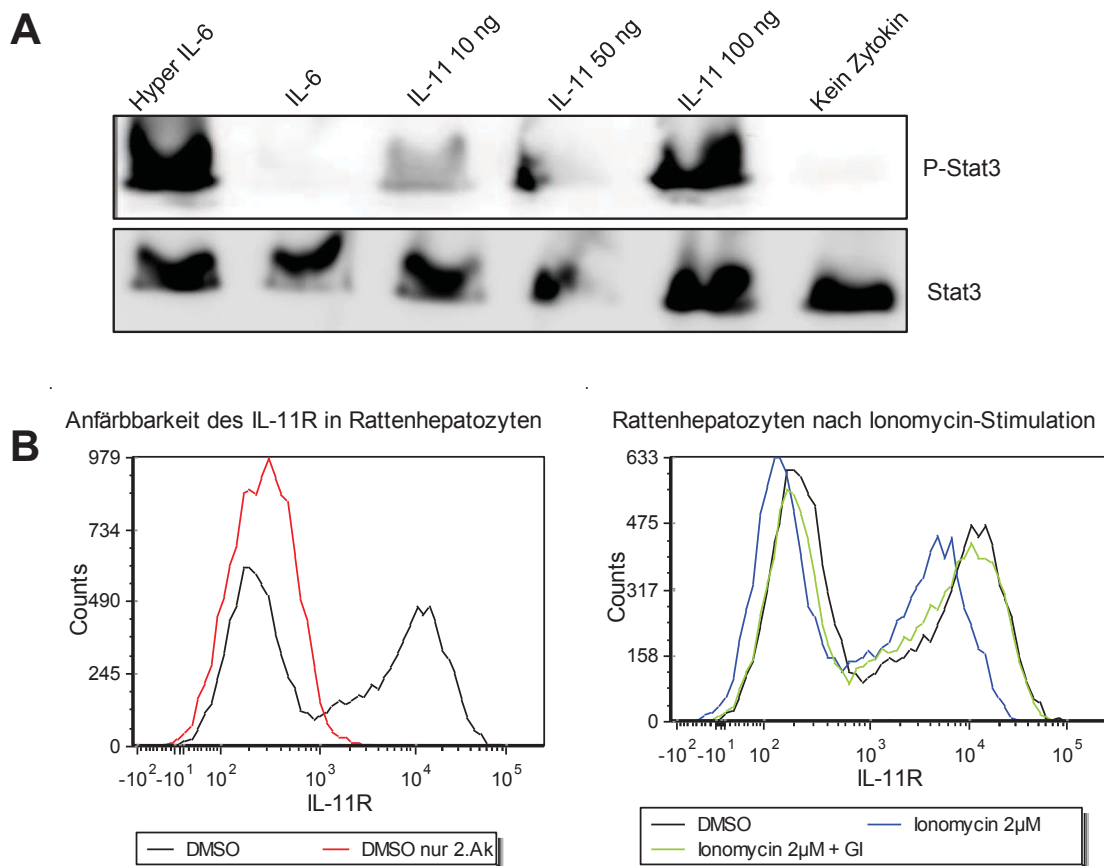


Abbildung 4.16: A: Phospho-Stat3-Assay von Hepatozyten aus der Ratte. Oben ist das P-Stat3 angefärbt unten Stat3 zur Ladekontrolle. Die Messung ist repräsentativ für zwei Messungen.

B: FACS-Messung des IL-11R auf der Zelloberfläche von Hepatozyten aus der Ratte nach Ionomycin Stimulation (blau). Ebenfalls dargestellt ist die Rezeptordichte nach DMSO (schwarz) und Ionomycin und GI-Stimulation (grün). Die rote Kurve stellt die unspezifische Bindung durch den zweiten Antikörper dar.

zu erzeugen und die Antikörper nicht ausreichend zur Verfügung standen. Es wird daher nur eine nicht repräsentative Messung gezeigt, die aber tatsächlich den Erwartungen entspricht (Abbildung 4.16B). Auf der X-Achse ist die IL-11R-Dichte auf der Zelloberfläche im FITC-A-Kanal dargestellt. Die Y-Achse stellt die Gesamtzellzahl dar. Die rote Kurve zeigt die unspezifische Bindung des zweiten Antikörpers, was somit für alle Stimulationsansätze des linken Schenkels der zweigipfligen Kurve gilt. Die schwarze Kurve ist die Negativkontrolle mit DMSO. Blau dargestellt ist der Stimulationsansatz mit Ionomycin

(2 μ M, 1 h), die grüne Kurve zeigt Ionomycin mit vorheriger ADAM10-Inhibition durch GI. Zu sehen ist, dass die Zellen nach Ionomycin-Stimulation 5-6 $\times 10^3$ weniger IL-11R auf der Zelloberfläche tragen, als nach DMSO-Stimulation oder nach Hemmung der ADAM10-Protease (Verschiebung der Kurve nach links). Da dieser Effekt durch GI-Einsatz verhindert werden kann, muss er auf ADAM10 zurückgeführt werden. Wir vermuten, dass ein IL-11R-Shedding auf Rattenhepatozyten durch ADAM10 stattfindet. Allerdings müssen diese Daten noch einmal reproduziert werden, um die Aussagekraft dieser Einzelmessung zu verstärken.

4.8 Trans-Signaling des IL-11R in Ba/F3gp130 Zellen

Um ein mögliches Trans-Signaling des IL-11R zu testen wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit löslichem hIL-11R (shIL-11R) und IL-11 stimuliert. Als Messinstrument wurde der Proliferationsassay verwendet.

Nun sollte bei den Zellen durch alleinige Stimulation mit löslichem hIL-11R und IL-11 Wachstum stattfinden. Es wurde mit sehr hohen Konzentrationen shIL-11R der Firma R&D Systems stimuliert. Der Ansatz, shIL-11R aus Zellüberständen Ionomycin-stimulierter Zellen für diesen Versuch zu verwenden, wurde verlassen, da die Konzentrationen des daraus gewonnenen löslichen Rezeptors zu gering waren (durchschnittlich 3 ng/ml). Zusätzlich wurde geprüft, ob ein messbarer Effekt mittels Zugabe von löslichem gp130 (sgp130) gehemmt werden kann. Stimuliert wurde in einer 96-well-Platte mit 100 μ l Medium. Vom besser erforschten IL-6R-Trans-Signaling war bekannt, dass sgp130 den IL-6R/IL-6-Komplex vor Bindung an zellmembrangebundenes gp130 abfangen kann und so den Trans-Signalweg inhibiert (ROSE-JOHN et al., 2006).

In Abbildung 4.17 ist dieser Versuch zu sehen. Die Positivkontrolle mit Hyper IL-6 (1) führt zu Zellwachstum. Alleinige Stimulation mit IL-6 (2), IL-11 (3) oder shIL-11R (5) hat keinen Effekt auf die Proliferation der Zellen, ebenso wenn kein Zytokin zu den Zellen gegeben wird (4). Wird shIL-11R aber mit IL-11 zusammen zu den Zellen gegeben, findet Zellwachstum statt (6+7). Dies ist abhängig von der Menge an löslichem Rezeptor und weniger von der Zytokinkonzentration. Bei gleichzeitiger Zugabe von sgp130 kann das Trans-Signaling gehemmt werden (8-10). Es zeigt sich also, dass der Komplex aus IL-11R und IL-11 analog zum IL-6R-Trans-Signaling andere Zellen erregen kann. Diese Wirkung wird durch Abfangen des Komplexes durch lösliches gp130 inhibiert.

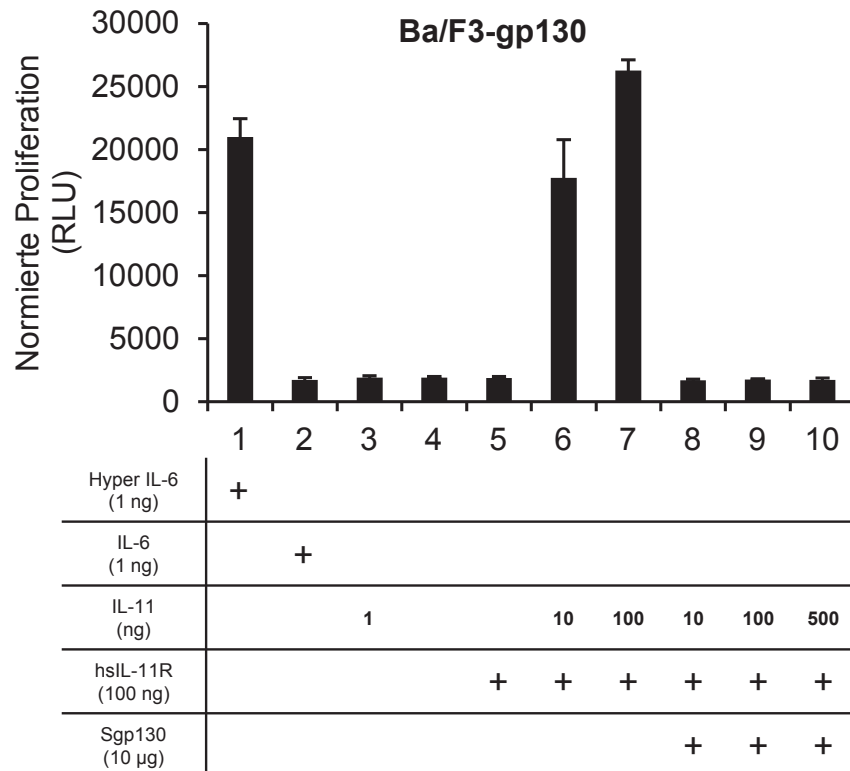


Abbildung 4.17: Transsignaling des IL-11R in Ba/F3-gp130-Zellen im Proliferationsassay. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen \pm SD.

4.9 Glykosylierung von IL-11R und IL-6R

Um die Nachweisbarkeit des IL-11R via Concanavalin A Sepharose zu überprüfen wurde die Glykosylierung des IL-11R im Vergleich mit dem IL-6R getestet. Es zeigte sich, dass der IL-11R im Vergleich zum IL-6R kaum glykosyliert ist.

Wie in Abschnitt 4.6 bereits angesprochen, war es nicht möglich für den IL-11R und die Chimären II und III eine Präzipitation mittels Concanavalin A-Sepharose durchzuführen. Für den IL-6R war dessen ausgeprägte Glykosylierung bekannt, die sich auch im Stalk-Bereich befindet (MÜLLBERG et al., 1994). Für den IL-11R fehlten diesbezüglich Informationen aus vorheriger Forschung.

Um die Glykosylierung des IL-11R zu untersuchen und damit auch festzustellen, ob die Präzipitation mittels Concanavalin A-Sepharose überhaupt möglich ist, wurde ein Deglykosylierungskit (*Enzymatic Protein Deglycosylation Kit (EDEGLY)*) von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim bezogen.

Das Enzym PNGaseF schneidet besonders N-Glykosylierungsseitenketten von Proteinen ab. Glykosylierter und deglykosylierter IL-6R und IL-11R wurden dann nebeneinander im

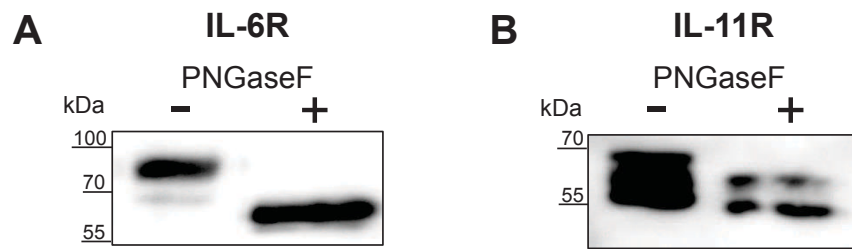


Abbildung 4.18: Proteinmasse von IL-6R (A) und IL-11R (B) ohne und mit Deglykosylierung durch PNGaseF.

Western Blot aufgetragen und mittels spezifischer Antikörper detektiert (Abbildung 4.18 A und B).

Der IL-6R verliert deutlich an Masse (fast 20 kDa), wenn er nicht mehr glykosyliert ist. Der IL-11R hat deglykosyliert fast dieselbe Größe wie glykosyliert. Daraus ist zu schließen, dass er im Gegensatz zum IL-6R kaum glykosyliert ist. Daher ist eine Detektion mittels Concanavalin A-Sepharose auch nicht möglich.

5 Diskussion

IL-6 und IL-11 spielen eine wichtige Rolle bei Reaktionen des Immunsystems im menschlichen Körper. Aufschlüsse über dessen Signalwege sind daher von großer Bedeutung für das Verständnis von Erkrankungen wie chronischen Entzündungen oder Tumorentstehung. IL-6 und IL-11 haben beide den klassischen Signalweg gemein. Dabei binden die Zytokine an ihre Alpha-Rezeptoren IL-6R oder IL-11R und es werden zusätzlich zwei Moleküle gp130 benötigt, um die Signaltransduktion stattfinden zu lassen. Für IL-6 ist auch ein Trans-Signalweg bekannt. Hier entsteht ein löslicher IL-6R einerseits durch alternatives Splicing der mRNA (10%, HORIUCHI et al., 1994) oder durch proteolytische Spaltung (90%, MÜLLBERG et al., 1993a), auch als *Shedding* bezeichnet. Der lösliche IL-6R kann freies IL-6 binden und durch Bindung an gp130 alle Körperzellen erregen, da gp130 ubiquitär exprimiert wird. Die Proteasen, die IL-6R spalten, stammen aus der Familie der ADAM-Proteasen (*A Disintegrin And Metalloprotease*): ADAM10 und ADAM17. Für den IL-11R ist bisher kein (durch ADAM17 induzierter) Trans-Signalweg beschrieben, obwohl er dem IL-6R in Struktur und Signal sehr ähnlich ist. Zusätzlich wird vermutet, dass für ADAM17 auch die Struktur des Substrats für das Shedding wichtig ist, denn in allen Substraten von ADAM17 konnte bis jetzt keine Konsensussequenz der Schnittstelle festgestellt werden (CAESCU et al., 2009). Diese Arbeit befasste sich mit der Frage, welcher Teil des IL-6R nun bedeutend für das ADAM17 induzierte Shedding ist und warum der IL-11R nicht von ihr geschnitten wird. Zusätzlich sollten weitere Proteasen für ein eventuelles Shedding des IL-11R gesucht werden. Dritter und vierter Punkt waren die Entwicklung eines IL-6R, der nicht mehr von ADAM17 geschnitten werden kann und ein IL-11R, bei dem dies geschieht.

5.1 IL-6R- und IL-11R-Shedding *in vitro*

Für die Umsetzung oben genannter Arbeitsziele wurde zunächst das Sheddingverhalten der beiden Proteasen ADAM10 und ADAM17 für den IL-6R und IL-11R untersucht. Wie schon aus früheren Arbeiten bekannt, konnte der IL-6R nach ADAM10- und ADAM17-Aktivierung geschnitten werden. Der IL-11R wurde wie vermutet nach ADAM17-Aktivierung nicht geschnitten, erstaunlicherweise jedoch nach ADAM10-Stimulation. Zum ersten Mal konnte so ein Shedding für den IL-11R nachgewiesen werden, von

dem bisher angenommen wurde, er sei gar nicht prozessierbar. Zur weiteren Eingrenzung der Schnittstellen wurden zehn Rezeptorchimären aus IL-6R und IL-11R generiert. Teile der Stalk-, der Transmembran- und der intrazellulären Domäne waren einzeln oder alle zusammen gegen die des jeweils anderen Rezeptors ausgetauscht. Bei zwei Varianten (Chimäre IX und X) waren nur zehn Aminosäuren der Stalk-Region vor der Transmembrandomäne ausgetauscht. Aus vorherigen Arbeiten war schon bekannt, dass extrazelluläre Teile für die Bindung der Proteasen bedeutsam sind (MÜLLBERG et al., 1994; GARBERS et al., 2011b). Die Chimären mit ausgetauschter Transmembran- oder intrazellulärer Domäne wurden aber als Kontrolle und Sicherheit mitentwickelt, um Ergebnisse sicher eingrenzen zu können.

Um das Shedding der Chimären zu untersuchen, wurden HEK293- und COS7-Zellen mit den Wild-Typ-Rezeptoren und dessen Varianten transfiziert und die Proteasen mit Stimulatoren aktiviert (ADAM17: PMA, ADAM10: Ionomycin). Die Zellüberstände wurden mithilfe spezifischer ELISAs oder durch Fällung durch Concanavalin A Sepharose auf lösliche Rezeptorformen untersucht.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass für den IL-6R-Trans-Signalweg und das Shedding durch ADAM17 besonders die Stalk-Region entscheidend ist. Genauer eingegrenzt werden konnte dieser Bereich auf die jeweils fünf Aminosäuren ober- und unterhalb der ADAM17-Schnittstelle der Stalk-Region. Sind diese gegen den Stalk (oder die letzten zehn Aminosäuren des Stalks) des IL-11R ausgetauscht, findet keine Prozessierung des IL-6R durch ADAM17 statt. Daher konnte gezeigt werden, dass der Wildtyp-IL-11R wegen seiner Stalk-Region nicht von ADAM17 geschnitten wird. Dies eröffnet Möglichkeiten die Bedeutung des Trans-Signalwegs *in vivo* genauer zu untersuchen:

Durch Chimäre V und X (IL-6R-Chimären mit Stalk-Region des IL-11R) könnte der IL-6R ausgetauscht werden und es könnte nur noch der klassische Signalweg stattfinden. Welche Auswirkungen hätte das für die Effektivität des Immunsystems und entstünden dadurch Fehler? Weiterhin ist auch nicht klar, unter welchen Bedingungen ADAM10 *in vivo* aktiviert wird und ob Chimäre V und X daher als Modell des ausgeschalteten Trans-Signalwegs unbrauchbar sind, da sie noch von ADAM10 geschnitten werden.

Für den IL-11R gilt umgekehrt: Durch Entwicklung von Chimäre I und IX (IL-11R-Chimären mit Stalk-Region des IL-6R) entsteht ein durch ADAM17 prozessierbarer IL-11R, dessen Bedeutung *in vivo* unbekannt ist. Wie oben schon erwähnt wurde zudem eine Protease identifiziert, die humanen Wild-Typ IL-11R induziert schneidet: ADAM10. Nach Aktivierung durch Ionomycin konnte ein Shedding nachgewiesen werden, lösliche IL-11R-Formen aller IL-11R-Varianten wurden in den Zellüberständen detektiert. Auch alle IL-6R-Varianten wurden von ADAM10 geschnitten. ADAM10 prozessiert nach Aktivierung IL-6R und IL-11R, hat also sehr wahrscheinlich andere Substraterkennungsstellen als ADAM17. Bisher ist allerdings unklar unter welchen physiologischen Bedingungen ADAM10 aktiviert wird und ob *in vivo* lösliche IL-11R-Formen entstehen (und damit im

Blut messbar wären).

Leider war dieser Effekt des ADAM10-Sheddings nicht bei allen Chimären gleichermaßen stark ausgeprägt. Chimäre V zeigte beispielsweise nur einen sehr verhaltenen Anstieg des löslichen Rezeptors in den Zellüberständen. Eine Erklärung hierfür wäre dass Chimären keine natürlich vorkommenden Proteine sind und keine 1:1 übertragbaren Reaktionen im Vergleich zu Wild-Typ-Rezeptoren auslösen. Zudem konnten nicht alle Chimären mittels Concanavalin A Sepharose präzipitiert werden. Dies lag an der wenig ausgeprägten Glykosylierung des IL-11Rs und der Chimären, die nicht den Stalk-Bereich des IL-6R enthalten. Der Versuch, IL-11R mittels Immunopräzipitation über den N-terminalen myc-Tag zu präzipitieren, erhärtete jedoch die Annahme, dass es möglich ist auch auf diesem Wege ein Shedding des IL-11R nachzuweisen. Die ELISA-Daten zeigen jedenfalls eindeutig, dass Shedding stattfindet und das sogar in zwei verschiedenen Zelllinien (HEK293 und COS7). Ein weiterer Ansatz zur Präzipitation löslicher IL-11R Varianten aus den Zellüberständen wäre, ein Molekül IL-11 mit einem Fc-Teil zu versehen, um so löslichen IL-11R aus den Zellüberständen nach Bindung an IL-11-Fc zu fällen.

5.2 Endogenes IL-11R-Shedding

Da das Shedding im Allgemeinen und besonders durch ADAM10 für den IL-11R bisher unbekannt war, sollte auch das Shedding für endogen-vorkommenden IL-11R durch ADAM10 untersucht werden.

Dafür wurden die Leukozytontumorzelllinie K562, humane Makrophagen und Hepatozyten der Ratte via Durchflusszytometrie untersucht. Gefärbt wurde hierfür mit zwei Antikörpern: 1. Antikörper zur Bindung an IL-11R auf der Zelloberfläche (E27) und 2. Antikörper mit Fluorescein gekoppelt, der an den 1. Antikörper bindet. Gemessen wurde dann die Menge fluoreszierender Zellen als quantitativer Nachweis für die IL-11R-Dichte auf der Zelloberfläche.

Vor allem lag die Schwierigkeit darin, passende Ionomycinkonzentrationen und -stimulationszeiten zu etablieren. Einerseits musste es genug sein, um ADAM10 zu induzieren, andererseits nicht zu viel, da die Zellen ansonsten durch Calciumeinstrom apoptotisch werden.

Der Versuch mit den Rattenhepatozyten konnte so nur einmal vollständig durchgeführt werden. Es konnte eine deutliche Verschiebung der Kurve und damit Abnahme der IL-11R-Dichte auf der Zelloberfläche nach Ionomycinstimulation festgestellt werden. Nach vorheriger Hemmung von ADAM10 durch GI war dieser Effekt nicht beobachtbar. GI hemmt sehr spezifisch nur ADAM10, daher muss der Effekt der Verschiebung der Kurve auf eine ADAM10-Aktivierung zurückgeführt werden. Natürlich müssen die Versuche wiederholt werden, aber dies gibt uns schon einen deutlichen Hinweis, dass auch der endogene

IL-11R geshedded wird.

Die Leukämiezelllinie K562 eignete sich nicht sehr gut für unsere Experimentenreihe. Zwar war ein Vorhandensein von IL-11R auf deren Zelloberfläche in der Literatur beschrieben (CHÉREL et al., 1995), es konnten aber keine befriedigende Anfärbung von IL-11R durchgeführt werden, sodass angenommen werden musste, dass für unsere Versuche zu wenig IL-11R auf dieser Zelllinie zu finden ist.

Bei den humanen Makrophagen war ebenfalls ungewiss welche Konzentrationen zu verwenden sind und wie lange die Zellen stimuliert werden müssen. Zudem konnten die Versuche in Kooperation mit dem Biochemischen Institut Kiel nur an zwei Tagen durchgeführt werden, was die Verfügbarkeit der Zellen natürlich enorm eingrenzte. Wir vermuten, dass auch hier ein Shedding zu beobachten ist, denn IL-11R auf den humanen Makrophagen war gut und zahlreich anfärbbar.

Interessant wäre zu erfahren welchen Effekt ein IL-11R-Shedding hat und welche Funktion einem IL-11R-Trans-Signalweg *in vivo* zugute kommt. Nun ist Ionomycin auch kein im Körper vorkommender natürlicher Stimulus und es gilt, weitere ADAM10 induzierende Stoffe zu identifizieren, die für das IL-11R-Shedding in Frage kämen. Auch könnten noch andere Proteasen existieren, die den IL-11R schneiden. Schon allein die Tatsache, dass hingegen aller bisherigen Vermutungen ein Shedding des IL-11R bewiesen werden konnte, muss weitere Anstrengungen auf die Identifizierung eines *in vivo*-Signalwegs nach sich ziehen. Die Ansätze dieser Arbeit lassen schon vermuten, dass auch *in vivo* Shedding stattfindet.

5.3 Der IL-11R-Trans-Signalweg und Hemmung durch sgp130Fc

Diese Arbeit konnte zudem zeigen, dass ein möglicher Trans-Signalweg des IL-11R durch Bindung des IL-11R/IL-11-Komplexes an sgp130-Fc gehemmt werden kann.

Ba/F3-gp130-Zellen wurden mit Zytokinen, IL-11/IL-11R-Komplexen und zusätzlich mit löslichem gp130-Fc (sgp130-Fc, ROSE-JOHN et al., 2006) stimuliert. Gemessen wurde die Zellproliferation und die Phospho-Stat3-Aktivierung der Zellen. Es zeigte sich, dass IL-11/IL-11R-Komplexe mit hohen IL-11R-Konzentrationen in der Lage sind, Ba/F3-gp130-Zellen zu aktivieren. Dies wurde auch schon beschrieben in PFLANZ et al., 1999. Der Versuch, eine Aktivierung mittels den Zellüberständen Ionomycin-stimulierter Zellen zu erzeugen, schlug fehl. Das lag wahrscheinlich an zu niedrigen Konzentrationen des IL-11R in den Zellüberständen, trotz Überexpression des Rezeptors. Zusätzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass der Komplex aus IL-11 und IL-11R nicht mehr zur Aktivierung der Ba/F3-gp130-Zellen fähig ist, wenn er mit sgp130-Fc zusammen zu den Zellen gegeben wird. Sgp130-Fc fängt den IL-11/IL-11R-Komplex vor Bindung an die membranständigen

gp130-Moleküle ab. Dies zeigt parallel zum IL-6R-Trans-Signalweg therapeutische Möglichkeiten auf. Der IL-6/IL-6R-Komplex bindet ebenfalls an ein gp130-Homodimer zur Signaltransduktion und kann durch sgp130 gehemmt werden, sodass kein Trans-Signaling mehr stattfinden kann.

Falls *in vivo* tatsächlich kein IL-11R-Trans-Signalweg existieren sollte, stellt sich die Frage, warum dies so ist und warum IL-11 im Gegensatz zum IL-6 nur mit dem klassischen Signalweg auskommt. Dies würde zudem weitere Aufschlüsse über IL-6 geben, da sich dann evolutionär ein Trans-Signalweg im Gegensatz zum IL-11 als vorteilhaft erwiesen hätte. Umgekehrt würde aber das Vorhandensein eines Trans-Signalweg des IL-11R die Frage aufwerfen, welche Bedeutung ihm zukommt und ob dessen Reaktionen, ähnlich dem IL-6, vor allem bei pathologischen Entzündungsreaktionen aktiviert werden.

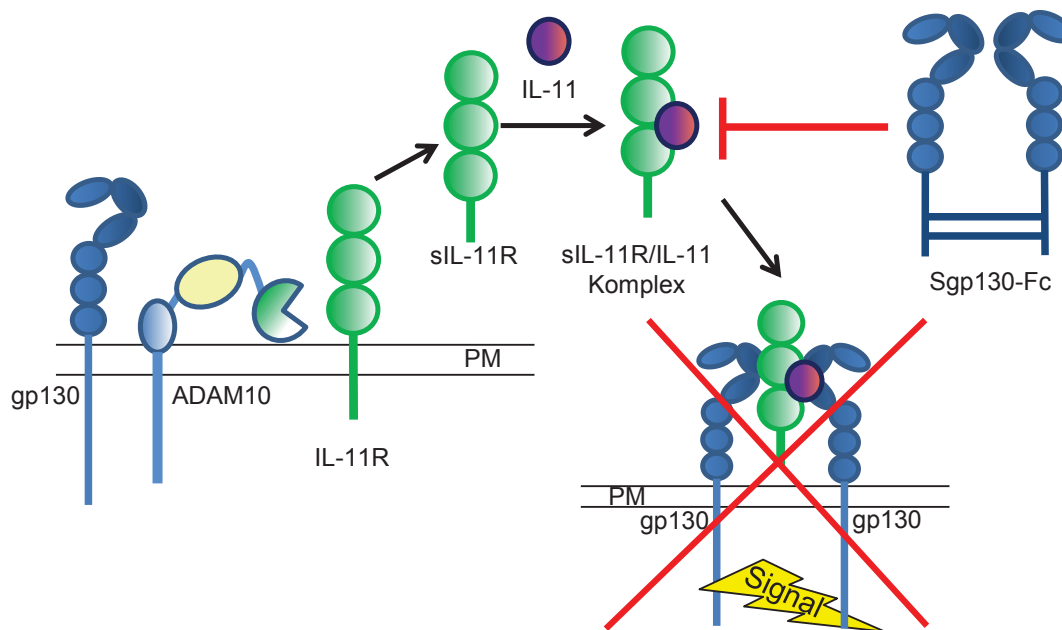


Abbildung 5.1: Hemmung des IL-11/IL-11R-Komplexes durch sgp130-Fc.

5.4 Ausblick

Für die Zukunft ergeben sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit fünf Punkte, die als Ansätze für weitergehende Experimente oder Ergänzungen zu nennen sind: Erster Punkt ist die Vervollständigung der Daten dieser Arbeit bezüglich des *in vitro* IL-11R-Sheddings durch ADAM10. Das oben bereits erwähnte IL-11-Fc-Molekül ist bereits in Arbeit und soll es möglich machen, lösliche Rezeptorformen von IL-11R, Chimäre II und III aus Zellüberständen zu präzipitieren. Eine andere Möglichkeit wäre die Generierung weite-

rer Antikörper die für einen ELISA benutzt werden können, der alle IL-11R-Chimären detektiert.

Zweitens sind die erzeugten Rezeptorchimären des IL-6R mit Stalk-Region des IL-11R (Chimäre V und X) ein guter Ansatz für eine IL-6-Trans-Signaling *Knock-Out*-Maus. Bisherige Versuche das IL-6R-Shedding durch *Knock-Out* von ADAM17 zu unterbinden, schlugen fehl, da diese Mäuse schon als Embryonen versterben. Zusätzlich existiert in der Maus im Gegensatz zum Menschen nur ein Trans-Signalweg über proteolytische Spaltung und es findet kein alternatives Splicing für den IL-6R statt (GARBERS et al., 2011b). Durch Veränderung des IL-6R kann so der Trans-Signalweg ausgeschaltet werden, ohne die Hauptsheddase von IL-6R (ADAM17) oder den klassischen Signalweg zu stören. Wären diese Mäuse dann weniger anfällig für chronische Entzündung und/oder entstehen ihnen irgendwelche Nachteile in Reaktionen der Immunabwehr? Bisher wurde der Trans-Signalweg vor allem für pathophysiologische Entzündungsreaktionen verantwortlich gemacht, während der klassische Signalweg eher regenerative Effekte besitzt (GARBERS et al., 2012).

In einem Tuberkulose-Modell konnte Anfang 2012 gezeigt werden, dass die Hemmung des IL-6-Trans-Signalwegs durch sgp130Fc zu keiner reduzierten Immunreaktion führt und diese Mäuse-Kohorte auch weniger für Tuberkuloseerreger anfällig war, als die Kohorte mit TNF- α -Blockierung (SODENKAMP et al., 2012). Hier wird eben dieser neue therapeutische Ansatz deutlich, indem der Trans-Signalweg gehemmt wird, aber der klassische Signalweg noch funktioniert. Für die Therapie der rheumatoiden Arthritis wäre das ein großer Fortschritt, denn seit langem ist bekannt, dass Patienten unter Therapie mit TNF- α -Blockern oder dem IL-6R-Antagonisten Tocilizumab (der den klassischen und Trans-Signalweg hemmt) öfter an Tuberkulose erkranken als die gesunde Allgemeinbevölkerung. Für die hier beschriebenen, durch ADAM17 nicht mehr schneidbare Rezeptorchimären V und X, müsste jedoch vorher geklärt werden, ob und unter welchen Bedingungen ADAM10 *in vivo* aktiviert wird, so dass die umgewandelten IL-6R nicht doch noch durch ADAM10 geschnitten werden und trotzdem Trans-Signaling stattfindet. Dann müsste versucht werden, den IL-6R durch Mutation oder Deletion in der Stalk-Region für alle Proteasen unzugänglich zu machen.

Als dritter Punkt wäre die Verbesserung eines endogenen IL-11R-Shedding-Nachweises zu nennen. Die bisherigen Methoden müssen weitergeführt, wiederholt und verbessert werden, um ein stattfindendes Shedding zu beweisen.

Neue Studien, die den IL-11R als Target z.B. in der Therapie von Leukämie und Prostatakarzinomen einsetzen (KARJALAINEN et al., 2015, PASQUALINI et al., 2015), könnten so auch hinsichtlich einer Störung durch mögliche lösliche IL-11R-Formen betrachtet werden. Viertens sollten natürliche Stimuli für ADAM10 gesucht werden, die ein IL-11R-Shedding induzieren und damit einen physiologischen IL-11R-Trans-Signalweg auslösen.

Fünfter und letzter Punkt wäre die Untersuchung menschlichen Blutes auf das Vorkom-

men löslichen IL-11R. Dies würde über die Bedeutung des IL-11R Trans-Signalwegs *in vivo* weitere Aufschlüsse geben.

Literaturverzeichnis

- ALFA CISSÉ, M., SUNYACH, C., SLACK, B. E., FISHER, A., VINCENT, B. und CHECLER, F. (2007): M1 and M3 muscarinic receptors control physiological processing of cellular prion by modulating ADAM17 phosphorylation and activity. *J Neurosci* 27, Nr. 15, 4083–4092.
- ALI, N. und KNAÜPER, V. (2007): Phorbol ester-induced shedding of the prostate cancer marker transmembrane protein with epidermal growth factor and two follistatin motifs 2 is mediated by the disintegrin and metalloproteinase-17. *J Biol Chem* 282, Nr. 52, 37378–37388.
- ALLINSON, T. M. J., PARKIN, E. T., TURNER, A. J. und HOOPER, N. M. (2003): ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74, Nr. 3, 342–352.
- ALTHOFF, K., REDDY, P., VOLTZ, N., ROSE-JOHN, S. und MÜLLBERG, J. (2000): Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur J Biochem* 267, Nr. 9, 2624–2631.
- ATAPATTU, L., SAHA, N., LLERENA, C., VAIL, M. E., SCOTT, A. M., NIKOLOV, D. B., LACKMANN, M. und JANES, P. W. (2012): Antibodies binding the ADAM10 substrate recognition domain inhibit Eph function. *J Cell Sci* 125, Nr. Pt 24, 6084–6093.
- BARTON, V. A., HALL, M. A., HUDSON, K. R. und HEATH, J. K. (2000): Interleukin-11 signals through the formation of a hexameric receptor complex. *J Biol Chem* 275, Nr. 46, 36197–36203.
- BECH-SERRA, J. J., SANTIAGO-JOSEFAT, B., ESSELENS, C., SAFTIG, P., BASELGA, J., ARRIBAS, J. und CANALS, F. (2006): Proteomic identification of desmoglein 2 and activated leukocyte cell adhesion molecule as substrates of ADAM17 and ADAM10 by difference gel electrophoresis. *Mol Cell Biol* 26, Nr. 13, 5086–5095.
- BENDER, M., HOFMANN, S., STEGNER, D., CHALARIS, A., BÖSL, M., BRAUN, A., SCHELLER, J., ROSE-JOHN, S. und NIESWANDT, B. (2010): Differentially regulated

- GPVI ectodomain shedding by multiple platelet-expressed proteinases. *Blood* 116, Nr. 17, 3347–3355.
- BENDTZEN, K. (1988): Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunol Lett* 19, Nr. 3, 183–191.
- BERGMEIER, W., PIFFATH, C. L., CHENG, G., DOLE, V. S., ZHANG, Y., VON ANDRIAN, U. H. und WAGNER, D. D. (2004): Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates GPIIb/IIIa shedding from platelets in vitro and in vivo. *Circ Res* 95, Nr. 7, 677–683.
- BERTANI, G. (1951): A Method for Detection of Mutations, Using Streptomycin Dependence in *Escherichia Coli*. *Genetics* 36, Nr. 6, 598–611.
- BLACK, R. A. et al. (1997): A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, Nr. 6618, 729–733.
- BLANC, C. et al. (2000): Monoclonal antibodies against the human interleukin-11 receptor alpha-chain (IL-11Ralpha) and their use in studies of human mononuclear cells. *J Immunol Methods* 241, Nr. 1-2, 43–59.
- BLUME, K. E., SOEROES, S., KEPPELER, H., STEVANOVIC, S., KRETSCHMER, D., RAUTENBERG, M., WESSELBORG, S. und LAUBER, K. (2012): Cleavage of annexin A1 by ADAM10 during secondary necrosis generates a monocytic "find-me" signal. *J Immunol* 188, Nr. 1, 135–145.
- BOUILLOT, S., TILLET, E., CARMONA, G., PRANDINI, M.-H., GAUCHEZ, A.-S., HOFFMANN, P., ALFAIDY, N., CAND, F. und HUBER, P. (2011): Protocadherin-12 cleavage is a regulated process mediated by ADAM10 protein: evidence of shedding up-regulation in pre-eclampsia. *J Biol Chem* 286, Nr. 17, 15195–15204.
- BOUTET, P., AGÜERA-GONZÁLEZ, S., ATKINSON, S., PENNINGTON, C. J., EDWARDS, D. R., MURPHY, G., REYBURN, H. T. und VALÉS-GÓMEZ, M. (2009): Cutting edge: the metalloproteinase ADAM17/TNF-alpha-converting enzyme regulates proteolytic shedding of the MHC class I-related chain B protein. *J Immunol* 182, Nr. 1, 49–53.
- BROU, C., LOGEAT, F., GUPTA, N., BESSIA, C., LEBAIL, O., DOEDENS, J. R., CUMANO, A., ROUX, P., BLACK, R. A. und ISRAËL, A. (2000): A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5, Nr. 2, 207–216.
- BUDAGIAN, V., BULANOVA, E., ORINSKA, Z., DUITMAN, E., BRANDT, K., LUDWIG, A., HARTMANN, D., LEMKE, G., SAFTIG, P. und BULFONE-PAUS, S. (2005): Soluble Axl is generated by ADAM10-dependent cleavage and associates with Gas6 in mouse serum. *Mol Cell Biol* 25, Nr. 21, 9324–9339.

- BUXBAUM, J. D., LIU, K. N., LUO, Y., SLACK, J. L., STOCKING, K. L., PESCHON, J. J., JOHNSON, R. S., CASTNER, B. J., CERRETTI, D. P. und BLACK, R. A. (1998): Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273, Nr. 43, 27765–27767.
- CAESCU, C. I., JESCHKE, G. R. und TURK, B. E. (2009): Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem J* 424, Nr. 1, 79–88.
- CHALARIS, A., RABE, B., PALIGA, K., LANGE, H., LASKAY, T., FIELDING, C. A., JONES, S. A., ROSE-JOHN, S. und SCHELLER, J. (2007): Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* 110, Nr. 6, 1748–1755.
- CHALARIS, A., GARBERS, C., RABE, B., ROSE-JOHN, S. und SCHELLER, J. (2011): The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol* 90, Nr. 6-7, 484–494.
- CHEN, C.-D., PODVIN, S., GILLESPIE, E., LEEMAN, S. E. und ABRAHAM, C. R. (2007): Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, Nr. 50, 19796–19801.
- CHO, R. W. et al. (2008): mGluR1/5-dependent long-term depression requires the regulated ectodomain cleavage of neuronal pentraxin NPR by TACE. *Neuron* 57, Nr. 6, 858–871.
- CHOW, J. P. H., FUJIKAWA, A., SHIMIZU, H., SUZUKI, R. und NODA, M. (2008): Metalloproteinase- and gamma-secretase-mediated cleavage of protein-tyrosine phosphatase receptor type Z. *J Biol Chem* 283, Nr. 45, 30879–30889.
- CHÉREL, M., SOREL, M., LEBEAU, B., DUBOIS, S., MOREAU, J. F., BATAILLE, R., MINVIELLE, S. und JACQUES, Y. (1995): Molecular cloning of two isoforms of a receptor for the human hematopoietic cytokine interleukin-11. *Blood* 86, Nr. 7, 2534–2540.
- CISSÉ, M. A., SUNYACH, C., LEFRANC-JULLIEN, S., POSTINA, R., VINCENT, B. und CHECLER, F. (2005): The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. *J Biol Chem* 280, Nr. 49, 40624–40631.
- COLEMAN, H. A., LABRADOR, J.-P., CHANCE, R. K. und BASHAW, G. J. (2010): The Adam family metalloprotease Kuzbanian regulates the cleavage of the roundabout receptor to control axon repulsion at the midline. *Development* 137, Nr. 14, 2417–2426.

- CONTIN, C., PITARD, V., ITAI, T., NAGATA, S., MOREAU, J.-F. und DÉCHANET-MERVILLE, J. (2003): Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J Biol Chem* 278, Nr. 35, 32801–32809.
- DAM, M. van, MÜLLBERG, J., SCHOOLTINK, H., STOYAN, T., BRAKENHOFF, J. P., GRAEVE, L., HEINRICH, P. C. und ROSE-JOHN, S. (1993): Structure-function analysis of interleukin-6 utilizing human/murine chimeric molecules. Involvement of two separate domains in receptor binding. *J Biol Chem* 268, Nr. 20, 15285–15290.
- DAVIDSON, A. J., FREEMAN, S. A., CROSIER, K. E., WOOD, C. R. und CROSIER, P. S. (1997): Expression of murine interleukin 11 and its receptor alpha-chain in adult and embryonic tissues. *Stem Cells* 15, Nr. 2, 119–124.
- DÍAZ-RODRÍGUEZ, E., MONTERO, J. C., ESPARÍS-OGANDO, A., YUSTE, L. und PANDIELLA, A. (2002): Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol Biol Cell* 13, Nr. 6, 2031–2044.
- DOLNIK, O., VOLCHKOVA, V., GARTEN, W., CARBONNELLE, C., BECKER, S., KAHNT, J., STRÖHER, U., KLENK, H.-D. und VOLCHKOV, V. (2004): Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus. *EMBO J* 23, Nr. 10, 2175–2184.
- DONNERS, M. M. P. C. et al. (2010): A disintegrin and metalloprotease 10 is a novel mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell function in angiogenesis and is associated with atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, Nr. 11, 2188–2195.
- DYCZYNSKA, E., SUN, D., YI, H., SEHARA-FUJISAWA, A., BLOBEL, C. P. und ZOLKIEWSKA, A. (2007): Proteolytic processing of delta-like 1 by ADAM proteases. *J Biol Chem* 282, Nr. 1, 436–444.
- EDWARDS, D. R., HANDSLEY, M. M. und PENNINGTON, C. J. (2008): The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29, Nr. 5, 258–289.
- EICHENAUER, D. A. et al. (2007): ADAM10 inhibition of human CD30 shedding increases specificity of targeted immunotherapy in vitro. *Cancer Res* 67, Nr. 1, 332–338.
- ESSELENS, C. W., MALAPEIRA, J., COLOMÉ, N., MOSS, M., CANALS, F. und ARRIBAS, J. (2008): Metastasis-associated C4.4A, a GPI-anchored protein cleaved by ADAM10 and ADAM17. *Biol Chem* 389, Nr. 8, 1075–1084.
- ETZERODT, A., MANIECKI, M. B., MØLLER, K., MØLLER, H. J. und MOESTRUP, S. K. (2010): Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 88, Nr. 6, 1201–1205.

- EULENFELD, R., DITTRICH, A., KHOURI, C., MÜLLER, P. J., MÜTZE, B., WOLF, A. und SCHAPER, F. (2012): Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs. *Eur J Cell Biol* 91, Nr. 6-7, 486–495.
- FABRE-LAFAY, S., GARRIDO-URBANI, S., REYMOND, N., GONÇALVES, A., DUBREUIL, P. und LOPEZ, M. (2005): Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM-17. *J Biol Chem* 280, Nr. 20, 19543–19550.
- FISCHER, M., GOLDSCHMITT, J., PESCHEL, C., BRAKENHOFF, J. P., KALLEN, K. J., WOLLMER, A., GRÖTZINGER, J. und ROSE-JOHN, S. (1997): I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol* 15, Nr. 2, 142–145.
- FRANZKE, C.-W., TASANEN, K., BORRADORI, L., HUOTARI, V. und BRUCKNER-TUDERMAN, L. (2004): Shedding of collagen XVII/BP180: structural motifs influence cleavage from cell surface. *J Biol Chem* 279, Nr. 23, 24521–24529.
- FUKADA, T., OHTANI, T., YOSHIDA, Y., SHIROGANE, T., NISHIDA, K., NAKAJIMA, K., HIBI, M. und HIRANO, T. (1998): STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *EMBO J* 17, Nr. 22, 6670–6677.
- GARBERS, C. et al. (2011a): Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. *J Biol Chem* 286, Nr. 50, 42959–42970.
- GARBERS, C., JÄNNER, N., CHALARIS, A., MOSS, M. L., FLOSS, D. M., MEYER, D., KOCH-NOLTE, F., ROSE-JOHN, S. und SCHELLER, J. (2011b): Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *J Biol Chem* 286, Nr. 17, 14804–14811.
- GARBERS, C., HERMANN, H. M., SCHAPER, F., MÜLLER-NEUEN, G., GRÖTZINGER, J., ROSE-JOHN, S. und SCHELLER, J. (2012): Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 23, Nr. 3, 85–97.
- GARTON, K. J., GOUGH, P. J., PHILALAY, J., WILLE, P. T., BLOBEL, C. P., WHITEHEAD, R. H., DEMPSEY, P. J. und RAINES, E. W. (2003): Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *J Biol Chem* 278, Nr. 39, 37459–37464.
- GEORG LÖFFLER Petro E. Petrides, P. C. H. (2006): *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag.

- GRÖTZINGER, J., KURAPKAT, G., WOLLMER, A., KALAI, M. und ROSE-JOHN, S. (1997): The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes. *Proteins* 27, Nr. 1, 96–109.
- GRÖTZINGER, J., KERNEBECK, T., KALLEN, K. J. und ROSE-JOHN, S. (1999): IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both?. *Biol Chem* 380, Nr. 7-8, 803–813.
- GSCHWIND, A., HART, S., FISCHER, O. M. und ULLRICH, A. (2003): TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J* 22, Nr. 10, 2411–2421.
- GUO, L., EISENMAN, J. R., MAHIMKAR, R. M., PESCHON, J. J., PAXTON, R. J., BLACK, R. A. und JOHNSON, R. S. (2002): A proteomic approach for the identification of cell-surface proteins shed by metalloproteases. *Mol Cell Proteomics* 1, Nr. 1, 30–36.
- HAGA, S., YAMAMOTO, N., NAKAI-MURAKAMI, C., OSAWA, Y., TOKUNAGA, K., SATO, T., YAMAMOTO, N., SASAZUKI, T. und ISHIZAKA, Y. (2008): Modulation of TNF-alpha-converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and ACE2 induces TNF-alpha production and facilitates viral entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, Nr. 22, 7809–7814.
- HANSEN, H. P., RECKE, A., REINEKE, U., VON TRESCKOW, B., BORCHMANN, P., VON STRANDMANN, E. P., LANGE, H., LEMKE, H. und ENGERT, A. (2004): The ectodomain shedding of CD30 is specifically regulated by peptide motifs in its cysteine-rich domains 2 and 5. *FASEB J* 18, Nr. 7, 893–895.
- HATTORI, M., OSTERFIELD, M. und FLANAGAN, J. G. (2000): Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 289, Nr. 5483, 1360–1365.
- HEINRICH, P. C., BEHRMANN, I., MÜLLER-NEWEN, G., SCHAPER, F. und GRAEVE, L. (1998): Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334, Nr. 2, 297–314.
- HEINRICH, P. C., BEHRMANN, I., HAAN, S., HERMANN, H. M., MÜLLER-NEWEN, G. und SCHAPER, F. (2003): Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374, Nr. 1, 1–20.
- HERMEY, G., SJØGAARD, S. S., PETERSEN, C. M., NYKJAER, A. und GLIEMANN, J. (2006): Tumour necrosis factor alpha-converting enzyme mediates ectodomain shedding of Vps10p-domain receptor family members. *Biochem J* 395, Nr. 2, 285–293.
- HIKITA, A., YANA, I., WAKEYAMA, H., NAKAMURA, M., KADONO, Y., OSHIMA, Y., NAKAMURA, K., SEIKI, M. und TANAKA, S. (2006): Negative regulation of osteo-

- clastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem* 281, Nr. 48, 36846–36855.
- HIKITA, A., TANAKA, N., YAMANE, S., IKEDA, Y., FURUKAWA, H., TOHMA, S., SUZUKI, R., TANAKA, S., MITOMI, H. und FUKUI, N. (2009): Involvement of a disintegrin and metalloproteinase 10 and 17 in shedding of tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Cell Biol* 87, Nr. 4, 581–593.
- HOETTECKE, N., LUDWIG, A., FORO, S. und SCHMIDT, B. (2010): Improved synthesis of ADAM10 inhibitor GI254023X. *Neurodegener Dis* 7, Nr. 4, 232–238.
- HORIUCHI, K. et al. (2007): Cell surface colony-stimulating factor 1 can be cleaved by TNF-alpha converting enzyme or endocytosed in a clathrin-dependent manner. *J Immunol* 179, Nr. 10, 6715–6724.
- HORIUCHI, K., MORIOKA, H., TAKAISHI, H., AKIYAMA, H., BLOBEL, C. P. und TOYAMA, Y. (2009): Ectodomain shedding of FLT3 ligand is mediated by TNF-alpha converting enzyme. *J Immunol* 182, Nr. 12, 7408–7414.
- HORIUCHI, S., KOYANAGI, Y., ZHOU, Y., MIYAMOTO, H., TANAKA, Y., WAKI, M., MATSUMOTO, A., YAMAMOTO, M. und YAMAMOTO, N. (1994): Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. *Eur J Immunol* 24, Nr. 8, 1945–1948.
- HUNDHAUSEN, C. et al. (2007): Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. *J Immunol* 178, Nr. 12, 8064–8072.
- JACOBSEN, K. T., ADLERZ, L., MULTHAUP, G. und IVERFELDT, K. (2010): Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced processing of amyloid-beta precursor protein (APP) and APP-like protein 2 is mediated by different metalloproteinases. *J Biol Chem* 285, Nr. 14, 10223–10231.
- JANES, P. W., SAHA, N., BARTON, W. A., KOLEV, M. V., WIMMER-KLEIKAMP, S. H., NIEVERGALL, E., BLOBEL, C. P., HIMANEN, J.-P., LACKMANN, M. und NIKOLOV, D. B. (2005): Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* 123, Nr. 2, 291–304.
- JIA, H. P., LOOK, D. C., TAN, P., SHI, L., HICKEY, M., GAKHAR, L., CHAPPELL, M. C., WOHLFORD-LENANE, C. und MCCRAY Jr, P. B. (2009): Ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme 2 in human airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297, Nr. 1, L84–L96.

- JIANG, J., WU, S., WANG, W., CHEN, S., PENG, J., ZHANG, X. und WU, Q. (2011): Ectodomain shedding and autocleavage of the cardiac membrane protease corin. *J Biol Chem* 286, Nr. 12, 10066–10072.
- KACZUR, V., PUSKAS, L. G., NAGY, Z. U., MILED, N., REBAI, A., JUHASZ, F., KUPIHAR, Z., ZVARA, A., HACKLER Jr, L. und FARID, N. R. (2007): Cleavage of the human thyrotropin receptor by ADAM10 is regulated by thyrotropin. *J Mol Recognit* 20, Nr. 5, 392–404.
- KALUS, I., BORMANN, U., MZOUGH, M., SCHACHNER, M. und KLEENE, R. (2006): Proteolytic cleavage of the neural cell adhesion molecule by ADAM17/TACE is involved in neurite outgrowth. *J Neurochem* 98, Nr. 1, 78–88.
- KAMIMURA, D., ISHIHARA, K. und HIRANO, T. (2003): IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149, 1–38.
- KARJALAINEN, K. et al. (2015): Targeting IL11 Receptor in Leukemia and Lymphoma: A Functional Ligand-Directed Study and Hematopathology Analysis of Patient-Derived Specimens. *Clin Cancer Res* 21, Nr. 13, 3041–3051.
- KAWAGUCHI, N., HORIUCHI, K., BECHERER, J. D., TOYAMA, Y., BESMER, P. und BLOBEL, C. P. (2007): Different ADAMs have distinct influences on Kit ligand processing: phorbol-ester-stimulated ectodomain shedding of Kitl1 by ADAM17 is reduced by ADAM19. *J Cell Sci* 120, Nr. 6, 943–952.
- KENNY, P. A. und BISSELL, M. J. (2007): Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer. *J Clin Invest* 117, Nr. 2, 337–345.
- KETTELER, R., GLASER, S., SANDRA, O., MARTENS, U. M. und KLINGMÜLLER, U. (2002): Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther* 9, Nr. 8, 477–487.
- KIM, J., LILLIEHOOK, C., DUDAK, A., PROX, J., SAFTIG, P., FEDEROFF, H. J. und LIM, S. T. (2010): Activity-dependent alpha-cleavage of nectin-1 is mediated by a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *J Biol Chem* 285, Nr. 30, 22919–22926.
- KIRKIN, V. et al. (2007): The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. *Cell Death Differ* 14, Nr. 9, 1678–1687.
- KOENEN, R. R. et al. (2009): Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood* 113, Nr. 19, 4799–4809.

- KOPITZ, C. et al. (2007): Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Res* 67, Nr. 18, 8615–8623.
- KUMMER, M. P., MARUYAMA, H., HUELSMANN, C., BACHES, S., WEGGEN, S. und KOO, E. H. (2009): Formation of Pmel17 amyloid is regulated by juxtamembrane metalloproteinase cleavage, and the resulting C-terminal fragment is a substrate for gamma-secretase. *J Biol Chem* 284, Nr. 4, 2296–2306.
- LAMBERT, D. W., CLARKE, N. E., HOOPER, N. M. und TURNER, A. J. (2008): Calmodulin interacts with angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) and inhibits shedding of its ectodomain. *FEBS Lett* 582, Nr. 2, 385–390.
- LEKSA, V. et al. (2011): Soluble M6P/IGF2R released by TACE controls angiogenesis via blocking plasminogen activation. *Circ Res* 108, Nr. 6, 676–685.
- LEMIEUX, G. A., BLUMENKRON, F., YEUNG, N., ZHOU, P., WILLIAMS, J., GRAMMER, A. C., PETROVICH, R., LIPSKY, P. E., MOSS, M. L. und WERB, Z. (2007): The low affinity IgE receptor (CD23) is cleaved by the metalloproteinase ADAM10. *J Biol Chem* 282, Nr. 20, 14836–14844.
- LI, N. et al. (2007): Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3. *EMBO J* 26, Nr. 2, 494–504.
- LIU, P. C. C. et al. (2006): Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 5, Nr. 6, 657–664.
- LIU, Q., ZHANG, J., TRAN, H., VERBEEK, M. M., REISS, K., ESTUS, S. und BU, G. (2009): LRP1 shedding in human brain: roles of ADAM10 and ADAM17. *Mol Neurodegener* 4, 17.
- LUDWIG, A., HUNDHAUSEN, C., LAMBERT, M. H., BROADWAY, N., ANDREWS, R. C., BICKETT, D. M., LEESNITZER, M. A. und BECHERER, J. D. (2005): Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen* 8, Nr. 2, 161–171.
- LUM, L., REID, M. S. und BLOBEL, C. P. (1998): Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J Biol Chem* 273, Nr. 40, 26236–26247.
- LUM, L., WONG, B. R., JOSIEN, R., BECHERER, J. D., ERDJUMENT-BROMAGE, H., SCHLÖNDORFF, J., TEMPST, P., CHOI, Y. und BLOBEL, C. P. (1999): Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* 274, Nr. 19, 13613–13618.

- MAETZEL, D. et al. (2009): Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol* 11, Nr. 2, 162–171.
- MALAPEIRA, J., ESSELENS, C., BECH-SERRA, J. J., CANALS, F. und ARRIBAS, J. (2011): ADAM17 (TACE) regulates TGFbeta signaling through the cleavage of vasorin. *Oncogene* 30, Nr. 16, 1912–1922.
- MARETZKY, T., REISS, K., LUDWIG, A., BUCHHOLZ, J., SCHOLZ, F., PROKSCH, E., DE STROOPER, B., HARTMANN, D. und SAFTIG, P. (2005a): ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, Nr. 26, 9182–9187.
- MARETZKY, T., SCHULTE, M., LUDWIG, A., ROSE-JOHN, S., BLOBEL, C., HARTMANN, D., ALTEVOGT, P., SAFTIG, P. und REISS, K. (2005b): L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Mol Cell Biol* 25, Nr. 20, 9040–9053.
- MARTENS, A. S., BODE, J. G., HEINRICH, P. C. und GRAEVE, L. (2000): The cytoplasmic domain of the interleukin-6 receptor gp80 mediates its basolateral sorting in polarized madin-darby canine kidney cells. *J Cell Sci* 113, Nr. 20, 3593–3602.
- MARTIN, L., FLUHRER, R., REISS, K., KREMMER, E., SAFTIG, P. und HAASS, C. (2008): Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b. *J Biol Chem* 283, Nr. 3, 1644–1652.
- MATTHEWS, V. et al. (2003): Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem* 278, Nr. 40, 38829–38839.
- MECHTERSHEIMER, S. et al. (2001): Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol* 155, Nr. 4, 661–673.
- MENDELSON, K., SWENDEMAN, S., SAFTIG, P. und BLOBEL, C. P. (2010): Stimulation of platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFRbeta) activates ADAM17 and promotes metalloproteinase-dependent cross-talk between the PDGFRbeta and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways. *J Biol Chem* 285, Nr. 32, 25024–25032.
- MERLOS-SUÁREZ, A., RUIZ-PAZ, S., BASELGA, J. und ARRIBAS, J. (2001): Metalloprotease-dependent protransforming growth factor-alpha ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *J Biol Chem* 276, Nr. 51, 48510–48517.

- MILLICHIP, M. I., DALLAS, D. J., WU, E., DALE, S. und MCKIE, N. (1998): The metallo-disintegrin ADAM10 (MADM) from bovine kidney has type IV collagenase activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 245, Nr. 2, 594–598.
- MITSUOKA, H., KUME, N., HAYASHIDA, K., INUI-HAYASHIADA, A., ARAMAKI, Y., TOYOHARA, M., JINNAI, T., NISHI, E. und KITA, T. (2009): Interleukin 18 stimulates release of soluble lectin-like oxidized LDL receptor-1 (sLOX-1). *Atherosclerosis* 202, Nr. 1, 176–182.
- MÜLLBERG, J., DITTRICH, E., GRAEVE, L., GERHARTZ, C., YASUKAWA, K., TAGA, T., KISHIMOTO, T., HEINRICH, P. C. und ROSE-JOHN, S. (1993a): Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor. *FEBS Lett* 332, Nr. 1-2, 174–178.
- MÜLLBERG, J., SCHOOLTINK, H., STOYAN, T., GÜNTHER, M., GRAEVE, L., BUSE, G., MACKIEWICZ, A., HEINRICH, P. C. und ROSE-JOHN, S. (1993b): The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol* 23, Nr. 2, 473–480.
- MÜLLBERG, J., OBERTHÜR, W., LOTTSPEICH, F., MEHL, E., DITTRICH, E., GRAEVE, L., HEINRICH, P. C. und ROSE-JOHN, S. (1994): The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J Immunol* 152, Nr. 10, 4958–4968.
- MONTERO, J. C., YUSTE, L., DÍAZ-RODRÍGUEZ, E., ESPARÍS-OGANDO, A. und PANDIELLA, A. (2000): Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Mol Cell Neurosci* 16, Nr. 5, 631–648.
- MOSS, M. L. et al. (1997): Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385, Nr. 6618, 733–736.
- MOSS, M. L. und RASMUSSEN, F. H. (2007): Fluorescent substrates for the proteinases ADAM17, ADAM10, ADAM8, and ADAM12 useful for high-throughput inhibitor screening. *Anal Biochem* 366, Nr. 2, 144–148.
- MOSS, M. L. et al. (2007): The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J Biol Chem* 282, Nr. 49, 35712–35721.
- MOSS, M. L., SKLAIR-TAVRON, L. und NUDELMAN, R. (2008): Drug insight: tumor necrosis factor-converting enzyme as a pharmaceutical target for rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4, Nr. 6, 300–309.
- MÄÄTTÄ, J. A., SUNDVALL, M., JUNTILA, T. T., PERI, L., LAINE, V. J. O., ISOLA, J., EGEBLAD, M. und ELENUS, K. (2006): Proteolytic cleavage and phosphorylation of a tumor-associated ErbB4 isoform promote ligand-independent survival and cancer cell growth. *Mol Biol Cell* 17, Nr. 1, 67–79.

- NAGANO, O., MURAKAMI, D., HARTMANN, D., DE STROOPER, B., SAFTIG, P., IWATSUBO, T., NAKAJIMA, M., SHINOHARA, M. und SAYA, H. (2004): Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *J Cell Biol* 165, Nr. 6, 893–902.
- NAGARA, Y., HAGIYAMA, M., HATANO, N., FUTAI, E., SUO, S., TAKAOKA, Y., MURAKAMI, Y., ITO, A. und ISHIURA, S. (2012): Tumor suppressor cell adhesion molecule 1 (CADM1) is cleaved by a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and subsequently cleaved by gamma-secretase complex. *Biochem Biophys Res Commun* 417, Nr. 1, 462–467.
- NISHIMOTO, N. (2006): Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 18, Nr. 3, 277–281.
- OBANA, M. et al. (2010): Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Circulation* 121, Nr. 5, 684–691.
- PAN, D. und RUBIN, G. M. (1997): Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90, Nr. 2, 271–280.
- PARR-STURGESS, C. A., RUSHTON, D. J. und PARKIN, E. T. (2010): Ectodomain shedding of the Notch ligand Jagged1 is mediated by ADAM17, but is not a lipid-raft-associated event. *Biochem J* 432, Nr. 2, 283–294.
- PASQUALINI, R. et al. (2015): Targeting the interleukin-11 receptor α in metastatic prostate cancer: A first-in-man study. *Cancer* 121, Nr. 14, 2411–2421.
- PENG, M., GUO, S., YIN, N., XUE, J., SHEN, L., ZHAO, Q. und ZHANG, W. (2010): Ectodomain shedding of Fc α receptor is mediated by ADAM10 and ADAM17. *Immunology* 130, Nr. 1, 83–91.
- PESCHON, J. J. et al. (1998): An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282, Nr. 5392, 1281–1284.
- PFLANZ, S., TACKEN, I., GRÖTZINGER, J., JACQUES, Y., MINVIELLE, S., DAHMEN, H., HEINRICH, P. C. und MÜLLER-NEWEN, G. (1999): A fusion protein of interleukin-11 and soluble interleukin-11 receptor acts as a superagonist on cells expressing gp130. *FEBS Lett* 450, Nr. 1-2, 117–122.
- PRUESSMEYER, J. et al. (2010): A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates inflammation-induced shedding of syndecan-1 and -4 by lung epithelial cells. *J Biol Chem* 285, Nr. 1, 555–564.

- PUTOCZKI, T. und ERNST, M. (2010): More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer. *J Leukoc Biol* 88, Nr. 6, 1109–1117.
- PUTOCZKI, T. L. und ERNST, M. (2015): IL-11 signaling as a therapeutic target for cancer. *Immunotherapy* 7, Nr. 4, 441–453.
- PUTOCZKI, T. L. et al. (2013): Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically. *Cancer Cell* 24, Nr. 2, 257–271.
- PUTOCZKI, T. L., DOBSON, R. C. J. und GRIFFIN, M. D. W. (2014): The structure of human interleukin-11 reveals receptor-binding site features and structural differences from interleukin-6. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70, Nr. 9, 2277–2285.
- QU, D., WANG, Y., ESMON, N. L. und ESMON, C. T. (2007): Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor- α converting enzyme/ADAM17. *J Thromb Haemost* 5, Nr. 2, 395–402.
- RABIE, T., STREHL, A., LUDWIG, A. und NIESWANDT, B. (2005): Evidence for a role of ADAM17 (TACE) in the regulation of platelet glycoprotein V. *J Biol Chem* 280, Nr. 15, 14462–14468.
- REDDY, P., SLACK, J. L., DAVIS, R., CERRETTI, D. P., KOZLOSZY, C. J., BLANTON, R. A., SHOWS, D., PESCHON, J. J. und BLACK, R. A. (2000): Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *J Biol Chem* 275, Nr. 19, 14608–14614.
- REISS, K., MARETZKY, T., LUDWIG, A., TOUSSEYN, T., DE STROOPER, B., HARTMANN, D. und SAFTIG, P. (2005): ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J* 24, Nr. 4, 742–752.
- REISS, K., MARETZKY, T., HAAS, I. G., SCHULTE, M., LUDWIG, A., FRANK, M. und SAFTIG, P. (2006): Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gamma-protocadherin C3 modulates cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 281, Nr. 31, 21735–21744.
- ROGHANI, M., BECHERER, J. D., MOSS, M. L., ATHERTON, R. E., ERDJUMENT-BROMAGE, H., ARRIBAS, J., BLACKBURN, R. K., WESKAMP, G., TEMPST, P. und BLOBEL, C. P. (1999): Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem* 274, Nr. 6, 3531–3540.
- ROSE, A. A. N., ANNIS, M. G., DONG, Z., PEPIN, F., HALLETT, M., PARK, M. und SIEGEL, P. M. (2010): ADAM10 releases a soluble form of the GPNMB/Osteoactivin extracellular domain with angiogenic properties. *PLoS One* 5, Nr. 8, e12093.

- ROSE-JOHN, S. (2001): Coordination of interleukin-6 biology by membrane bound and soluble receptors. *Adv Exp Med Biol* 495, 145–151.
- ROSE-JOHN, S. und HEINRICH, P. C. (1994): Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* 300, Nr. 2, 281–290.
- ROSE-JOHN, S., EHLERS, M., GRÖTZINGER, J. und MÜLLBERG, J. (1995): The soluble interleukin-6 receptor. *Ann N Y Acad Sci* 762, 207–20.
- ROSE-JOHN, S. und NEURATH, M. F. (2004): IL-6 trans-signaling: the heat is on. *Immunity* 20, Nr. 1, 2–4.
- ROSE-JOHN, S., SCHELLER, J., ELSON, G. und JONES, S. A. (2006): Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 80, Nr. 2, 227–236.
- ROSE-JOHN, S., WAETZIG, G. H., SCHELLER, J., GRÖTZINGER, J. und SEEGER, D. (2007): The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 11, Nr. 5, 613–624.
- ROVIDA, E., PACCAGNINI, A., DEL ROSSO, M., PESCHON, J. und DELLO SBARBA, P. (2001): TNF-alpha-converting enzyme cleaves the macrophage colony-stimulating factor receptor in macrophages undergoing activation. *J Immunol* 166, Nr. 3, 1583–1589.
- RUHE, J. E., STREIT, S., HART, S. und ULLRICH, A. (2006): EGFR signaling leads to downregulation of PTP-LAR via TACE-mediated proteolytic processing. *Cell Signal* 18, Nr. 9, 1515–1527.
- SAHIN, U. und BLOBEL, C. P. (2007): Ectodomain shedding of the EGF-receptor ligand epigen is mediated by ADAM17. *FEBS Lett* 581, Nr. 1, 41–44.
- SAHIN, U., WESKAMP, G., KELLY, K., ZHOU, H.-M., HIGASHIYAMA, S., PESCHON, J., HARTMANN, D., SAFTIG, P. und BLOBEL, C. P. (2004): Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* 164, Nr. 5, 769–779.
- SCHANTL, J. A., ROZA, M., VAN KERKHOFF, P. und STROUS, G. J. (2004): The growth hormone receptor interacts with its sheddase, the tumour necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). *Biochem J* 377, Nr. 2, 379–384.
- SCHELLER, J., OHNESORGE, N. und ROSE-JOHN, S. (2006): Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. *Scand J Immunol* 63, Nr. 5, 321–329.
- SCHELLER, J. und ROSE-JOHN, S. (2006): Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol* 195, Nr. 4, 173–183.

- SCHELLER, J., KOVALEVA, M., RABE, B., EICHLER, J., KALLEN, K.-J. und ROSE-JOHN, S. (2004): Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunoabsorbent assay for the binding of gp130 to the IL-6/IL-6R complex and its competitive inhibition. *J Immunol Methods* 291, Nr. 1-2, 93–100.
- SCHELLER, J., CHALARIS, A., GARBERS, C. und ROSE-JOHN, S. (2011a): ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol* 32, Nr. 8, 380–387.
- SCHELLER, J., CHALARIS, A., SCHMIDT-ARRAS, D. und ROSE-JOHN, S. (2011b): The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 1813, Nr. 5, 878–888.
- SCHELTER, F., KOBUCH, J., MOSS, M. L., BECHERER, J. D., COMOGLIO, P. M., BOCCACCIO, C. und KRÜGER, A. (2010): A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor. *J Biol Chem* 285, Nr. 34, 26335–26340.
- SCHÄFER, B., GSCHWIND, A. und ULLRICH, A. (2004): Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene* 23, Nr. 4, 991–999.
- SCHROERS, A., HECHT, O., KALLEN, K.-J., PACHTA, M., ROSE-JOHN, S. und GRÖTZINGER, J. (2005): Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly on the cellular membrane. *Protein Sci* 14, Nr. 3, 783–790.
- SCHULTE, A. et al. (2007): Sequential processing of the transmembrane chemokines CX3CL1 and CXCL16 by alpha- and gamma-secretases. *Biochem Biophys Res Commun* 358, Nr. 1, 233–240.
- SCHULZ, B., PRUESSMEYER, J., MARETZKY, T., LUDWIG, A., BLOBEL, C. P., SAFTIG, P. und REISS, K. (2008): ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res* 102, Nr. 10, 1192–1201.
- SEALS, D. F. und COURTNEIDGE, S. A. (2003): The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17, Nr. 1, 7–30.
- SINGH, R. J. R., MASON, J. C., LIDINGTON, E. A., EDWARDS, D. R., NUTTALL, R. K., KHOKHA, R., KNAUPER, V., MURPHY, G. und GAVRILOVIC, J. (2005): Cytokine stimulated vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ectodomain release is regulated by TIMP-3. *Cardiovasc Res* 67, Nr. 1, 39–49.
- SIX, E., NDIAYE, D., LAABI, Y., BROU, C., GUPTA-ROSSI, N., ISRAEL, A. und LOGEAT, F. (2003): The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, Nr. 13, 7638–7643.

- SLACK, B. E., MA, L. K. und SEAH, C. C. (2001): Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem J* 357, Nr. 3, 787–794.
- SODENKAMP, J., WAETZIG, G. H., SCHELLER, J., SEEGERT, D., GRÖTZINGER, J., ROSE-JOHN, S., EHLERS, S. und HÖLSCHER, C. (2012): Therapeutic targeting of interleukin-6 trans-signaling does not affect the outcome of experimental tuberculosis. *Immunobiology* 217, Nr. 10, 996–1004.
- SOMERS, W., STAHL, M. und SEEHRA, J. S. (1997): 1.9 Å crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J* 16, Nr. 5, 989–997.
- SUNNARBORG, S. W. et al. (2002): Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J Biol Chem* 277, Nr. 15, 12838–12845.
- SWENDEMAN, S., MENDELSON, K., WESKAMP, G., HORIUCHI, K., DEUTSCH, U., SCHERLE, P., HOOPER, A., RAFII, S. und BLOBEL, C. P. (2008): VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. *Circ Res* 103, Nr. 9, 916–918.
- TACKEN, I. et al. (1999): Definition of receptor binding sites on human interleukin-11 by molecular modeling-guided mutagenesis. *Eur J Biochem* 265, Nr. 2, 645–655.
- TACKEN, I. (2002): „Struktur und Funktionsuntersuchungen am humanen Interleukin-11-Rezeptorkomplex“. Diss. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.
- TAPE, C. J., WILLEMS, S. H., DOMBERNOWSKY, S. L., STANLEY, P. L., FOGARASI, M., OUWEHAND, W., MCCAFFERTY, J. und MURPHY, G. (2011): Cross-domain inhibition of TACE ectodomain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, Nr. 14, 5578–5583.
- THATHIAH, A., BLOBEL, C. P. und CARSON, D. D. (2003): Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding. *J Biol Chem* 278, Nr. 5, 3386–3394.
- TSAKADZE, N. L., SITHU, S. D., SEN, U., ENGLISH, W. R., MURPHY, G. und D'SOUZA, S. E. (2006): Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J Biol Chem* 281, Nr. 6, 3157–3164.
- VOLLMER, P., OPPMANN, B., VOLTZ, N., FISCHER, M. und ROSE-JOHN, S. (1999): A role for the immunoglobulin-like domain of the human IL-6 receptor. Intracellular protein transport and shedding. *Eur J Biochem* 263, Nr. 2, 438–446.

- WAETZIG, G. H. und ROSE-JOHN, S. (2012): Hitting a complex target: an update on interleukin-6 trans-signalling. *Expert Opin Ther Targets* 16, Nr. 2, 225–236.
- WALDHAEUER, I., GOEHLSDORF, D., GIESEKE, F., WEINSCHENK, T., WITTENBRINK, M., LUDWIG, A., STEVANOVIC, S., RAMMENSEE, H.-G. und STEINLE, A. (2008): Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res* 68, Nr. 15, 6368–6376.
- WALEV, I., VOLLMER, P., PALMER, M., BHAKDI, S. und ROSE-JOHN, S. (1996): Pore-forming toxins trigger shedding of receptors for interleukin 6 and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, Nr. 15, 7882–7887.
- WANG, Y. und SUL, H. S. (2006): Ectodomain shedding of preadipocyte factor 1 (Pref-1) by tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) and inhibition of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 26, Nr. 14, 5421–5435.
- WESKAMP, G., SCHLÖNDORFF, J., LUM, L., BECHERER, J. D., KIM, T.-W., SAFTIG, P., HARTMANN, D., MURPHY, G. und BLOBEL, C. P. (2004): Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR). *J Biol Chem* 279, Nr. 6, 4241–4249.
- YOKOZEKI, T., WAKATSUKI, S., HATSUZAWA, K., BLACK, R. A., WADA, I. und SEHARA-FUJISAWA, A. (2007): Meltrin beta (ADAM19) mediates ectodomain shedding of Neuregulin beta1 in the Golgi apparatus: fluorescence correlation spectroscopic observation of the dynamics of ectodomain shedding in living cells. *Genes Cells* 12, Nr. 3, 329–343.
- YOUNG, J. et al. (2010): Lymphotoxin- α heterotrimers are cleaved by metalloproteinases and contribute to synovitis in rheumatoid arthritis. *Cytokine* 51, Nr. 1, 78–86.
- ZATOVICOVA, M., SEDLAKOVA, O., SVASTOVA, E., OHRADANOVA, A., CIAMPOR, F., ARRIBAS, J., PASTOREK, J. und PASTOREKOVA, S. (2005): Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17. *Br J Cancer* 93, Nr. 11, 1267–1276.
- ZHANG, L., BUKULIN, M., KOJRO, E., ROTH, A., METZ, V. V., FAHRENHOLZ, F., NAWROTH, P. P., BIERHAUS, A. und POSTINA, R. (2008): Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J Biol Chem* 283, Nr. 51, 35507–35516.
- ZHENG, Y., SAFTIG, P., HARTMANN, D. und BLOBEL, C. (2004): Evaluation of the contribution of different ADAMs to tumor necrosis factor alpha (TNF α) shedding and of the function of the TNF α ectodomain in ensuring selective stimu-

lated shedding by the TNFalpha convertase (TACE/ADAM17). *J Biol Chem* 279, Nr. 41, 42898–42906.

ZHU, L. et al. (2007): Regulated surface expression and shedding support a dual role for semaphorin 4D in platelet responses to vascular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, Nr. 5, 1621–1626.

6 Anhang

6.1 Alignment von humanem IL-6R und IL-11R

```

hIL-11R      -MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSPCQAWGPPGVQYQQPGRSVKLCPCPGVTAGDPVSW
hIL-6R      MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRR--CPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPGVEPEDNATV
              :: .*: *: :*. * :*:*. .  ** . ** . ** **.* ***** . * :.

hIL-11R      FRDGEPKLLQGPDSD--GLGHELVLQAQADSTDEGTYICQTLDGALGGTVTLQLGYPPARP
hIL-6R      HWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLRVQLHDSGNYSYRAGRPAAG--TVHLLVDVPPPEEP
              . . . . * *: :*. * .: . *.* * . . * ** * :. ** .*

hIL-11R      VVSCQAAD-YENFSCWTWSPSQISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSQRSPSTGPWPFCQDPL
hIL-6R      QLSCFRKSPLSNVCEWGPSTPSLTTKAVLLVRKFNQNSPAEDFQEPQOYS----QESQK
              :** . .*. * *. * . .*. * : : ** * :. :. . . . :.

hIL-11R      GAARCVVHGAEFWSQYRINVTEVNPLGASTRLLDVSLQSIILRPDPPQGLRVESVPGYPRR
hIL-6R      FSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVSGSKFSKTQTFQCGILQPDPPANITVTVAVARNPRW
              :. : .* :. . . . :. :. . ** :***** :. * :*. **

hIL-11R      LRASWTYPASWPCQPHFLLKFRLLQYRPAQHPAWS--TVEPAGLEEVITDAVAGLPHAVRV
hIL-6R      LSVTWQDPHWSNNS--FYRLRFELRYRAERSKFTFTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQL
              * .:* * ** . . . :*. * :*. : :. : * . ** ** :*. * :*.

hIL-11R      SARDFLDAGTWSTWSPPEAWGTPSTGTIPKEIPAWGQLHTQPEVEPQVDSAPP RP SLQPH
hIL-6R      RAQEEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNILFRDSANAT
              * :. :. * ** ***** ** * : . . * . . : * . * * :.

hIL-11R      PRLLDHRDSVEQVAVLASLGLSFLGLVAGALALGLWLRRLRRGGKDGSPKPGFLAS
hIL-6R      SLPVQDSSSVPLP TFLVAGGSLAFGTLICIAIVLRFKKTWKLRLALKEGKTSM
              . :. : ** :. :. : * * : * :. * :. * ** : ** . * *..

hIL-11R      VIPVDRRPGAPNL-----
hIL-6R      HPPYSLGQLVPERPRPTVPLVPLISPPVSPSSLGSDNTSSSHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPR
              :.* ** . :
  
```

Signalpeptid, Domäne D1, Domäne D2, Domäne D3, Stalk, TM-Domäne, ICD

Abbildung 6.1: Alignment von hIL-6R und hIL-11R. Die Domänen sind farbig gekennzeichnet. Die Vorhersage der Transmembrandomäne erfolgte nach Uniprot.

6.2 Alignment des IL-11R von Mensch, Ratte und Maus

```

mouse          MSSSCSGLTRVLVAVATALVSSSSPCPQAWGPPGVQYQPGRFE27VMLCCPGVSAGTPVSWF
rat            MSSRSGLTRVLVAVATALVSSSTPCPQAWGPPGVQYQPGRFVMLCCPGVNAGTPVSWF
human         MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSPCPQAWGPPGVQYQPGRSVKLCCPGVTAGDPVSWF
****  ***:*****:.*:*****.* *****.* *****

mouse          RDGDSRLLQGPDSGLGHRLLVLAQVDSRDEGTYVCRTLDGVSGGMVTLKLGFPARPEVSC
rat            RDGDSRLLQGPDSGLGHRLLVLAQVDSRDEGTYVCRTLDGVSGGMVTLKLGSPPARPEVSC
human         RDGEPKLLQGPDSGLGHELVLVAQADSTDEGTYICRTLDGALGGTVTLQLGYPPARPVVSC
***:.*:*****.******.* *****.*:*****.* * **.*:*** ***** **

mouse          QAVDYENFSCTWSPGQVSGLPTRYLTSYRKKTLPGAESQRESPSTGPWPCQDPLEASRC
rat            QAVDYENFSCTWSPGRVSGLPTRYLTSYRKKTLPGAESQRESPSTGPWPCQDPLEASRC
human         QAADYENFSCTWSPSQISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSRSPSTGPWPCQDPLGAARC
**.******.*:.*:*****:.*:***.* *****.*:***

mouse          VVHGAEFWSEYRINVTEVNPLGASTCLLDVRLQSIILRPDPQGLRVESVPGYPRRLHASW
rat            VVHGAEFWSEYRINVTEVNPLGASTCLLDVRLQRIILRPDPQGLRVESVPGYPRRLHASW
human         VVHGAEFWSQYRINVTEVNPLGASTRLLDVSLQSIILRPDPQGLRVESVPGYPRRLRASW
*****.*:*****.* ***** ** *****.*:***

mouse          TYPASWRRQPHFLLKFRLLQYRPAQHPAWSTVEPIGLEEVITDAVAGLPHAVRVSARDFLD
rat            TYPASWRRQPHFLLKFRLLQYRPAQHPAWSTVEPIGLEELITDAVAGLPHAVRVSARDFLD
human         TYPASWPCQPHFLLKFRLLQYRPAQHPAWSTVEPAGLEEVITDAVAGLPHAVRVSARDFLD
***** ***** *****:*****

mouse          AGTWSAWSPEAWGTPSTGPTLQDEIPDWSQGHGQQLE24.2EAVVAQEDSPAC4.2PARPSLQPDFRPLD
rat            AGTWSAWSPEAWGTPSTGPTLRDEVPDGSRGHEQKLEAAAQ-EDSPAPPSPSLQPDFRPLD
human         AGTWSAWSPEAWGTPSTGPTLPKEIPAWG--QLHTQPEVEPQVDSPAPPRPSLQPHRPLD
****.*:*****.*:.*:* . : . *****.* *****.* ** **

mouse          HRDPLEQVAVLASLGIFSCLGLAVGALALGLWLRLRRSGKDGPKPGLLAPMIPVEKLPG
rat            HRDPLEQVAVLASLGIFSFLGLAVGALALGLWLRLRRSGKDGPKPGLFAPMIPGDKLPG
human         HRDSVEQVAVLASLGILSFLGLVAGALALGLWLRLRRGGKDGSPKPGFLASVIPVDRRRPG
***:.*:*****.*:***.* *****.* *****.*:***.*:*** **

```

Abbildung 6.2: Alignment des IL-11R in Maus, Ratte und Mensch. Die Bindungsepitope der in dieser Arbeit verwendeten IL-11R-Antikörper E27, C4.2 und E24.2 sind farbig gekennzeichnet.

6.3 Übersicht über die monoklonalen Antikörper von IL-6R und IL-11R

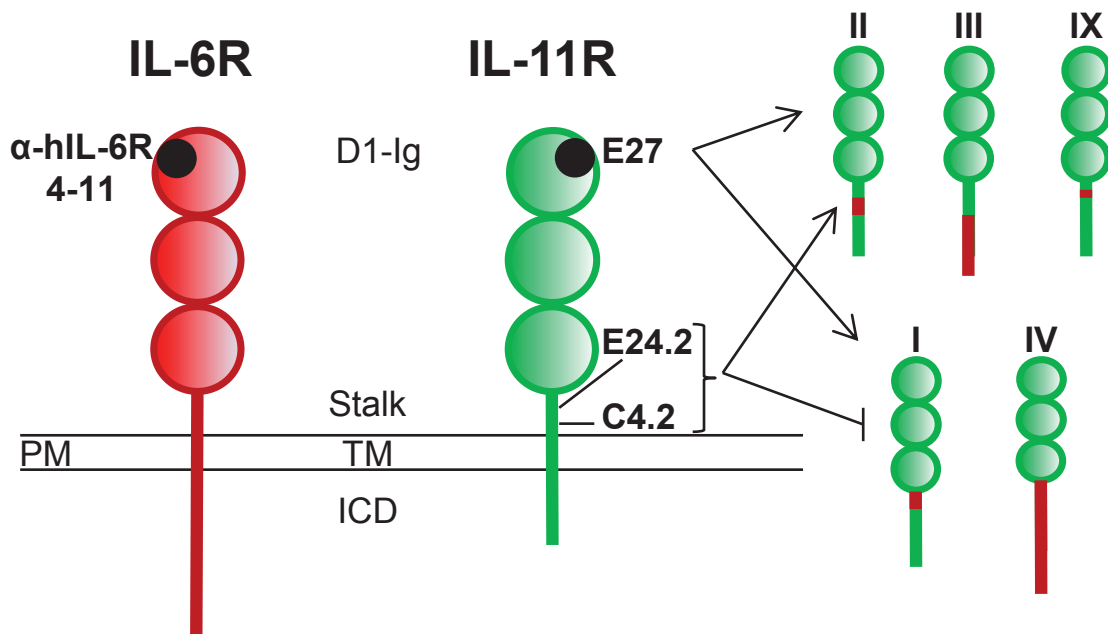


Abbildung 6.3: Der in dieser Arbeit wichtigste Antikörper für den IL-6R stellt α -humaner IL-6R dar. Er bindet alle IL-6R-Varianten und wird im Western-Blot sowie im ELISA eingesetzt. Die Bindungssepitope der in dieser Arbeit verwendeten IL-11R-Antikörper E27, C4.2 und E24.2 sind durch Striche verdeutlicht. Neben sind diejenigen IL-11R-Chimären zu sehen, die durch diese Ak erkannt werden. Die Pfeilspitze zeigt auf die Varianten die erkannt werden. Der Balken zeigt auf die Chimären die von C4.2 und E24.2 nicht gebunden werden.

6.4 Klonierungsverfahren der Rezeptorchimären

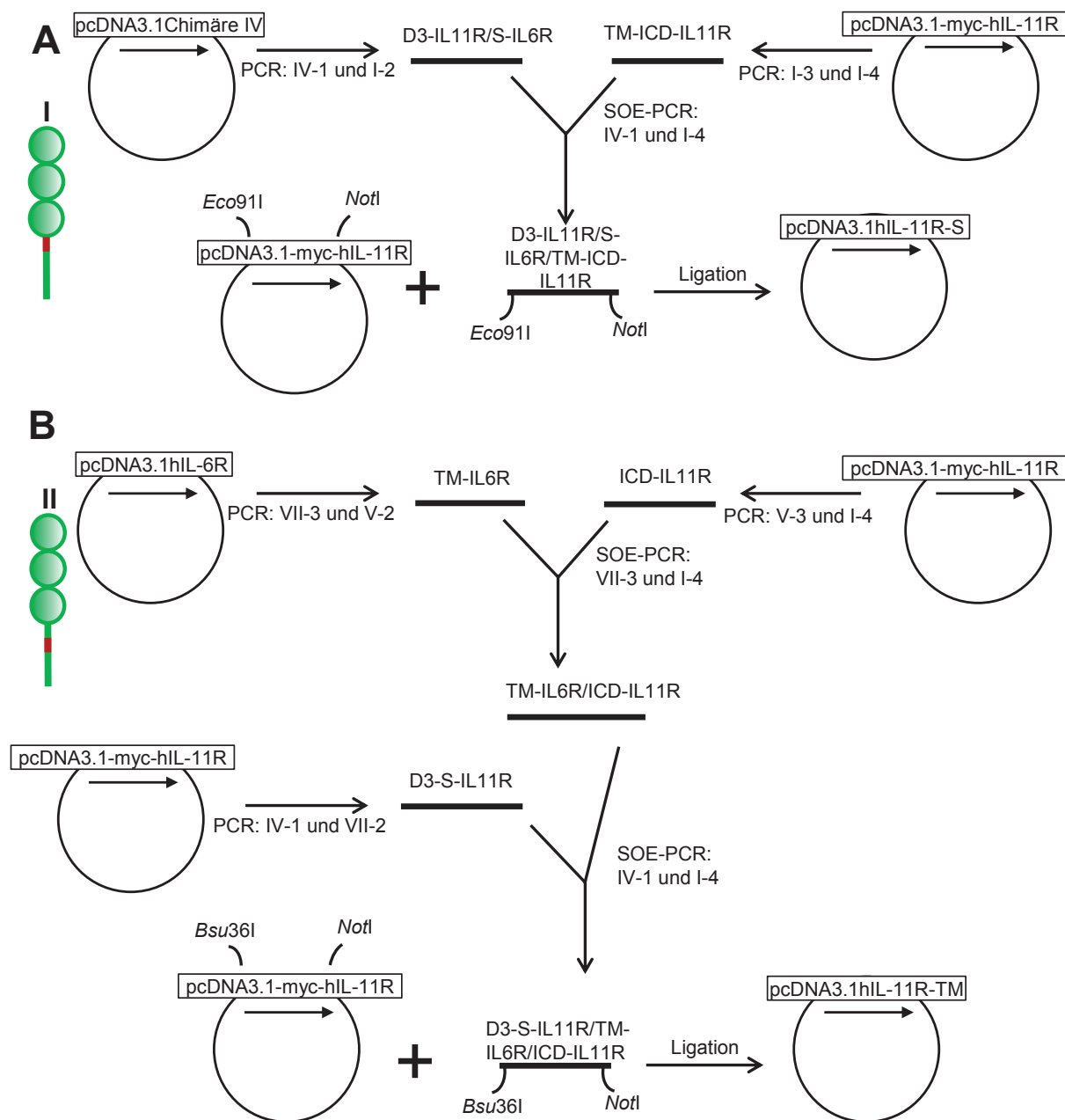


Abbildung 6.4: Klonierungsverfahren von Chimäre I (A) und II (B) in pcDNA3.1-Vektor. Anschließend erfolgte die Umklonierung in den pMOWs-Vektor. Nähere Erklärungen finden sich in Abschnitt 4.3.

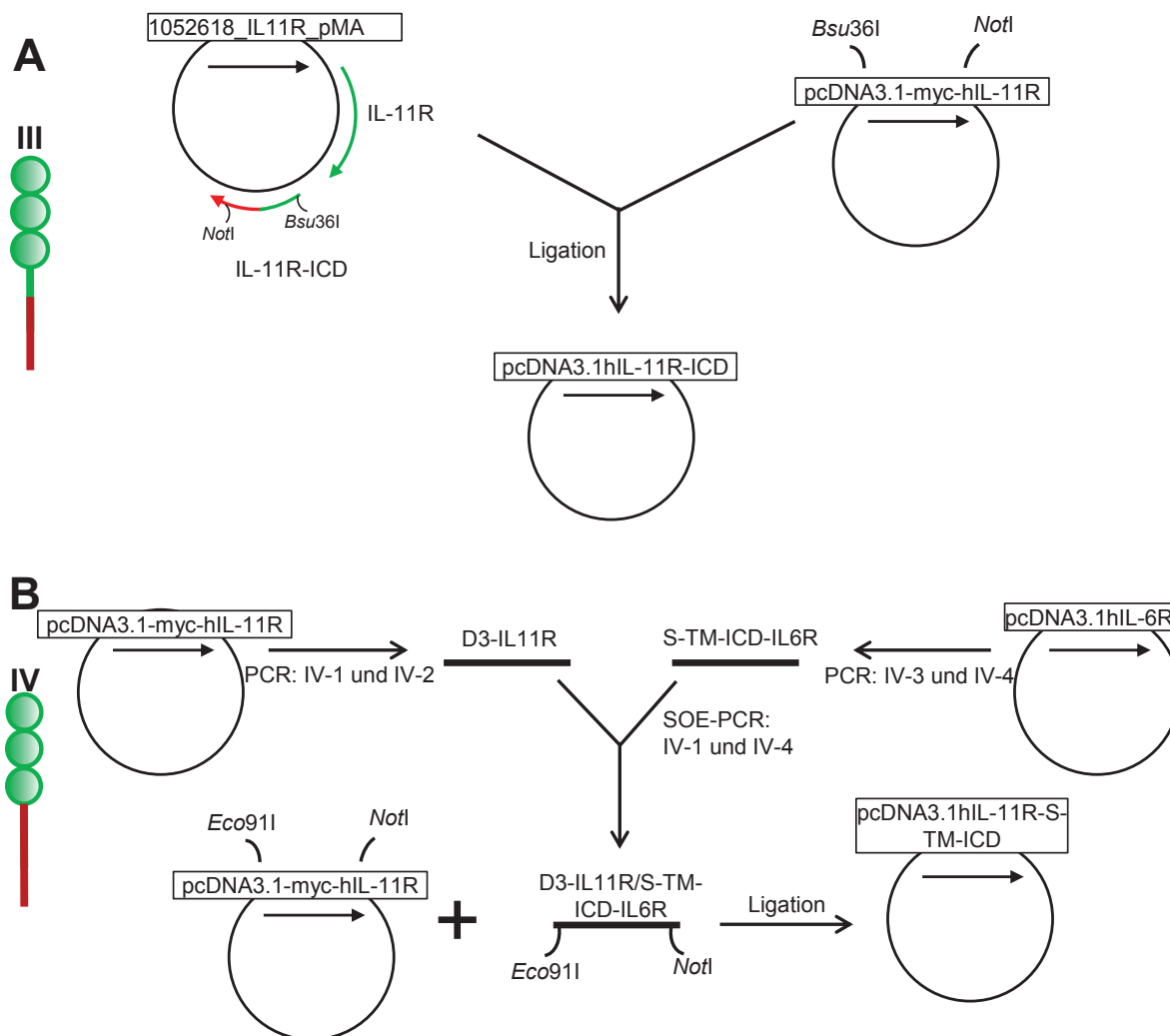


Abbildung 6.5: Klonierungsverfahren von Chimäre III (A) und IV (B) in pcDNA3.1-Vektor. Anschließend erfolgte die Umklonierung in den pMOWs-Vektor. Nähere Erklärungen finden sich in Abschnitt 4.3.

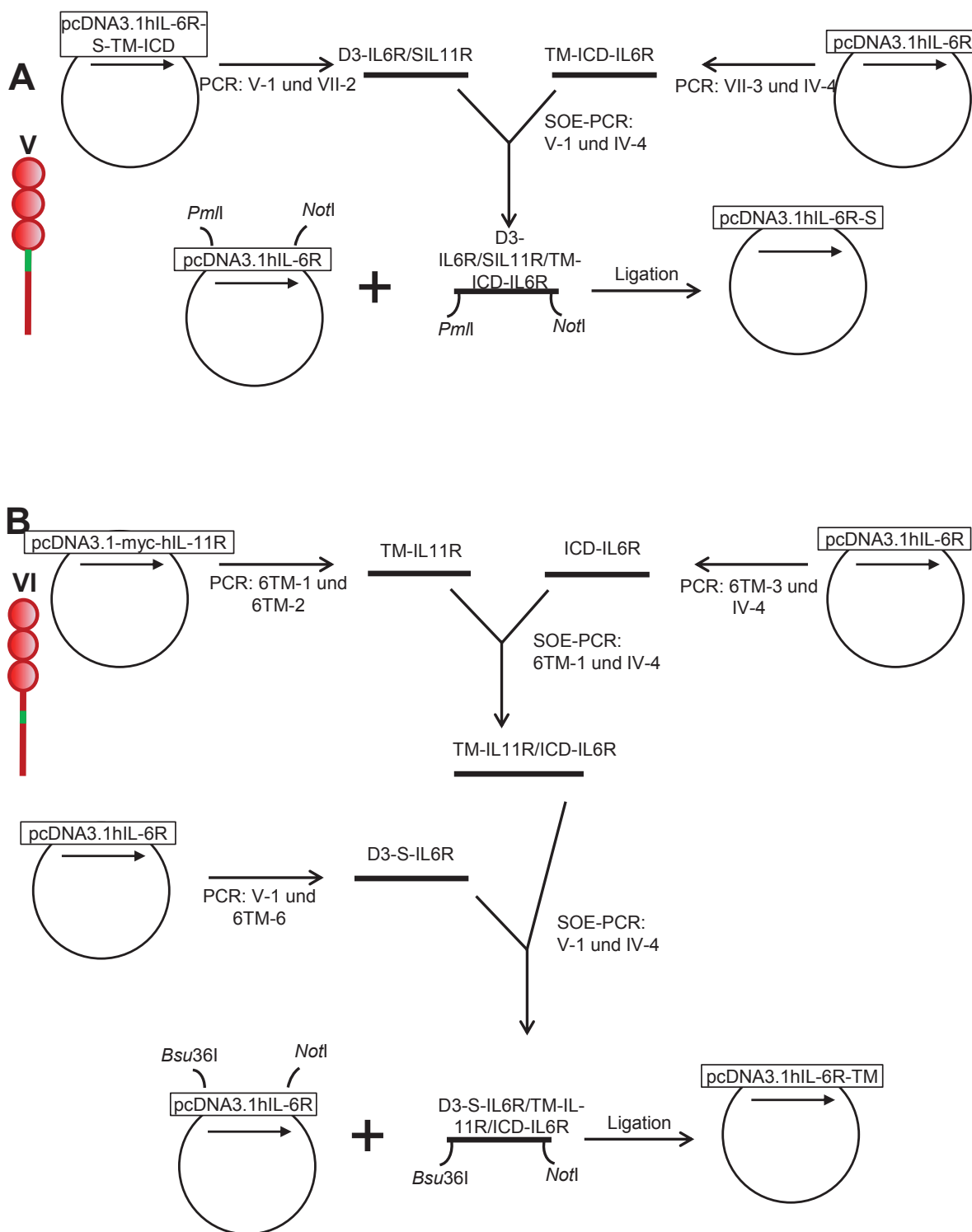


Abbildung 6.6: Klonierungsverfahren von Chimäre V (A) und VI (B) in pcDNA3.1-Vektor. Anschließend erfolgte die Umklonierung in den pMOWs-Vektor. Nähere Erklärungen finden sich in Abschnitt 4.3.

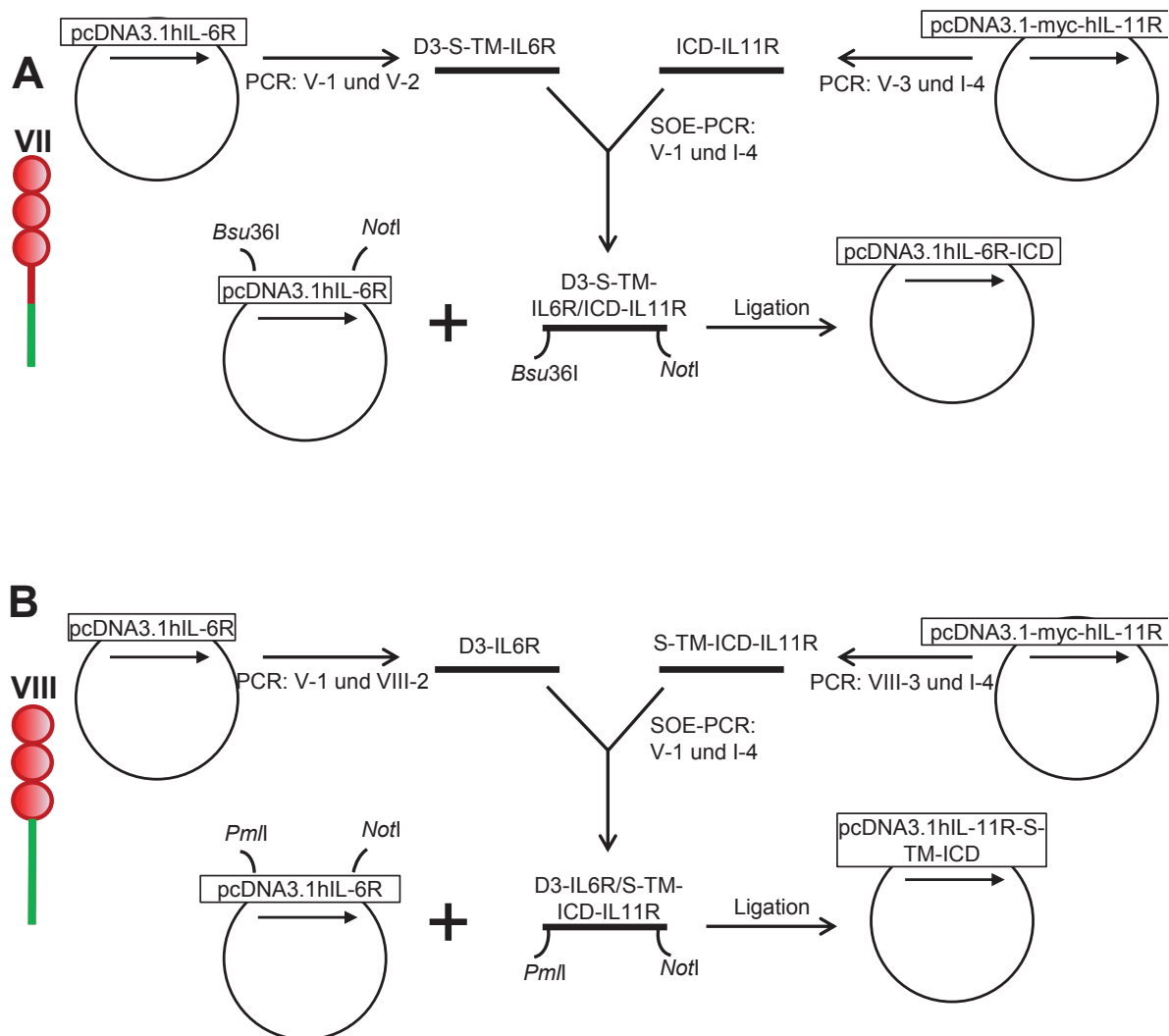


Abbildung 6.7: Klonierungsverfahren von Chimäre VII (A) und VIII (B) in pcDNA3.1-Vektor. Anschließend erfolgte die Umklonierung in den pMOWs-Vektor. Nähere Erklärungen finden sich in Abschnitt 4.3.

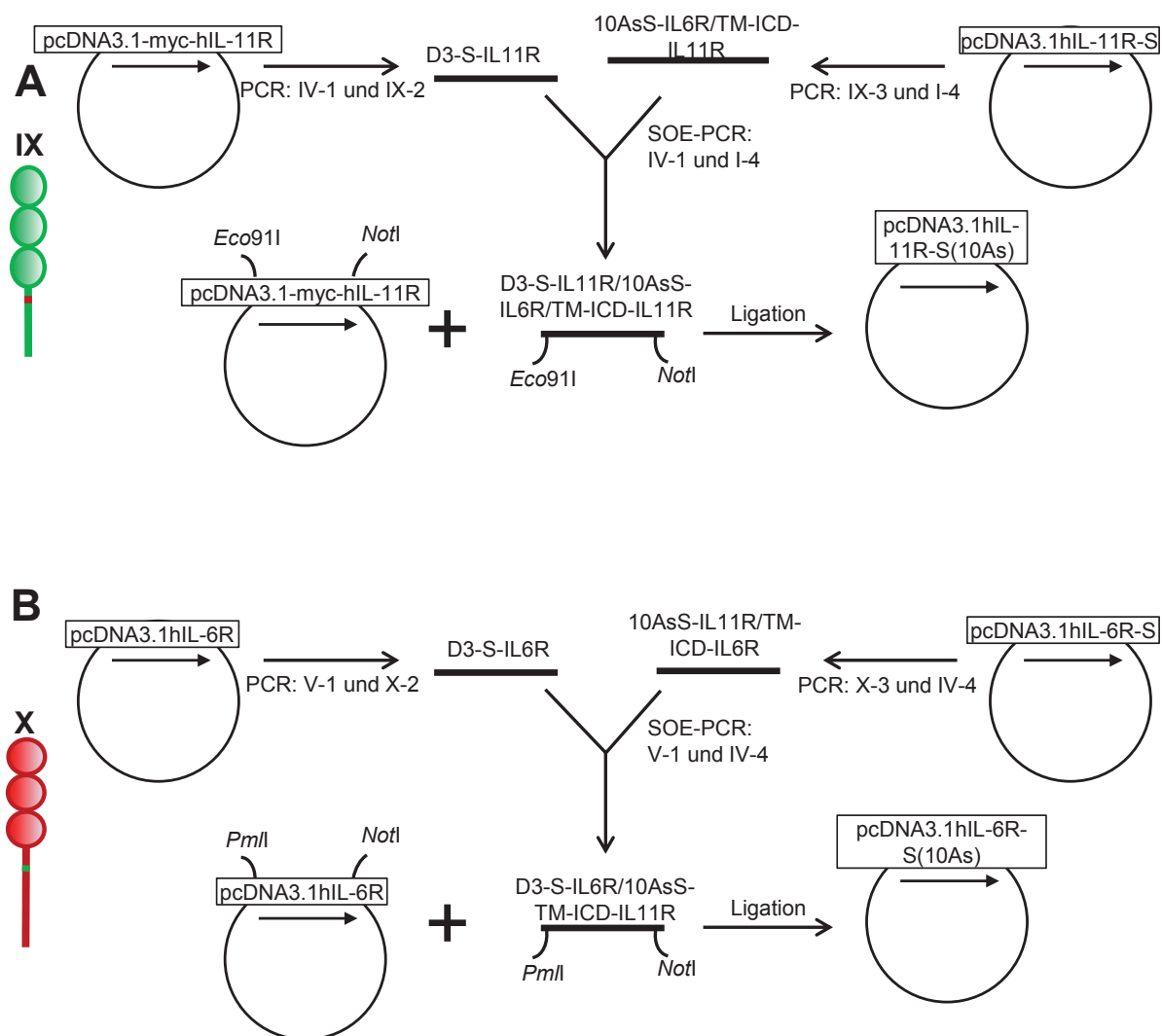
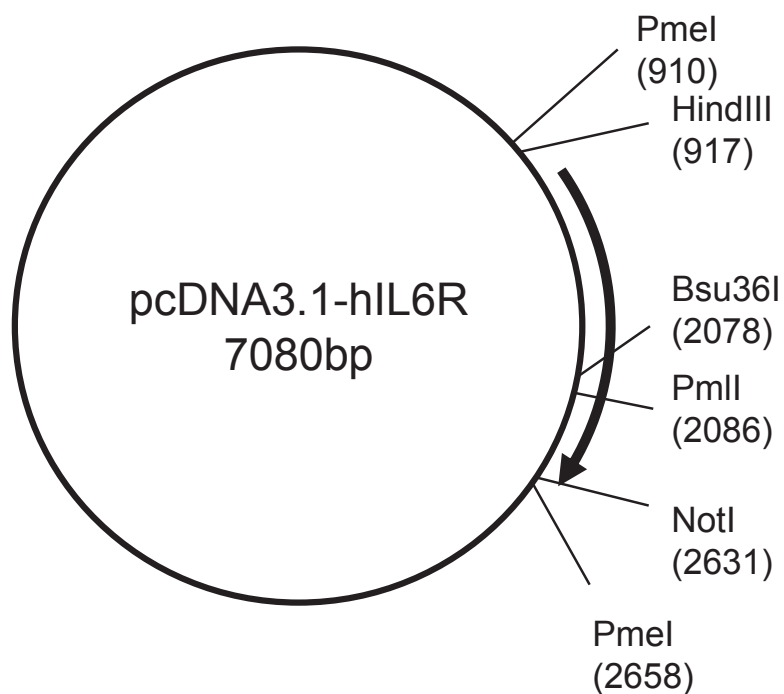


Abbildung 6.8: Klonierungsverfahren von Chimäre IX (A) und X (B) in pcDNA3.1-Vektor. Anschließend erfolgte die Umklonierung in den pMOWs-Vektor. Nähere Erklärungen finden sich in Abschnitt 4.3.

6.5 Plasmidkarten

pcDNA3.1-hIL-6R



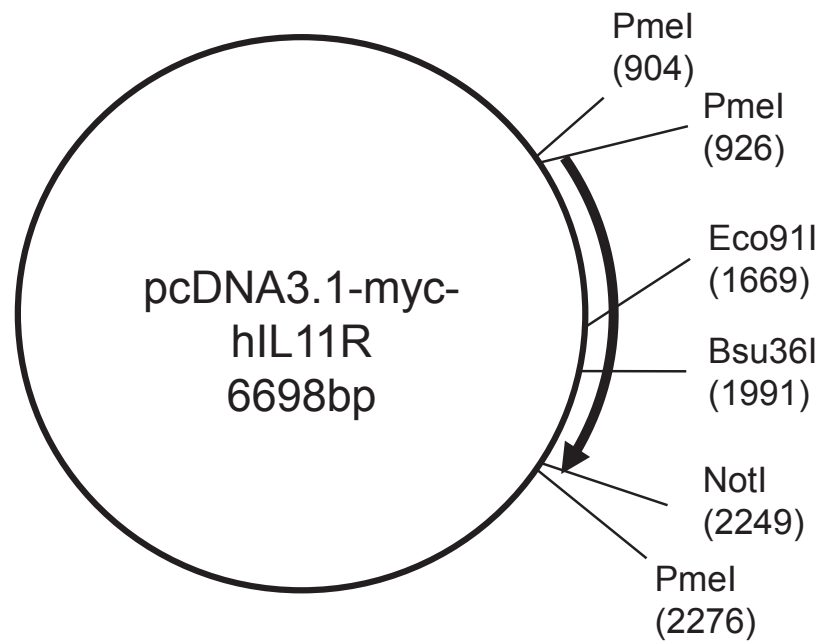
```

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTTCPGV 50
EPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSYRAG 100
RPAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRKSPLSNVCEWGPSTPSLTTKAVLLV 150
RKFQNSPAEDFQEPCQYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGS 200
KFSKTQTFQGCILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYR 250
LRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ 300
GEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNILFRDSAN 350
ATSLPVQDSSSVPLPTFLVAGGSLAFGTLLCIAIVLRFKKTWKLRALKEG 400
KTSMHPPYSLGQLVPERPRPTPVLVPLISPPVSPSSLGSDNTSSHNRPDA 450
RDPRSPYDISNTDYFFPR*

```

Abbildung 6.9: Plasmidkarte des **IL-6R** mit wichtigen Enzymschnittstellen und offener Leserahmen des Plasmids.

pcDNA3.1-myc-hIL-11R



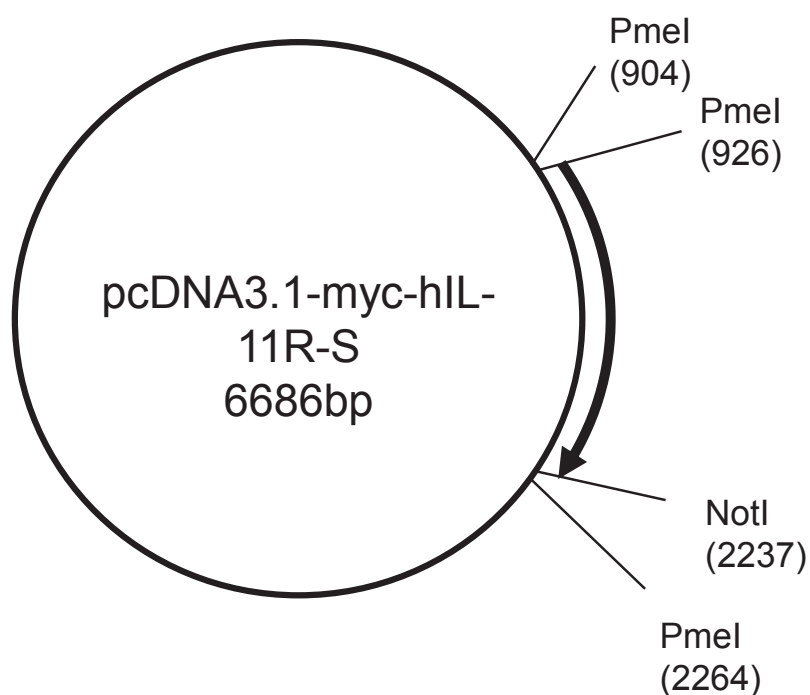
```

MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSEQKLI SEEDLKLSSPCPQAWGPPGVQ 50
YGQPGRSVKLCPCPGVTAGDPVSWFRDGE PKLLQGPDSGLGHELVLQAADS 100
TDEGTYICQTLDGALGGTVTLQLGYPPARPVVSCQAADYENFSC TWSPSQ 150
ISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSQRSPSTGPWPCPDPLGAARCVVHGAE 200
FWSQYRINVTEVNPLGASTRLLDVSLQSI LRPDPPQGLRVESVPGYPRRL 250
RASWTYPASWPCQPHFLLKFRLQYRPAQH PAWSTVEPAGLEEVITDAVAG 300
LPHAVRVSARDFLDAGTWSTWSPEAWGTP STGTIPKEIPAWGQLHTQPEV 350
EPQVDS PAPP RPSLQPHPRLLDHRDSVEQ VAVLASL GILSFLGLVAGALA 400
LGLWLRLRRGGKDGSPKPGFLASVIPVD RRRPGAPNL*

```

Abbildung 6.10: Plasmidkarte des **IL-11R** mit wichtigen Enzymschnittstellen und offener Leserahmen des Plasmids.

pcDNA3.1-myc-hIL-11R-S



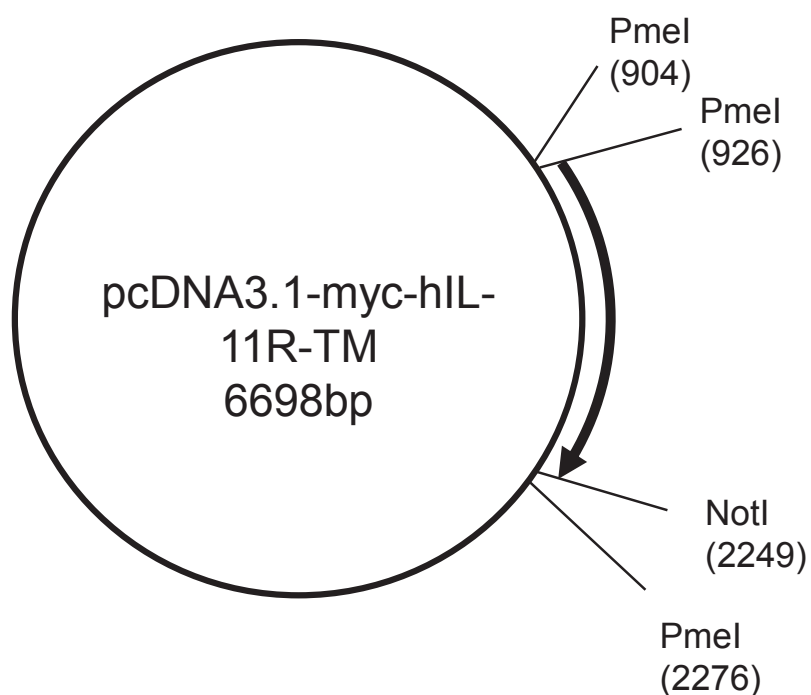
```

MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSEQKLI SEEDLKLSSPCPQAWGPPGVQ 50
YGQPGRSVKLCPCGVTAGDPVSWFRDGE PKLLQGPDSGLGHELVL AQADS 100
TDEGTYICQTLDGALGGTVTLQLGYPPARPVVSCQAADYENF SCTWSPSQ 150
ISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSQRRSPSTGPWPCPDPLGAARCVVHGAE 200
FWSQYRINVTEVNPLGASTRLLDVSLQSI LRPDPPQGLRVESVPGYPRRL 250
RASWTYPASWPCQPHFLLKFRLQYRPAQH PAWSTVEPAGLEEVITDAVAG 300
LPHAVRVSARDFLDAGTWSTWSPEAWGTPSTESRSPPAENEVSTPMQALT 350
TNKDDDNILFRDSANATSLPVQDSSSVPLPSLGILSFLGLVAGALALGLW 400
LRLRRGGKDGSPKPGFLASVIPVDRRPGAPNL*

```

Abbildung 6.11: Plasmidkarte der **Chimäre I** mit wichtigen Enzymschnittstellen und offener Leserahmen des Plasmids. Die Aminosäuresequenz der Stalk-Region des IL-6R ist unterstrichen.

pcDNA3.1-myc-hIL-11R-TM



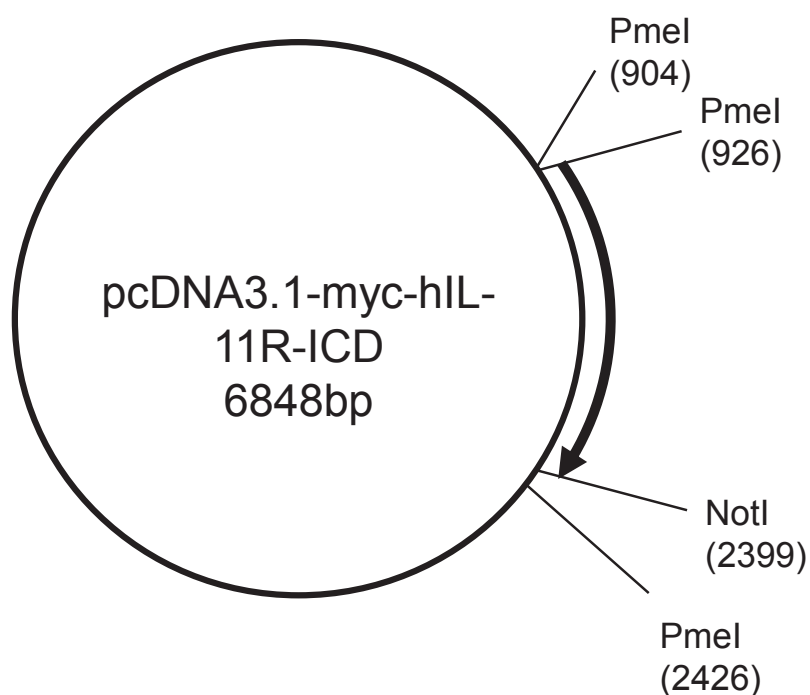
```

MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSEQKLI SEEDLKLSSPCPQAWGPPGVQ 50
YGQPGRSVKLCPCPGVTAGDPVSWFRDGE PKLLQGPDSGLGHELVL AQADS 100
TDEGTYICQTLDGALGGTVTLQLGYPPARPVVSCQAADYENF SCTWSPSQ 150
ISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSQRRSPSTGPWPCPDPLGAARCVVHGAE 200
FWSQYRINVTEVNPLGASTRLLDVSLQSI LRPDPPQGLRVESVPGYPRRL 250
RASWTYPASWPCQPHFLLKFR LQYRPAQH PAWSTVEPAGLEEVITDAVAG 300
LPHAVRVSARDFLDAGTWSTWSPEAWGTPSTGTIPKEI PAWGQLHTQPEV 350
EPQVDS PAPP RPSLQPHPRLLDHRDSVEQVA VLATFLVAGGSLAFG TLLC 400
IAIVLRLRRGGKDGSPKPGFLASVIPVDRRPGAPNL*

```

Abbildung 6.12: Plasmidkarte der **Chimäre II** mit wichtigen Enzymschnittstellen und offener Leserahmen des Plasmids. Die Aminosäuresequenz der Transmembran-Region des IL-6R ist unterstrichen.

pcDNA3.1-myc-hIL-11R-ICD



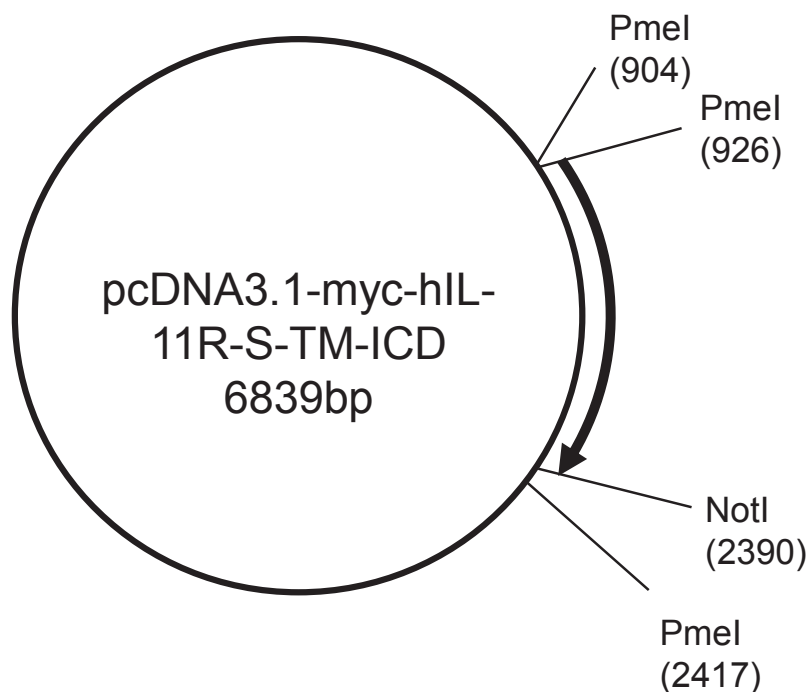
```

MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSEQKLI SEEDLKLSSPCPQAWGPPGVQ 50
YGQPGRSVKLCPCPGVTAGDPVSWFRDGE PKLLQGPDSGLGHELVL AQADS 100
TDEGTYICQTLDGALGGTVTLQLGYPPARPVVSCQAADYENF SCTWSPSQ 150
ISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSQRRSPSTGPWPCPDPLGAARCVVHGAE 200
FWSQYRINVTEVNPLGASTRLLDVSLQSI LRPDPPQGLRVESVPGYPRRL 250
RASWTYPASWPCQPHFLLKFRLQYRPAQH PAWSTVEPAGLEEVITDAVAG 300
LPHAVRVSARDFLDAGTWSTWSPEAWGTPSTGTIPKEIPAWGQLHTQPEV 350
EPQVDS PAPP RPSLQPHPRLLDHRDSVEQVA VLASLGILSFLGLVAGALA 400
LGLLRFKKTWKL RALKEGKTSMHPPYSLGQLVPERPRPTPVLVPLISPPV 450
SPSSLGSDNTSSHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPR*

```

Abbildung 6.13: Plasmidkarte der Chimäre III mit wichtigen Enzymschnittstellen und offener Leserahmen des Plasmids. Die Aminosäuresequenz der Intrazellulär-Region des IL-6R ist unterstrichen.

pcDNA3.1-myc-hIL-11R-S-TM-ICD



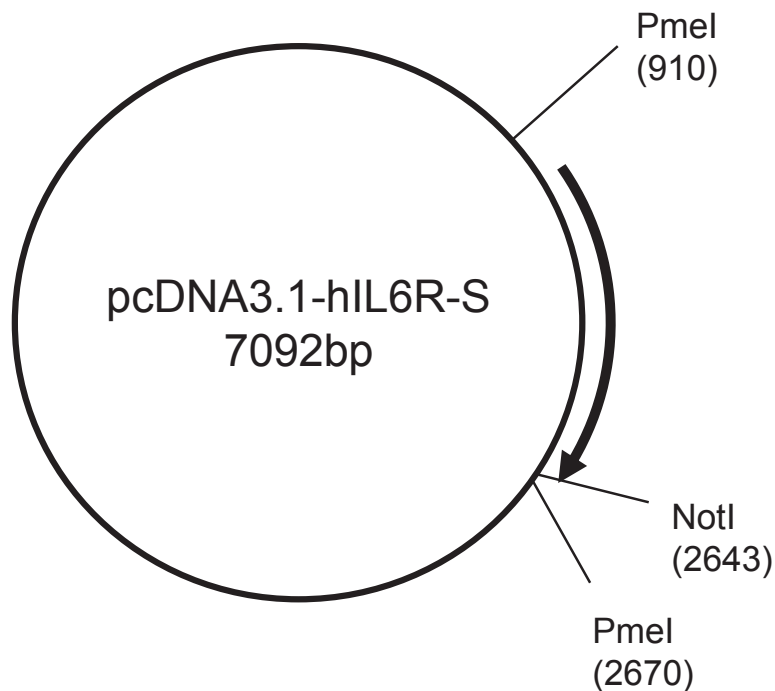
```

MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSEQKLI SEEDLKLSSPCPQAWGPPGVQ 50
YGQPGRSVKLCPCPGVTAGDPVSWFRDGE PKLLQGPDSGLGHELVL AQADS 100
TDEGTYICQTLDGALGGTVTLQLGYPPARPVVSCQAADYENF SCTWSPSQ 150
ISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSQRRSPSTGPWPCPDPLGAARCVVHGAE 200
FWSQYRINVTEVNPLGASTRLLDVSLQSI LRPDPPQGLRVESVPGYPRRL 250
RASWTYPASWPCQPHFLLKFRLQYRPAQH PAWSTVEPAGLEEVITDAVAG 300
LPHAVRVSARDFLDAGTWSTWSPEAWGTPSTESRSPPAENEVSTPMQALT 350
TNKDDDNILFRDSANATSLPVQDSSSVPLPTFLVAGGSLAFGTLLCIAIV 400
LRFKKTWKLRLALKEGKTSMHPPYSLGQLVPERPRPTPVLVPLISPPVSPS 450
SLGSDNTSSHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPR*

```

Abbildung 6.14: Plasmidkarte der Chimäre IV mit wichtigen Enzymschnittstellen und offener Leserahmen des Plasmids. Die Aminosäuresequenz der Stalk-, Transmembran- und Intrazellular-Region des IL-6R ist unterstrichen.

pcDNA3.1-hIL-6R-S



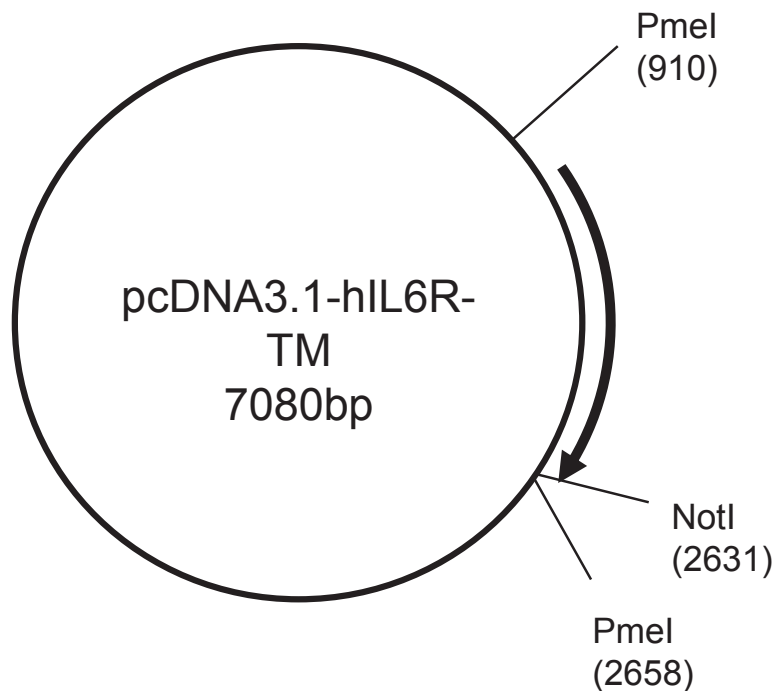
```

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLLTCPGV 50
EPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSYRAG 100
RPAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRKSPLSNVCEWGPRSTPSLTTKAVLLV 150
RKFQNSPAEDFQEPQYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGS 200
KFSKTQTFQGCILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYR 250
LRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ 300
GEWSEWSPEAMGTPWTGTIPKEIPAWGQLHTQPEVEPQVDSPAPPRPSLQ 350
PHPRLLDHRDSVEQVAVLATFLVAGGSLAFGTLLCIAIVLRFKKTWKLRA 400
LKEGKTSMHPPYSLGQLVPERPRPTPVLVPLISPPVSPSSLGSDNTSSHN 450
RPDARDPRSPYDISNTDYFFPR*

```

Abbildung 6.15: Plasmidkarte der Chimäre V mit wichtigen Enzymschnittstellen und offener Leserahmen des Plasmids. Die Aminosäuresequenz der Stalk-Region des IL-11R ist unterstrichen.

pcDNA3.1-hIL-6R-TM



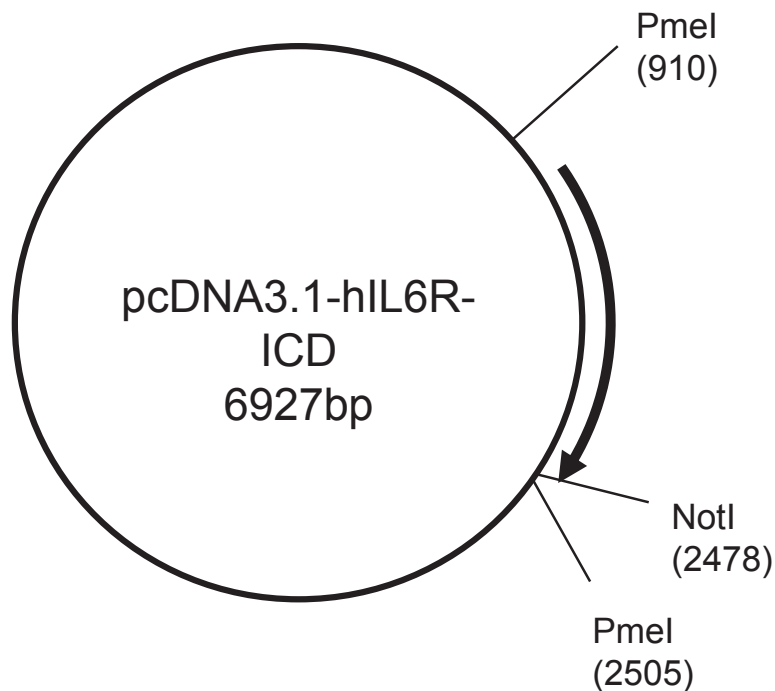
```

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLLTCPGV 50
EPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSYRAG 100
RPAGTVHLLVDVPEEPQLSCFRKSPLSNVCEWGPRSTPSLTTKAVLLV 150
RKFQNSPAEDFQEPQYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGS 200
KFSKTQTFQGCILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYR 250
LRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ 300
GEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNILFRDSAN 350
ATSLPVQDSSSVPLPSLGILSFLGLVAGALALGLWLRFKKTWKLRLALKEG 400
KTSMHPPYSLGQLVPERPRPTPVLVPLISPPVSPSSLGSDNTSSHNRPDA 450
RDPRSPYDISNTDYFFPR*

```

Abbildung 6.16: Plasmidkarte der Chimäre VI mit wichtigen Enzymschnittstellen und offener Leserahmen des Plasmids. Die Aminosäuresequenz der Transmembran-Region des IL-11R ist unterstrichen.

pcDNA3.1-hIL-6R-ICD



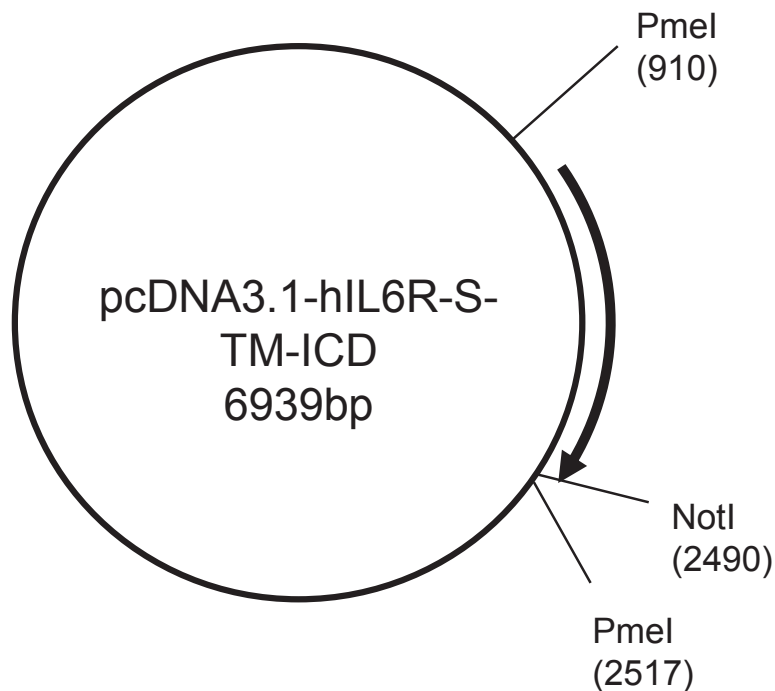
```

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTTCPGV 50
EPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSYRAG 100
RPAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRKSPLSNVCEWGPRSTPSLTTKAVLLV 150
RKFQNSPAEDFQEPQYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGS 200
KFSKTQTFQGC GILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYR 250
LRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ 300
GEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNILFRDSAN 350
ATSLPVQDSSSVPLPTFLVAGGSLAFGTL L CIAIVLRLRRGGKDGSPKPG 400
FLASVIPVDRRPGAPNL*

```

Abbildung 6.17: Plasmidkarte der Chimäre VII mit wichtigen Enzymschnittstellen und offener Leserahmen des Plasmids. Die Aminosäuresequenz der Intrazellulär-Region des IL-11R ist unterstrichen.

pcDNA3.1-hIL-6R-S-TM-ICD



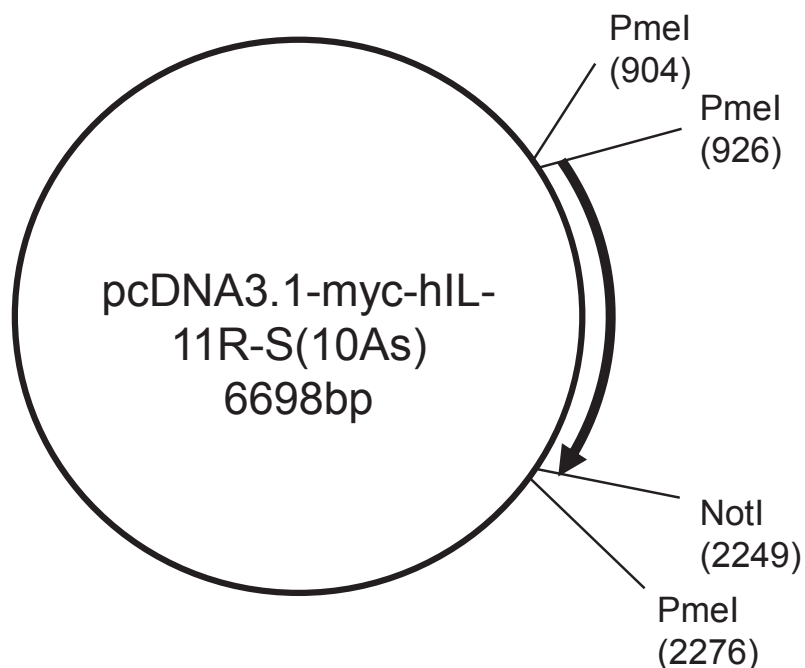
```

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLLTCPGV 50
EPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSYRAG 100
RPAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRKSPLSNVCEWGPRSTPSLTTKAVLLV 150
RKFQNSPAEDFQEPQYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGS 200
KFSKTQTFQGCILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYR 250
LRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ 300
GEWSEWSPEAMGTPWTGTIPKEIPAWGQLHTQPEVEPQVDSPAPPRPSLQ 350
PHPRLLDHRDSVEQVAVLASLGILSFLGLVAGALALGLWLRLRRGGKDG 400
PKPGFLASVIPVDRRPGAPNL*

```

Abbildung 6.18: Plasmidkarte der Chimäre VIII mit wichtigen Enzymschnittstellen und offener Leserahmen des Plasmids. Die Aminosäuresequenz der Stalk-, Transmembran- und Intrazellular-Region des IL-11R ist unterstrichen.

pcDNA3.1-myc-hIL-11R-S(10As)



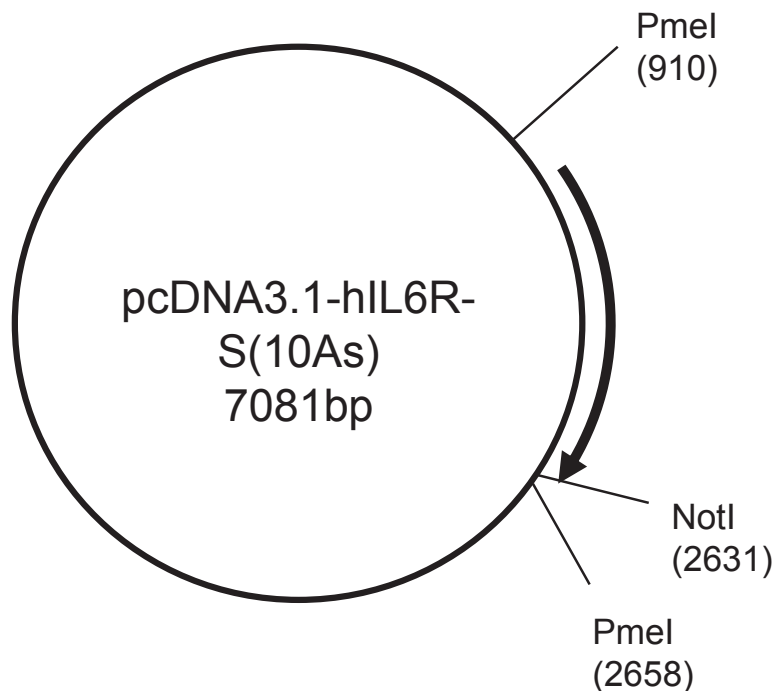
```

MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSEQKLI SEEDLKLSSPCPQAWGPPGVQ 50
YGQPGRSVKLCPCPGVTAGDPVSWFRDGE PKLLQGPDSGLGHELVLAQADS 100
TDEGTYICQTLDGALGGTVTLQLGYPPARPVVSCQAADYENFSC TWSPSQ 150
ISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSQRRSPSTGPWPCPDPLGAARCVVHGAE 200
FWSQYRINVTEVNP LGASTRLLDVSLQSI LRPDPPQGLRVE SVPGYPRRL 250
RASWTYPASWPCQPHFLLKFRLQYRPAQH PAWSTVEPAGLEEVITDAVAG 300
LPHAVRVSARDFLDAGTWSTWSP EAWGTPSTGTIPKEI PAWGQLHTQPEV 350
EPQVDSPAPPRPSLQPHPRLLDHRVQDSSSVPLPSLGILSFLGLVAGALA 400
LGLWLRRLRRGGKDGSPKPGFLASVIPVDRRPGAPNL*

```

Abbildung 6.19: Plasmidkarte der Chimäre IX mit wichtigen Enzymschnittstellen und offener Leserahmen des Plasmids. Die Aminosäuresequenz der fünf Aminosäuren ober- und unterhalb der ADAM17-Schnittstelle in der Stalk-Region des IL-6R ist unterstrichen.

pcDNA3.1-hIL-6R-S(10As)



```

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTTCPGV 50
EPEDNATVHWWLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLRVQLHDSGNYSYRAG 100
RPAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRKSPNSNVCEWGPRSTPSLTTKAVLLV 150
RKFQNSPAEDFQEPQYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGS 200
KFSKTQTFQCGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYR 250
LRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ 300
GEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALT TNKDDDNI LFRDSAN 350
ATSLPDSVEQVAVLATFLVAGGSLAFGTL L CIAIVLRFKKTWKLRALKEG 400
KTSMHPPYSLGQLVPERPRPTVPLVPLISPPVSPSSLGSDNTSSHNRPDA 450
RDPRSPYDISNTDYFFPR*

```

Abbildung 6.20: Plasmidkarte der **Chimäre X** mit wichtigen Enzymschnittstellen und offener Leserahmen des Plasmids. Die Aminosäuresequenz der letzten zehn Aminosäuren der Stalk-Region des IL-11R ist unterstrichen.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller, der es mir möglich machte an seinem Institut die experimentelle Wissenschaft kennenzulernen und dessen Tür immer offen stand.

Dr. Christoph Garbers danke ich für seine engagierte und enge Betreuung, seine grenzenlose Unterstützung und seine Ruhe.

Dr. Samadhi Aparicio Siegmund danke ich für Ihre wissenschaftliche Expertise, auf die ich immer zurückgreifen durfte und für ihre herzliche und offene Art.

Simone Mrotzek danke ich für ihre Freundschaft und den aufmunternden Austausch.

Ein großer Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II, die meine Fragen beantwortet haben und mir weiterhalfen. Danke an Petra, Jan, Madhu, Fabian, Doreen, Ilse, Ferri, Zeynep und Anja.

Besonderer Dank gilt Dr. Annika Sommerfeld und Dr. Katja Möller-Hackbarth für die enge Zusammenarbeit und ihre freundliche Hilfe.

Ich möchte auch meinen Schwestern Annemarie und Barbara danken, für ihre offenen Ohren und bereitwillige Korrektur. Meiner Mutter Anke danke ich für ihr Vertrauen und unsere aufbauende Gespräche.

Jens danke ich für seine Geduld und dass er immer für mich da ist.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Duisburg, 4. Dezember 2016

Rebecca Lucia Nitz