

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller

Tandem-LT α -LT β -Release in einem iRhom2-/TACE-defizienten System

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der medizinischen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marius Jonas

2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Colin R. MacKenzie

“It apparently's all very complicated and it involves ribosomes.”

- *StarCraft II, Blizzard Entertainment*

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	3
Zusammenfassung	4
1. Einleitung	6
1.1 Kernmitglieder der TNF-Superfamilie	6
1.2 Das Lymphotoxinsystem	8
1.2.1 Liganden und Rezeptoren	8
1.2.2 Rolle des LT-Systems bei der lymphatischen Organogenese	10
1.2.3 Rolle des LT-Systems bei der Leberregeneration	11
1.3 <i>Shedding</i> von LT β	12
1.3.1 Aufbau und Struktur von iRhom2 und ADAM17	13
1.3.2 iRhom2-reguliertes <i>Shedding</i> durch ADAM17	14
1.3.3 <i>Shedding</i> von LT β durch ADAM17	17
1.3.4 Physiologische Bedeutung von ADAM17 und iRhom2	17
2. Zielsetzung dieser Arbeit	19
3. Material und Methoden	20
3.1 Material	20
3.1.1 Antibiotika	20
3.1.2 Antikörper	20
3.1.3 Chemikalien	20
3.1.4 Geräte	21
3.1.5 Kits	22
3.1.6 Kulturmedien	23
3.1.7 Oligonukleotide	23
3.1.8 Plasmide	24
3.1.9 Puffer und Lösungen	24
3.1.10 Verbrauchsmaterialien	26
3.1.11 Zelllinien	26
3.1.12 Zytokine	27
3.1.13 Software und Websites	27
3.2 Methoden	27
3.2.1 Molekularbiologische Methoden	27
3.2.1.1 Messung von DNA-Konzentrationen	27
3.2.1.2 Agarosegelelektrophorese	27
3.2.1.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	28
3.2.1.4 Restriktion der DNA über Endonukleasen	28
3.2.1.5 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	29
3.2.1.6 Phosphorylierung von DNA	29
3.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten	29
3.2.1.8 Transformation in chemisch kompetente XL1-Blue Bakterien	31
3.2.1.9 Mini-Präparation von Plasmid-DNA	31
3.2.1.10 Midi-Präparation von Plasmid-DNA	31
3.2.1.11 PCR	32
3.2.1.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA	36
3.2.2 Proteinbiochemische Methoden	37

3.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten	37
3.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)	37
3.2.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.2.2.4 Western Blot	38
3.2.2.5 Enzyme-Linked-Immunoabsorbent-Assay (ELISA)	39
3.2.3 Zellkultur	39
3.2.3.1 Kultivierung von adhärennten und Suspensionszellen	39
3.2.3.2 Transfektion von HEK293- und Phoenix-Eco-Zellen	40
3.2.3.3 Retrovirale Transduktion	40
3.2.3.4 Proliferationsassay	41
3.2.3.5 <i>Starving</i> von HEK293T- und Jurkat-T-Zellen	42
3.2.3.6 Induziertes <i>Shedding</i>	42
3.2.3.7 Durchflusszytometrie	42
4. Ergebnisse	43
4.1 Klonierung der Expressionsvektoren für LT α und LT β	44
4.1.1 Expression von LT α und LT β in HEK293T-Zellen	54
4.1.2 Erzeugung stabiler Ba/F3-gp130-Zellen mit LT α und LT β	56
4.2 Generierung von LT β -Deletionsmutanten	57
4.2.1 Expression der Deletionsmutanten in HEK293T- und Ba/F3-gp130-Zellen	60
4.3 Der Einfluss von ADAM10 und ADAM17 auf die LT α -Sekretion	61
4.3.1 Die <i>Shedding</i> -Analyse von LT α erfordert die Entwicklung eines spezifischen Assays	61
4.3.2 PMA-Stimulation führt zu einer Steigerung der LT α -Sekretion	63
4.3.3 Der Einfluss der ADAM-Inhibition auf die LT α -Sekretion unterliegt einer zeitlichen Kinetik	64
4.3.4 Die Erhöhung der Konzentration der ADAM-Inhibitoren beeinflusst die LT α -Sekretion maßgeblich	65
4.3.5 Eine hochkonzentrierte Inhibition von Metalloproteinasen bewirkt ein Erliegen der LT α -Sekretion	67
5. Diskussion	70
5.1 Tandem-Expression von LT α und LT β	70
5.2 <i>Shedding</i> -Analyse von LT β	74
5.3 Induzierte LT α -Sekretion in Jurkat-T-Zellen	76
5.4 Einfluss von ADAM10 und ADAM17 auf die LT α -Sekretion	77
5.5 Ausblick	80
6. Literaturverzeichnis	82
7. Anhang	92
8. Danksagung	101

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung	LIGHT	<i>Lymphotoxin homolog which exhibits inducible expression and competes with the herpes simplex virus glycoprotein D for binding of HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes</i>
ADAM17	<i>a Disintegrin and Metalloproteinase 17</i>	LT α	Lymphotoxin alpha
ADAM10	<i>a Disintegrin and Metalloproteinase 10</i>	LT β	Lymphotoxin beta
AS	Aminosäure	LT β R	Lymphotoxin-beta-Rezeptor
BCA	Bicinchoninsäure	MPD	<i>membrane-proximal domain</i>
bp	Basenpaare	min	Minuten
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CANDIS	<i>Conserved Adam seventeenN Dynamic Interaction Sequence</i>	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>	PHx	partielle Hepatektomie
cPCR	<i>Colony PCR</i>	PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
DMSO	Dimethylsulfoxid	PNK	Polynukleotidkinase
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	rpm	<i>rounds per minute</i>
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat	RT	Raumtemperatur
<i>E. coli</i>	Escherichia coli	SOE-PCR	<i>Splicing-by-Overlap-Extension PCR</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>	SDS	Sodiumdodecylsulfat
ELISA	<i>Enzyme-Linked-Immunoabsorbent-Assay</i>	THD	<i>TNF homology domain</i>
<i>et al.</i>	und weitere	TIMP3	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>	TMD	Transmembrandomäne
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>	THD	<i>TNF homology domain</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>	TIMP3	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3</i>
gp	Glykoprotein	TMD	Transmembrandomäne
h	Stunde	TNFRp55	<i>TNF receptor p55</i>
HVEM	<i>herpes virus entry mediator</i>	TNFRp75	<i>TNF receptor p75</i>
IL	Interleukin	TNFRSF	<i>TNF-Receptor-Superfamily</i>
ILC3	<i>innate lymphoid cells type 3</i>	TNFSF	<i>TNF superfamily</i>
IRHD	<i>iRhom homology domain</i>	WT	Wildtyp
iRhom2	<i>inactive Rhomboid protein 2</i>	ZKÜ	Zellkulturüberstand
KO	<i>Knock out</i>	Δ	Deletion

Zusammenfassung

Lymphotoxin α und Lymphotoxin β sind Zytokine aus der TNF-Superfamilie. Ein Komplex aus den Enzymen iRhom2 und ADAM17 trennt Lymphotoxin β von der Zellmembran ab und überführt es in seine lösliche Form. Lymphotoxin α hingegen liegt ausschließlich in löslicher Form vor, eine membrangebundene Form existiert nicht. Durch initiale Voruntersuchungen im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein *Knock-out* von iRhom2 zu einer erheblich verringerten Sekretion von Lymphotoxin α führen kann. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie dieser Effekt zu erklären ist.

Zur Beantwortung dieser Frage gelang im Rahmen dieser Arbeit die Etablierung eines Sheddingassays zur Untersuchung der Sekretion des humanen und murinen Lymphotoxin α . Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von ADAM10 und ADAM17 zu einer verringerten Lymphotoxin α -Sekretion führt, was die Ergebnisse der Voruntersuchungen bestätigt und auf eine bislang nicht bekannte Interaktion von ADAM10 und ADAM17 hinweist.

Zur genaueren Analyse erfolgte die Generierung von stabilen Zellen, die in der Lage sind, Lymphotoxin α und β in gleichen Mengen zu synthetisieren. In Kombination mit spezifisch generierten Plasmiden zur selektiven Expression von Lymphotoxin α oder Lymphotoxin β können diese genutzt werden, um die Mechanismen der Anlagerung der LT α - und LT β -Monomere zu biologisch aktiven Trimeren zu untersuchen.

Da derzeit der funktionelle Unterschied zwischen membranständigem und löslichem Lymphotoxin β unklar ist, erfolgte eine *in silico*-Analyse der Proteindomäne, in der bei Transmembrandomänen das Shedding stattfindet. Diese Region wird auch als Stalk-Region bezeichnet. Im Anschluss erfolgten Deletionen in unterschiedlichen Bereichen der Stalk-Region, die zur Analyse des *Sheddings* in weiterführenden Arbeiten genutzt werden können.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Effekt einer Inhibition von ADAM17 bzw. iRhom2 auf die Lymphotoxin α -Sekretion experimentell nachgewiesen werden. Überdies fanden sich Hinweise auf eine Beteiligung von ADAM10 an der Regulierung der Expression von Lymphotoxin α und Lymphotoxin β . Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen somit zum Verständnis der Signaltransduktion des Lymphotoxin-Systems sowie dessen Rolle bei der Leberregeneration bei.

Summary

Lymphotoxin α and lymphotoxin β are cytokines from the TNF superfamily. A complex of the enzymes iRhom2 and ADAM17 separates lymphotoxin β from the cell membrane and converts it into its soluble form. Lymphotoxin α , on the other hand, is only present in soluble form; a membrane-bound form does not exist. Initial preliminary investigations in the mouse model showed that knocking out iRhom2 can lead to a significant reduction in the secretion of lymphotoxin α . The aim of this study was to investigate how this effect can be explained.

To answer this question, a shedding assay was established to investigate the secretion of human and murine lymphotoxin α . It could be shown that inhibition of ADAM10 and ADAM17 leads to reduced lymphotoxin α secretion, which confirms the results of the preliminary investigations and indicates a previously unknown interaction of ADAM10 and ADAM17.

Stable cells capable of synthesizing equal amounts of lymphotoxin α and β were generated for more detailed analysis. In combination with specifically generated plasmids for the selective expression of lymphotoxin α or lymphotoxin β , these can be used to investigate the mechanisms of attachment of LT α and LT β monomers to biologically active trimers.

Since the functional difference between membrane-bound and soluble lymphotoxin β is currently unclear, an *in silico* analysis of the protein domain where shedding occurs in transmembrane domains was performed. This region is also referred to as the stalk region. Subsequently, deletions were made in different areas of the stalk region, which can be used to analyze the shedding in further studies.

In summary, the effect of inhibition of ADAM17 or iRhom2 on lymphotoxin α secretion was demonstrated experimentally in this study. Furthermore, evidence was found for the involvement of ADAM10 in the regulation of lymphotoxin α and lymphotoxin β expression. The results of this work thus contribute to the understanding of the signal transduction of the lymphotoxin system and its role in liver regeneration.

1. Einleitung

1.1 Kernmitglieder der TNF-Superfamilie

Zytokine sind sekretorische Proteine, die Wachstum, Differenzierung, Aktivierung und Apoptose von Immunzellen und -prozessen induzieren und regulieren können. Somit spielen sie eine zentrale Rolle im Ablauf von Immunantworten, der Migration von Immunzellen und dem zellulären Aufbau von Immunorganen (Borish & Steinke, 2003). Zytokine sind Polypeptide; ihre Molekülmasse liegt im Bereich von ca. 15 – 25 kDa. Die Wirkung von Zytokinen ist pleiotrop, da sie mit unterschiedlichen Zellarten interagieren und je nach Zellart unterschiedliche Antworten bewirken können. Umgekehrt können jedoch unterschiedliche Zytokine in einer Zelle die gleiche Antwort auslösen, sie verfügen also über funktionelle Redundanz (Löffler & Petrides, 2014). Anhand von strukturellen Homologien werden Zytokine in Proteinfamilien unterteilt, so etwa die hämatopoetischen Zytokine, Interleukin 1 und verwandte Proteine, sowie die *Tumor Necrosis Factor* (TNF) Superfamilie (TNFSF) (Parham *et al.*, 2002, Dostert *et al.*, 2019).

Die TNFSF besteht aus derzeit 19 Liganden, die eng verwandte Gruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF) aus 29 unterschiedlichen Rezeptoren (Dostert *et al.*, 2019). Zu den Kernmitgliedern zählen die Liganden TNF α (Tumornekrosefaktor alpha), LT α_3 (Lymphotoxin alpha), LT β (Lymphotoxin beta) und LIGHT (*Lymphotoxin homolog which exhibits inducible expression and competes with the herpes simplex virus glycoprotein D for binding of HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes*) sowie ihre Rezeptoren TNFRp55 (*TNF receptor p55*, TNFR1), TNFRp75 (*TNF receptor p75*, TNFR2), LT β R (*lymphotoxin beta receptor*) und HVEM (*herpes virus entry mediator*) (Hehlgans & Pfeffer, 2005).

Bei den Liganden handelt es sich um Typ-II-Transmembranproteine, die ein strukturelles Motiv, die *TNF homology domain* (THD) teilen. Die THD ist verantwortlich für die TNFSF-charakteristische Bildung von Trimeren. Zudem ermöglicht sie eine Bindung an die TNF-Rezeptoren. Bei den Trimeren handelt es sich dabei, mit Ausnahme von LT β , stets um Homotrimere (Sudhamsu *et al.*, 2013). Die meisten TNF-Liganden, so auch TNF α , werden in einer membrangebundenen Form exprimiert, manche können jedoch mittels Proteasen in eine lösliche Form umgewandelt werden, was für die Wirksamkeit dieser Liganden entscheidend ist (Bodmer *et al.*, 2002).

Die TNF-Rezeptoren hingegen sind überwiegend Typ-I-Transmembranproteine, die ebenfalls in membrangebundener oder löslicher Form vorliegen können; die lösliche Form entsteht hier entweder durch Proteolyse oder alternatives *Splicen* (Dostert *et al.*, 2019) und spielt eine essentielle Rolle bei der Regulierung der jeweiligen Liganden (McDermott *et al.*, 1999). Die Extrazellulärdomäne der Rezeptoren ist charakterisiert durch eine Cystein-reiche Domäne, die die Bindung der Liganden ermöglicht. Wie die Liganden bilden auch die Rezeptoren Trimere, wobei Bindungen stets zwischen einem Rezeptormonomer und zwei Ligandenmonomeren erfolgen; so wird sichergestellt, dass nur ein intaktes Ligandentriemer zu einer Signaltransduktion führt (Vanamee & Faustman, 2018, Banner *et al.*, 1993).

Die Kernmitglieder der TNF-Superfamilie sowie die Interaktionen der Liganden mit den Rezeptoren und die dadurch aktivierten Signalwege sind in Abbildung 1 dargestellt.

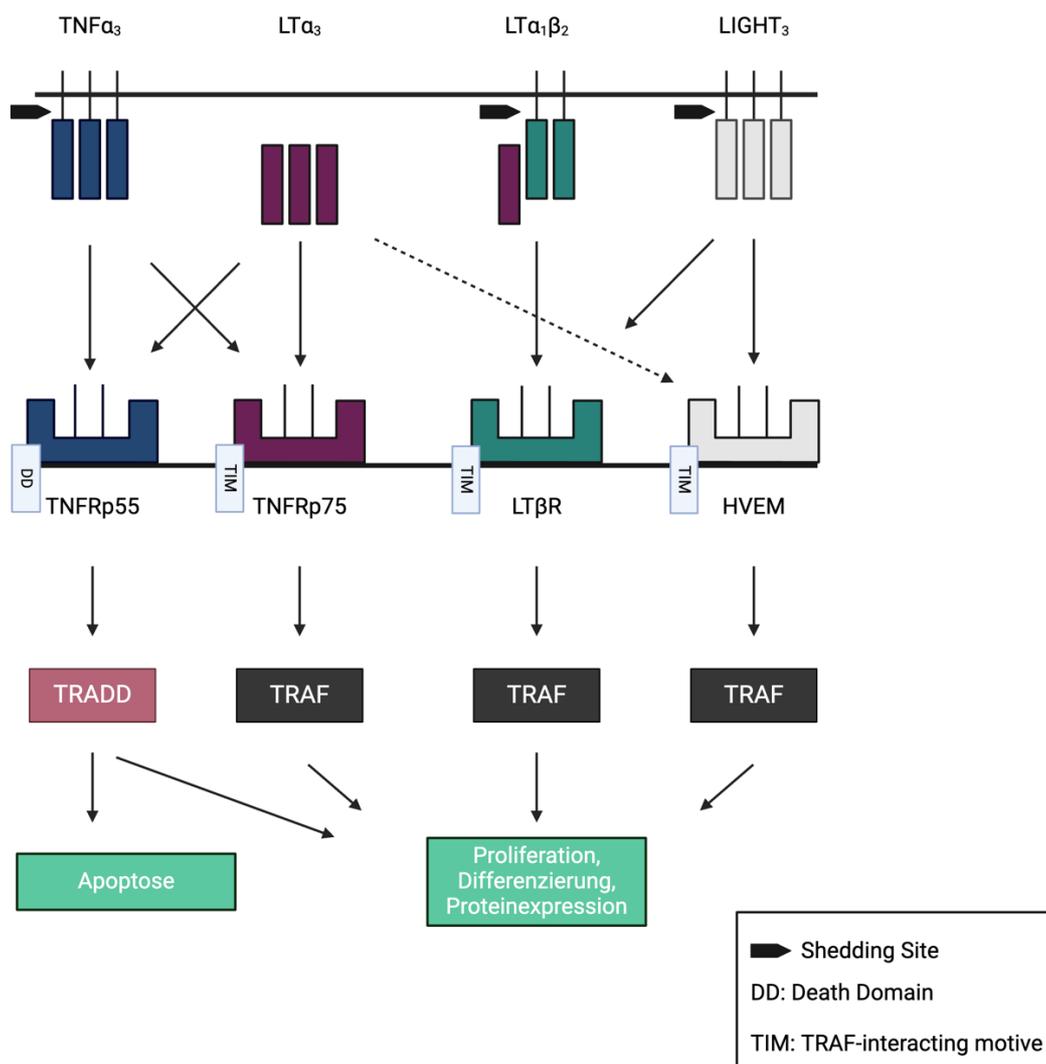


Abb. 1: Übersicht der Kernmitglieder der TNF/TNFR-Superfamilie. $\text{TNF}\alpha_3$, $\text{LT}\alpha_3$, $\text{LT}\alpha_1\beta_2$ (im Folgenden $\text{LT}\beta$) und LIGHT zählen zu den Kernmitgliedern. $\text{TNF}\alpha_3$, $\text{LT}\beta$ und LIGHT verfügen über Transmembrandomänen und können durch Proteasen von der Zellmembran abgetrennt werden. Diese Zytokine liegen somit in einer membrangebundenen und einer löslichen Form vor. Hingegen verfügt $\text{LT}\alpha_3$ über keine Transmembrandomäne und liegt ausschließlich in membranständiger Form vor. TNFRp55 wird von $\text{TNF}\alpha_3$ und $\text{LT}\alpha_3$ gebunden und führt über eine Aktivierung von TRADD (*Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*) zur Apoptose, während TNFRp75 , der ebenfalls von $\text{TNF}\alpha_3$ und $\text{LT}\alpha_3$ gebunden wird, über TRAF (*Tumor necrosis factor receptor associated factor*) zur Zellproliferation führt. Weiterhin zählen $\text{LT}\beta\text{R}$ und HVEM zu den Kernrezeptoren des TNFR-Superfamilie; diese Rezeptoren bewirken wie TNFRp75 eine Zellaktivierung über TRAF. Während HVEM selektiv nur LIGHT bindet, können sowohl LIGHT als auch $\text{LT}\beta$ an den $\text{LT}\beta\text{R}$ binden.

1.2 Das Lymphotoxinsystem

Das Lymphotoxinsystem besteht aus den Zytokinen $\text{LT}\alpha$ und $\text{LT}\beta$ sowie ihren Rezeptoren TNFR1 , TNFR2 , $\text{LT}\beta\text{R}$ und HVEM und ist somit Teil des $\text{LT}/\text{TNF}/\text{LIGHT}$ -Netzwerks (Ware, 2005, vgl. Abbildung 1), das für die Ausbildung lymphatischer Gewebe von zentraler Bedeutung ist.

1.2.1 Liganden und Rezeptoren

In seiner physiologisch wirksamen Form liegt $\text{LT}\alpha$ als Homotrimer vor, bestehend aus drei $\text{LT}\alpha$ -Untereinheiten mit einer Gesamtmasse von 33 kDa (Browning *et al.*, 1993). Während der trimere Aufbau dieses Zytokins charakteristisch für die TNF-Superfamilie ist, unterscheidet sich $\text{LT}\alpha$ von den übrigen Mitgliedern dahingehend, dass es über keine Transmembrandomäne verfügt und somit nur in löslicher Form vorliegt (Remouchamps *et al.*, 2011). Sezerniert wird $\text{LT}\alpha$ von B-Zellen, T-Zellen, natürlichen Killerzellen und ILC3 (*innate lymphoid cells type 3*) (Tumanov *et al.*, 2009, Browning *et al.*, 1997, Kabashima *et al.*, 2005, Upadhyay & Fu, 2013). $\text{LT}\alpha$ -Homotrimere können an TNFR1 , TNFR2 und HVEM (*Herpesvirus Entry Mediator*) binden (Ware *et al.*, 2005, vgl. Pfeile in Abb. 1).

$\text{LT}\beta$ ist ein Heterotrimer und entsteht bei einer Koexpression von $\text{LT}\alpha$ - und $\text{LT}\beta$ -Monomeren. Hierbei kann es bei dem Heterotrimer zu verschiedenen Kombinationen bzw. Isoformen kommen: $\text{LT}\alpha_1\beta_2$ und $\text{LT}\alpha_2\beta_1$; d.h. es lagern sich 1 oder 2 $\text{LT}\alpha$ -Monomeren an 1 oder 2 β -Monomere an (Browning *et al.*, 1995). Die β -Monomere verfügen über eine Typ-II-Transmembrandomäne, weshalb $\text{LT}\beta$ in membrangebundener Form vorliegt (Borelli & Irla, 2021). Die $\text{LT}\alpha_2\beta_1$ -Isoform verfügt

nach aktuellem Kenntnisstand über keine biologische Funktion und wird nur in sehr geringen Mengen synthetisiert (Browning *et al.*, 2005). Die $LT\alpha_1\beta_2$ -Form, vereinfachend als $LT\beta$ bezeichnet, wird zu den Mitgliedern der TNF-Superfamilie und des Lymphotoxinsystems gezählt. Gebildet wird $LT\beta$ von B-, T-, und NK-Zellen (Crowe *et al.*, 1994) und bindet in membranständiger Form ausschließlich an den *Lymphotoxin β Receptor* ($LT\beta R$) (Ansel *et al.*, 2001). Da dieser wiederum von fast allen Zelltypen, außer lymphatischen Zellen ausgebildet wird, dienen $LT\beta$ und sein Rezeptor vor allem der Interaktion von Immunzellen mit ihrer Umgebung (Tumanov *et al.*, 2009, Borelli & Irla, 2021).

$LT\beta$ kann, ebenso wie $TNF\alpha$, durch *Tumor necrosis factor Alpha Converting Enzyme* {TACE, auch ADAM17(*a disintegrin and metalloprotease 17*)} von der Zellmembran proteolytisch gespalten und in eine lösliche Form überführt werden (Al-Salihi & Lang, 2020). Dieser Prozess wird als *Shedding* bezeichnet.

Neben den oben genannten Zytokinen zählen auch die Rezeptoren, an die $LT\alpha$ und $LT\beta$ binden, zum Lymphotoxin-System. $TNFR1$ und $TNFR2$ können sowohl von $LT\alpha$ als auch von $TNF\alpha$ gebunden werden (Browning *et al.*, 1995) und sind Typ-I-Transmembranproteine mit weitestgehend identischen Extrazellulärdomänen. Ihre Intrazellulärdomänen unterscheiden sich dahingehend, dass $TNFR1$ über eine *death domain (DD)* verfügt, die bei $TNFR2$ nicht vorliegt; entsprechend unterscheiden sich die Rezeptoren deutlich in ihrer Signalkaskade (vgl. Abb. 1, untere Hälfte).

$TNFR1$ wird von nahezu allen Zelltypen des Körpers exprimiert, darunter auch lymphatischen Zellen, und führt bei Bindung eines Liganden über die *TNFR1-associated death domain* (TRADD) und die *Fas-associated death domain* (FADD) zur Apoptose. $TNFR2$ hingegen wird lediglich von CD4- und CD8-positiven T-Zellen, endothelialen Zellen, Oligodendrozyten, Kardiomyozyten, Thymozyten und mesenchymalen Stammzellen exprimiert (Ware *et al.*, 1991, Arnett *et al.*, 2001, Dopp *et al.*, 2002, Irwin *et al.*, 1999, Grell *et al.*, 1998, Böcker *et al.*, 2008). Der Rezeptor wirkt über Aktivierung des NF- κ B-Signalweges anti-apoptotisch und proliferativ (Faustman & Davis, 2010). Die durch $TNFR1$ induzierte Apoptose entfällt in dieser Signalkaskade aufgrund der fehlenden Rekrutierung von TRADD.

HVEM wird hierbei vor allem von Zellen des Thymus, der Milz und der Lunge ausgebildet (Hsu *et al.*, 1997) und spielt eine entscheidende Rolle bei der Infektion mit *Herpes simplex* Viren (Kopp *et al.*, 2012)

LT β R bindet LT β und LIGHT und wird von fast allen Zelltypen ausgebildet, jedoch nicht von hämatopoetischen Zellen (Häussinger, 2011). Somit unterscheidet sich dieser Rezeptor dahingehend von TNFR1 und TNFR2, dass sein primärer Ligand kein Homotrimer, sondern mit LT $\alpha_1\beta_2$ ein Heterotrimer ist (Fütterer *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu TNFR1 verfügt LT β R über keine *DD* (Chang *et al.*, 2002). Erfolgt eine Bindung von LT β wird die kanonische und nicht-kanonische Signalkaskade des NF- κ B-Signalweges aktiviert (Dostert *et al.*, 2019). Es resultieren immunregulatorische Prozesse: die Ausschüttung von Zytokinen, die Sezernierung von Wachstumsfaktoren oder die Induktion von Apoptose (Oeckinghaus & Ghosh, 2009).

1.2.2 Rolle des LT-Systems bei der lymphatischen Organogenese

Die physiologische Bedeutung des Lymphotoxinsystems auf den Organismus basiert vor allem auf Erkenntnissen, die im Mausmodell gewonnen wurden. Hierbei spielt die Verwendung von sogenannten Knock out Mäusen (KO; Gendefekte) für LT α , LT β , TNFR1, TNFR2 und LT β R eine maßgebliche Rolle (Ware *et al.*, 2005). Entsprechende Phänotypen sind hierzu in Tabelle 1 zusammengefasst.

Ein *Knock out* von LT α oder LT β führte zu einer fehlenden Anlage von Peyer-Plaques und Lymphknoten, einhergehend mit einer starken Deformierung der Milz (De Togni *et al.*, 1994). Dennoch zeigten alle LT β ^{-/-}Mäuse (Alimzhanov *et al.*, 1997, Koni *et al.*, 1997) sowie 5% der LT α ^{-/-}Mäuse (Banks *et al.*, 1995) rudimentäre Anlagen von Lymphknoten im Mesenterium, bei denen sich anstelle von Lymphknotenketten nur isolierte Lymphknoten bildeten. Dies deutet daraufhin, dass ein von Lymphotoxin unabhängiger Mechanismus zur Bildung von Lymphknoten in diesem Areal existiert (Ware *et al.*, 2005). TNFR1-defiziente Mäuse zeigen zwar keine Beeinträchtigungen bei der Ausbildung von Lymphknoten (Pasparakis *et al.*, 2000), jedoch finden sich bei diesen Tieren keine Peyer-Plaques (Ware *et al.*, 2005). Ein *Knock out* von TNFR2 hingegen führt nicht zu morphologischen Veränderungen der lymphatischen Organe (Ware *et al.*, 2005)

Tab. 1: Auswirkungen unterschiedlicher *Knock outs* auf lymphatisches Gewebe (modifiziert nach Ware *et al.*, 2005 und Fu & Chaplin, 1999)

Gendeletion	Phänotyp		
	Lymphknoten	Peyer-Plaques	Milz-Architektur ^a
LT α	- ^d	-	dysplastisch
LT β	- ^d	-	dysplastisch
LT β -B ^b	+	+	dysplastisch
LT β -T ^c	+	+	+
TNFR1	+	-	dysplastische Marginalzone
TNFR2	+	+	+
LT β R	-	-	dysplastisch

^aAufbau der weißen Pulpa mit Trennung von T- und B-Zellzone, Marginalzone, Keimzentrum und dendritischem Netzwerk

^bLT β aus B-Zellen

^cLT β aus T-Zellen

^dAnlagen von mesenterialen Lymphknoten

normal: +; fehlt: -

Bei einem LT β R-*Knock out* kommt es zu einem vollständigen Fehlen von Lymphknoten, einschließlich der veränderten Anlagen, die sich bei LT $\alpha^{-/-}$ und LT $\beta^{-/-}$ Mäusen finden ließen (Fütterer *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu waren mit Milz und Thymus die primären lymphatischen Organe zwar angelegt, jedoch zeigten sich deutliche Veränderungen in ihrer Architektur. Dies deutet darauf hin, dass der LT β R die Entwicklung sekundärer Organe vollständig steuert, während er bei primären lymphatischen Organen zwar für deren Struktur und Architektur verantwortlich ist, nicht jedoch für die Entwicklung (Fütterer *et al.*, 1998).

1.2.3 Rolle des LT-Systems bei der Leberregeneration

Die Leber verfügt über eine im menschlichen Körper einzigartige Regenerationsfähigkeit. Während die meisten Gewebe in begrenztem Umfang zu Regeneration fähig sind, kann die murine Leber selbst bei einem Verlust von 75% ihrer Gesamtmasse in nur ein bis zwei Wochen vollständig regenerieren (Häussinger, 2011). An diesem komplexen Prozess sind zahlreiche Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Zytokine, aber auch Zellen des Immunsystems beteiligt (Taub, 2004), darunter B- und T-Zellen. Auch im physiologischen Zustand befinden sich im Lebergewebe sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen sowie einige B-Zellen, wenn auch in geringerer Zahl (Racanelli & Rehermann, 2006).

Während naive T-Zellen unter physiologischen Bedingungen nicht mit nicht-lymphatischen Parenchymzellen interagieren, zeigt sich eine solche Interaktion

zwischen CD8+ T-Zellen und den sinusoidalen Epithelzellen der Leber (Warren *et al.*, 2006), wodurch eine Beeinflussung der Leberfunktion durch das Immunsystem ermöglicht wird. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass LIGHT und LT β regulierend in den Fettstoffwechsel der Leber eingreifen (Lo *et al.*, 2007).

Eine besondere Rolle kommt der Interaktion von T-Zellen mit den Hepatozyten bei der Leberregeneration zu. Unter physiologischen Bedingungen beträgt bei Wildtyp-Mäusen (WT) das Gewicht der Leber 5% der Körpermasse (Behnke *et al.*, 2013). So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass im Rahmen einer partiellen Hepatektomie (PHx) bis zu 70% der Leber entfernt werden kann, ohne dass dies zu einer erhöhten Mortalität führt (Martins *et al.*, 2008). Bei LT β -T-Zell-KO-Mäusen, also einem selektiven *Knock out* von LT β , das durch T-Zellen synthetisiert wurde, zeigte sich jedoch ein deutlicher Anstieg der Mortalität nach PHx. Bei LT β -B-Zell-KO-Mäusen, deren B-Zellen durch *Knock out* kein LT β synthetisieren können, zeigten sich dagegen im Vergleich mit WT Mäusen keine Unterschiede in der Mortalität (Tumanov *et al.*, 2009). Eine Erhöhung der Sterblichkeit nach PHx zeigte sich außerdem bei LT α *Knock out* (LT $\alpha^{-/-}$) (Anders *et al.*, 2005) als auch LIGHT *Knock out* (LIGHT $^{-/-}$) Tieren, was die Bedeutung der Liganden des LT-Systems bei der Leberregeneration unterstreicht.

Sowohl bei TNFR1 $^{-/-}$ als auch bei LT β R $^{-/-}$ -Mäusen, die einen *Knock out* in den jeweiligen Rezeptoren haben, zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Mortalität nach PHx (Yamada *et al.*, 1998, Tumanov *et al.*, 2009), nicht jedoch bei TNFR2-defizienten Tieren (Yamada *et al.*, 1998).

Dies deutet darauf hin, dass die Transkriptionsfaktoren RelA-p50 und RelB-p52, die durch TNFR1 über den kanonischen NF- κ B-Signalweg beziehungsweise durch LT β R über den nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweg (Hehlhans und Pfeffer 2005, Oeckinghaus *et al.*, 2011) aktiviert werden, für die Leberregeneration entscheidend sind. Die Signalkaskade von TNFR2 spielt hier nur eine untergeordnete Rolle.

1.3 Shedding von LT β

Wie in 1.2.1 beschrieben, liegt LT β zunächst in membrangebundener Form vor und kann von der Zellmembran abgetrennt werden, wodurch das Zytokin in seine lösliche Form überführt wird. Dieser *Shedding*-Prozess erfolgt durch die Protease TACE, die auch als ADAM17 bezeichnet wird, die wiederum durch iRhom2 (*inactive Rho* protein 2) reguliert wird.

1.3.1 Aufbau und Struktur von iRhom2 und ADAM17

Rhomboids sind eine Familie von Transmembranproteinen (Düsterhöft *et al.*, 2017), die sogenannten *iRhoms* (Freeman, 2016), welche sich in zwei Subgruppen gliedern lassen: zum einen in die katalytisch aktiven Serin-Proteasen (Sturtevant *et al.*, 1993), zum anderen in die katalytisch inaktiven Pseudoproteasen (Lemberg & Freeman, 2007). Zu dieser Untergruppe zählen die Enzyme iRhom1 und iRhom2.

Strukturell bestehen *iRhoms* aus 6 Transmembranhelices (TMH), die charakteristisch für die Rhomboid-Superfamilie sind und als *rhomboid-fold* bezeichnet werden. Im Gegensatz zu den katalytisch aktiven Rhomboiden verfügen *iRhoms* jedoch über eine zusätzliche Transmembranhelix, was zu einer sogenannten 6+1-Topologie führt (Lemberg & Freeman, 2007). Ein weiterer struktureller Bestandteil von *iRhoms* ist die N-terminale zytosolische Region, die etwa 400 AS lang ist und eine wesentliche Rolle für das ADAM17-gesteuerte *Shedding* spielt (Cavadas *et al.*, 2017, vgl. Abschnitt 1.3.2). Das dritte strukturelle Element von *iRhoms* ist die sogenannte *iRhom homology domain* (IRHD), die zwischen TMH1 und TMH2 liegt und spezifisch für *iRhoms* ist (Düsterhöft *et al.*, 2019). Struktur und Funktion der IRHD sind Gegenstand aktueller Forschung; bekannt ist lediglich, dass das Fehlen dieser Domäne zu einer schlechteren Bindung von *iRhoms* an ADAM17 führt (Grieve *et al.*, 2017). Eine schematische Darstellung der Struktur von iRhom2 findet sich in Abb. 2 .

ADAM17 ist eine Metalloproteinase, für die mehr als 90 verschiedene Substrate bekannt sind (Düsterhöft *et al.*, 2019). Da das erste identifizierte Substrat TNF α war, wird die Protease auch als *TNF α converting enzyme* (TACE) bezeichnet (Black *et al.*, 1997). Das katalytische Zentrum von ADAM17 befindet sich in der Metalloproteinase-Domäne, die über ein zentrales Zn²⁺-Ion verfügt. In unreifem proADAM17 findet sich zudem eine Prodomäne, die das katalytische Zentrum blockiert und während des Reifungsprozesses abgestoßen wird (Düsterhöft *et al.*, 2019). Diese beiden Domänen bilden gemeinsam mit der an die Metalloproteinase-Domäne gebundenen *disintegrin-like*-Domäne die Multidomänenstruktur, die alle Mitglieder der ADAM-Familie teilen (Calvete *et al.*, 2005, Düsterhöft *et al.*, 2019).

Weiterhin findet sich bei ADAM17 die *membrane-proximal domain* (MPD), an die sich eine *Stalk Region* anschließt, welche als *Conserved Adam seventeen Dynamic Interaction Sequence* (CANDIS) bezeichnet wird (Düsterhöft *et al.*, 2014). Hieran ist eine Transmembrandomäne gebunden, die in einer intrazellulär gelegenen

Schwanzregion endet (Düsterhöft *et al.*, 2019). Die Struktur von ADAM17 ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

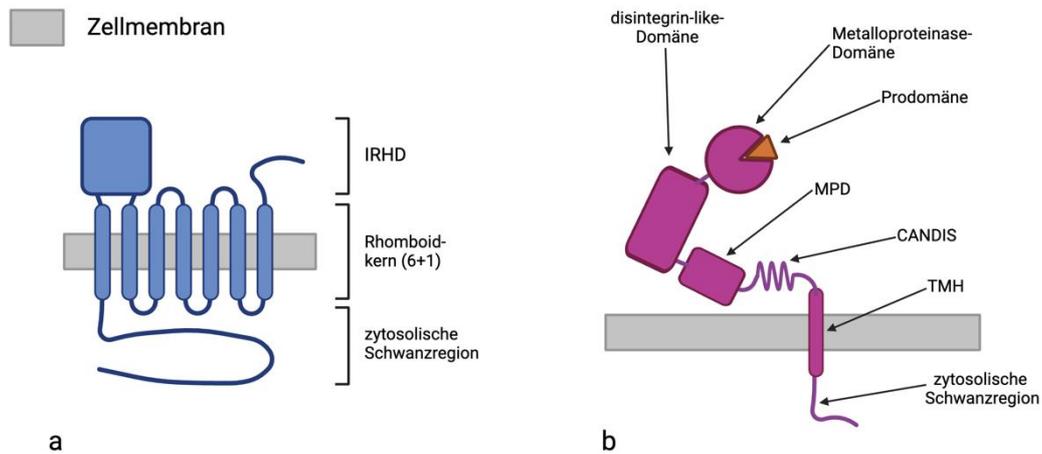


Abb. 2: Struktur und strukturelle Domänen von iRhom2 (links) und (pro-)ADAM17 (rechts). iRhom2 besteht aus 7 Transmembranhelices, die das Protein in der Zellmembran verankern. Diese werden als Rhomboidkern bezeichnet. Im Extrazellulärraum befindet sich die *iRhom* homology domain (IRHD), die zur Bindung von iRhom2 an ADAM17 beiträgt. Intrazellulär liegt die zytosolische Schwanzregion, die entscheidend für das ADAM17-induzierte *Shedding* ist. ADAM17 verfügt über eine einzelne Transmembrandomäne. Über die *Conserved Adam seventeen Dynamic Interaction Sequence* (CANDIS) ist diese mit der extrazellulär gelegenen *membrane-proximal domain* (MPD) und der *disintegrin-like* Domäne verbunden. Hieran schließt sich die Metalloproteinase-Domäne an, die das katalytische Zentrum von ADAM17 darstellt. In unreifem pro-ADAM17 findet sich zudem eine Prodomäne, die das katalytische Zentrum blockiert und im Reifungsprozess abgespalten wird.

1.3.2 iRhom2-reguliertes *Shedding* durch ADAM17

Um katalytisch aktiv zu sein, muss ADAM17 mehrere posttranslationale Modifikationen durchlaufen. Hierzu bindet iRhom2 im endoplasmatischen Retikulum an das noch unreife proADAM17, woraufhin der Proteinkomplex in den Golgi-Apparat transportiert wird (Schlöndorff *et al.*, 2000, vgl. Abb. 3a). Hier wird durch die Proprotein-Konvertase Furin die inhibitorisch wirkende Pro-Domäne abgespalten (Wong *et al.*, 2015, vgl. Abb. 3b). Zunächst erfolgt jedoch keine vollständige Dissoziation der Prodomäne. Stattdessen wird diese durch die iRhom2-ADAM17-Interaktionsstelle D457 fixiert, wodurch eine vorzeitige Aktivierung der Proteaseaktivität von ADAM17 verhindert wird (Lu *et al.*, 2024, vgl. Abb. 3b). Erst nach Bindung an die Zellmembran wird die Pro-Domäne endgültig freigegeben, wodurch ADAM17 katalytisch aktiv wird. Überdies erfolgt im Golgi-Apparat die Phosphorylierung der zytoplasmatisch Schwanzregion durch den Proteinkinase-C-Signalweg (Killock & Ivetic, 2010). Durch diese

Phosphorylierung ist ein Weitertransport des Proteinkomplexes an die Zellmembran möglich. Zudem verhindert die Phosphorylierung eine Bindung von TIMP3 (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3*) (Wisniewska *et al.*, 2008). Somit verhindert die Phosphorylierung eine Inhibition von ADAM17.

Wenn der Komplex aus iRhom2 und ADAM17 nach Abschluss der posttranslationalen Modifikationen die Zellmembran erreicht, wird dieser durch das an iRhom2 gebundene Protein FRMD8 stabilisiert (Künzel *et al.*, 2008) und nach Freigabe der Pro-Domäne katalytisch aktiv (Lu *et al.*, 2024).

Auch nach dem Transport und der Reifung von ADAM17 beeinflusst iRhom2 die Aktivität der Metalloproteinase. Zwar ist zum *Shedding* die vorübergehende Trennung von iRhom2 und ADAM17 notwendig (Grieve *et al.*, 2017), jedoch sammelt sich überexprimiertes iRhom2 an der Zellmembran, was darauf hindeutet, dass iRhom2 auch dort eine relevante Rolle in der Funktion von ADAM17 spielt (Al-Salihi & Lang, 2020). So konnte gezeigt werden, dass iRhom2 ADAM17 von Endozytose und einem lysosomalen Abbau schützt (Kubo *et al.*, 2022). Die Interaktion von iRhom2 und ADAM17 wird durch die Beobachtung gestützt, dass die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 dadurch beeinflusst wird, ob an das Enzym iRhom1 oder iRhom2 gebunden ist (Maretzky *et al.*, 2013, Tang *et al.*, 2020,). Mediert wird die intermittierende Bindung von iRhom2 und ADAM17 durch das Protein 14-3-3, das durch ERK- und MAPK-abhängige Phosphorylierung an die zytosolische Schwanzdomäne gebunden werden kann. 14-3-3 bewirkt eine Dissoziation von ADAM17 und iRhom2, die das *Shedding* durch ADAM17 ermöglicht (Maney *et al.*, 2015). Nach spontaner Dissoziation von 14-3-3 kommt es zu einer Wiederanlagerung der Proteine, wodurch ADAM17-abhängiges *Shedding* inhibiert wird (Grieve *et al.*, 2017).

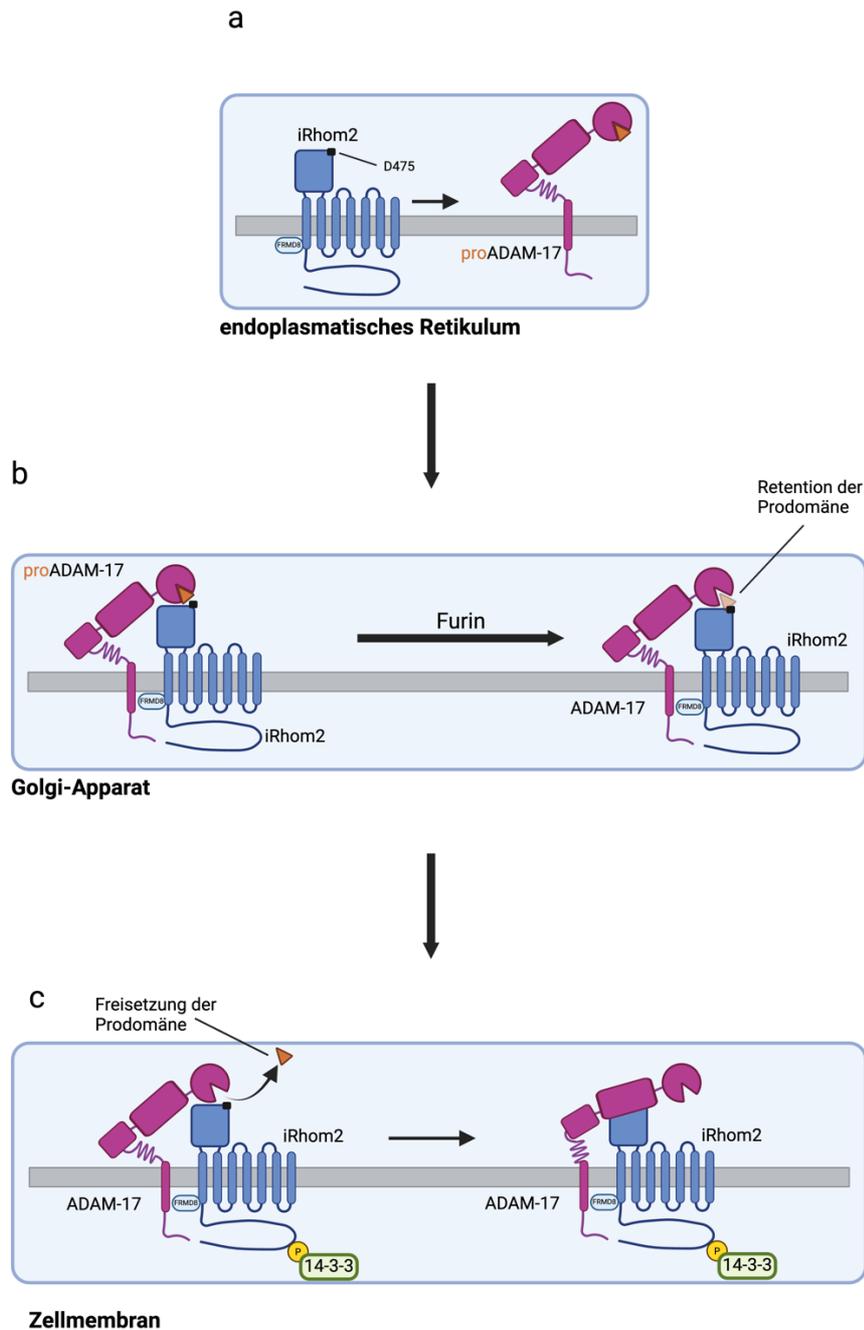


Abb. 3: Reifung, Transport und posttranslationale Modifikation von (pro-) ADAM17 durch iRhom2. a) Nach der Translation bindet proADAM17 im ER an iRhom2, woraufhin der Komplex in den GA transportiert wird. b) Im GA wird die inhibitorisch wirkende Pro-Domäne von ADAM17 durch die Proprotein-Kinase Furin abgespalten. Eine Dissoziation der Pro-Domäne wird zunächst durch die iRhom2-ADAM17-Interaktionsstelle D475 unterbunden, um einen vorzeitigen Beginn der Protease-Aktivität zu verhindern. c) Nach Translokation des iRhom2-ADAM17-Komplexes an die Zellmembran gibt D475 die Pro-Domäne frei, sodass ADAM17 nun katalytisch aktiv ist. Zudem lagert sich das Protein 14-3-3 an die zytosolische Schwanzregion von iRhom2 an, wodurch die Abspaltung von ADAM17 ermöglicht wird. Der inhibitorische Einfluss von iRhom2 wird aufgehoben und ADAM17 ist aktiv. Nach spontaner Dissoziation von 14-3-3 bindet iRhom2 erneut an ADAM17, wodurch die Protease erneut inhibiert wird.

Obgleich ADAM17 große strukturelle Übereinstimmungen mit der Metalloproteinase ADAM10 besitzt, binden sowohl iRhom1 als auch iRhom2 ausschließlich an ADAM17 (Christova *et al.*, 2013). Weiterhin bewirkt die sogenannte *sincure mutation (sin)*, eine Punktmutation in der ersten TMD von iRhom2, eine Veränderung der Substratspezifität von ADAM17 (Li *et al.*, 2017). Dies unterstreicht die Bedeutung der Interaktion von iRhom2 und ADAM17, die über die bloße Reifung von ADAM17 weit hinausgeht, auch wenn die genauen Mechanismen der Interaktion an der Zellwand derzeit noch weitestgehend unklar sind.

1.3.3 Shedding von LT β durch ADAM17

Das LT β -Heterotrimer ist ein Substrat von ADAM17 (Young *et al.*, 2010), wobei ADAM17 die *Stalk*-Region der β -Monomere von LT β durchtrennt und das membranständige Zytokin in seine lösliche Form umwandelt. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass beide Isoformen unterschiedliche physiologische Effekte erzielen. So führt lösliches LT β bei Patienten mit rheumatoider Arthritis zu einer verstärkten Aktivierung von Fibroblasten mit proinflammatorischer Wirkung (Young *et al.*, 2010), während membrangebundenes LT β eine entscheidende Rolle in der Leberregeneration (Sorg *et al.*, 2016, Tumanov *et al.*, 2009) sowie in der Ausbildung lymphatischer Organe (Tumanov *et al.*, 2003) spielt. Die biochemischen Hintergründe dieser unterschiedlichen Effekte sind derzeit noch unklar, insbesondere da beide Formen ausschließlich an den LT β R binden (Force *et al.*, 1995).

1.3.4 Physiologische Bedeutung von ADAM17 und iRhom2

ADAM17 *Knock out* Mäuse weisen verschiedene Phänotypen auf, darunter eine erhöhte Anfälligkeit für Atherosklerose und Darmentzündungen. Aufgrund der entscheidenden Rolle von ADAM17 beim *Shedding* von TNF α (Scheller *et al.*, 2011) führt ein *Knock out* in Mäusen vor allem zu anti-inflammatorischen Effekten. Bei Atherosklerose führt ein ADAM17 *Knock out* in Mäusen zu größeren entzündlichen Läsionen mit verstärkter Migration von Makrophagen. Ursächlich hierfür ist eine verstärkte TNFR2-Aktivierung (Nicolaou *et al.*, 2017). Während einer Darmentzündung, und aufgrund einer reduzierten EGF-Rezeptoraktivierung, zeigen ADAM17-defiziente Mäuse eine gestörte Epithelzellregeneration und Barrierefunktion (Chalaris *et al.*, 2010). Bei bakteriellen Infektionen führt ein selektiver ADAM17 Mangel in murinen Leukozyten zu einer früheren Infiltration von Neutrophilen und einer somit

zu einer früheren Immunreaktion, was auf ein beeinträchtigt L-Selektin-*Shedding* von der Oberfläche der Neutrophilen zurückzuführen ist (Long *et al.*, 2012).

Zudem ist eine Überexpression von ADAM17 in Menschen mit unterschiedlichen Tumoren assoziiert, darunter Kolonkarzinome (Blanchot-Jossic *et al.*, 2005) und hepatozelluläre Karzinome (Ding *et al.*, 2004). Eine homozygote ADAM17-Defizienz durch *loss of function* Mutation führt in den wenigen beschriebenen Fällen zu inflammatorischen Haut- und Darmläsionen, die teils bei septischem Verlauf zum infantilen Tod führen, sich teils jedoch neben rezidivierenden Hautinfektionen asymptomatisch zeigen (Blaydon *et al.*, 2011, Bandsma *et al.*, 2016). Es konnten Schädigungen in verschiedenen Organsystemen nachgewiesen werden, so etwa eine Kardiomyopathie, hypoplastische Nieren und lymphozytäre Leberinfiltrate (Bandsma *et al.*, 2016). Im Blut konnte ein Mangel an TNF α bei gleichzeitig erhöhten IL-1 β und IL-6 Spiegel festgestellt werden (Blaydon *et al.*, 2011).

Diese Studien unterstreichen die komplexe Rolle von ADAM17 bei der Regulierung von Entzündungen, Geweberegeneration und Immunreaktionen durch seine zahlreichen Substrate und die davon ausgehenden Signalkaskaden.

Der *Knock out* von iRhom2 bei Mäusen wirkt sich protektiv auf verschiedene pathologische Zustände aus. Bei Mäusen, die langfristig erhöhter Feinstaubbelastung ausgesetzt waren, milderte der *Knock-out* von iRhom2 die Nierenschädigung durch Unterdrückung von Entzündungen und oxidativem Stress (Chenxu *et al.*, 2018). Bei einer fettreichen Diät zeigten iRhom2-*Knock-out*-Mäuse einen Schutz vor Adipositas, Dyslipidämie, Inflammation des Fettgewebes sowie *Steatosis hepatis*, was auf eine verbesserte Insulinsensitivität und erhöhte Thermogenese zurückzuführen ist (Vidal-Puig & Unger, 2010; Xu *et al.*, 2020). Es konnte ferner gezeigt werden, dass der Verlust von iRhom2 in Makrophagen Adipositas-assoziierte Stoffwechselstörungen im Rahmen eines metabolischen Syndroms abschwächt (Xu *et al.*, 2020).

Vorversuche unserer Arbeitsgruppe konnten aufzeigen, dass ein iRhom2-*Knock-out* geringere Serumkonzentrationen von LT α im Vergleich zu WT Tieren hat. Dieses Verhältnis blieb auch nach partieller Hepatektomie bestehen.

2. Zielsetzung dieser Arbeit

Wie in Kapitel 1 zu entnehmen ist, spielt iRhom2 eine entscheidende Rolle in der Reifung und der Regulation der Metalloprotease ADAM17. ADAM17 katalysiert das *Shedding* verschiedener Substrate. Da LT α jedoch über keine Transmembrandomänen verfügt (vgl. Abb. 1), sollte die Ausschüttung dieses Zytokins keiner *Shedding*-Aktivität unterliegen und somit auch durch einen *Knock-out* von iRhom2 nicht beeinflusst werden. Es stellt sich somit die Frage, warum in den in 1.3.4 genannten Vorversuchen dieser *Knock out* eine verringerte LT α -Sekretion bewirkt. Dieser Frage soll in der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden.

Das primäre Ziel dieser Arbeit lag in der Entwicklung eines *Shedding-Assays*, um diesen als Grundlage für weitere Untersuchungen der LT α -Sekretion unter ADAM17-Inhibition zu verwenden. Zur Untersuchung der Interaktion von LT α und LT β sollten zudem stabile Zellen generiert werden, die sowohl LT α oder LT β als auch beide Zytokine gleichzeitig exprimieren können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifikation der *Shedding Site* von LT β , also des extrazellulären Teils der LT β -Homotrimeren, an dem ADAM17 ansetzt, um das Zytokin von seiner membrangebundenen Form in eine lösliche Form zu überführen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antibiotika

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml	Agarplatten: 200 µg/ml Flüssigmedium: 100 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Hygromycin B	100 mg/ml	1 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Puromycin	1 mg/ml	1,5 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin	10.000 U/ml	60 mg/L	Genaxxon, Ulm
Streptomycin	10 mg/ml	100 mg/L	Genaxxon, Ulm

3.1.2 Antikörper

Die für diese Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Myc-Tag (71D10) Rabbit mAb (Biotinylated) #3946	Kaninchen	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
HA-Tag (C29F4) Rabbit mAb #3724	Kaninchen	1:1000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
α-rabbit POD	Ziege	1:5000	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

3.1.3 Chemikalien

Eine Übersicht der verwendeten Chemikalien ist Tabelle 4 zu entnehmen.

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Complete Proteaseinhibitor	Roche, Severin, Schweiz
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
dNTP Mix (25 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Express DNA Ladder 100-5000 bp	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HD-Green	INTAS, Göttingen, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	VWR International BVBA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
LB-Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Loading-Dye Solution (6x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
NP-40	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris	Bethesda Research Laboratories, New Jersey, USA
Trypan Blue Dye 0,4%	Bio-Rad, München, Deutschland
Turbofect™ Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

3.1.4 Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tab. 5: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage Precisia 100M-300C	Precisia, Hartenstein, Deutschland
BD FACSCanto II	Becton Dickson GmbH, Heidelberg, Deutschland
CO ₂ -Inkubator HERAccl® 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fluorometer Infinite® M200 PRO	Tecan, Männedorf, Deutschland
Gefrierschrank Forma® 900	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Geldokumentationssystem	INTAS, Göttingen, Deutschland

Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Heizbad Julabo sw21	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Rostock, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer mit Heizung	Heidolph Instr. GmbH, Schwabach, Deutschland
Messpipetten	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Mikropipetten Research®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle Optiquick	Moulinex (Krups), Offenbach, Deutschland
Minizentrifuge	Axon, Kaiserslautern, Deutschland
NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR Thermozykler peqStar	Peqlab, Erlangen, Deutschland
AB17500 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pH-Meter	Sartorius, Ratingen, Deutschland
Pipetus®-Akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Rollenmischer SRT 9D	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Spannungsquelle Power Pac™ Basic	Bio-Rad, München, Deutschland
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterilbankpumpe	HLC BioTech, Bovenden, Deutschland
TC10 Automated Cell Counter	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermomixer® comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™	Bio-Rad, München, Deutschland
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland
Vortexer	Neolab, Heidelberg, Deutschland

3.1.5 Kits

Tabelle 6 enthält die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kits.

Tab. 6: Übersicht der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
BCA Protein Assay	Thermo Scientific, Waltham, USA
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim
Human Lymphotoxin- α /TNF- β DuoSet ELISA	R & D Systems, Minneapolis, USA
Mouse LTA ELISA Kit (EML0288)	ABclonal Biotechnology Co., Wuhan, China
Mouse LTb ELISA Kit	Biorbyt, Durham, USA
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel, Düren
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.6 Kulturmedien

In Tabelle 7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmedien zur Kultivierung von Bakterien und eukaryotischen Zellen aufgeführt.

Tab. 7: Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien

Kulturmedium	Zusammensetzung
DMEM ^{-/-}	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , Glukose (4,5 g/L) mit stabilem Glutamin
DMEM ^{+/+}	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , Glukose (4,5 g/L) mit stabilem Glutamin, FBS (10%), 1% Penicillin/Streptomycin
RPMI ^{-/-}	<i>Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium</i>
RPMI ^{+/+}	<i>Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium</i> , FBS (10%), 1% Penicillin, Streptomycin
LB-Agar	0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, Trypton, 1,5% Agar-Agar
LB-Medium	0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, Trypton

3.1.7 Oligonukleotide

Zur Klonierung von Genfragmenten und Plasmiden erfolgte eine externe Synthese der entsprechenden Oligonukleotide durch die Firma Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg, Deutschland). Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tab. 8: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Name	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
DF85	5' pMOWS	AGCCCTTTGTACACCCTAAGC
DF85	3' pMOWS	AGCAATAGCATGATACAAAGG
DF16	pcDNA3.1 fwd	AAATTAATACGACTCACTATAGG
DF17	pcDNA3.1 rev	AGGCACAGTCGAGGCTG
MJ1	mLTA-EcoRV-FW	GACGATATCCTTAAGGCCACCATGACCCTGCTGGGCAGACTGCATC
MJ2	mLTA-EcoRV-REV	GACGATATCTCACGCGGCCGCGCGTAGTCGGGCACGTCGTAG
MJ3	mLTB-EcoRV-FW	GACGATATCCTTAAGGCCACCATGGGCACCAGAGGC
MJ4	mLTB-EcoRV-REV	GACGATATCTCACGCGGCCGCGAGGTCCTCTTCGGAGATCAGCTTC
MJ5	LTB1-fw	GGAGACCCAAGCTGGCTAGCG
MJ6	LTB1-rev	CAGTCGAGGCTGATCAGCGG
MJ7	LTB1_SOE_fw	GTCTCCAGCCGCCGACAGCACTGCCGCTCACCTGATTGGC
MJ8	LTB1_SOE_fw_DF	CTCCAAGCAGCCTGAGCGAGCCTGCCGCTCACCTGATTGGC
MJ9	LTB1_SOE_rev	GCCAATCAGGTGAGCGGCAGTGCTGTGCGCGGCTGGAGAC
MJ10	LTB1_SOE_rev_DF	GCCAATCAGGTGAGCGGCAGGCTCGCTCAGGCTGCTTGGAG
MJ11	SOE_fw_2	GCTGTTCTTGCACTGGTGCCTCAGAAGAGACTGGACGACAGCAAGC
MJ12	SOE_rev_2	GCTTGCTGTGCTCCAGTCTCTTCTGAGGCACCAGTGCAAGAACAGC
MJ13	LTB1_SOE_fw3	GCTCTGGCGCCCAGGCTACACCCGATCCTAGACTGCACC

MJ14	LTB1_SOE_fw3_DF	GCTCTGGCGCCCAGGCTGGTGGTCAGCAGCTGCCTAAGGGC
MJ15	LTB1_SOE_rv_3	GGTGCAGTCTAGGATCGGGTGTAGCCTGGGCGCCAGAGC
MJ16	LTB1_SOE_rev3_DF	GCCCTTAGGCAGCTGCTGAACACCAGCCTGGGCGCCAGAGC

3.1.8 Plasmide

Nachfolgend sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt.

Tab. 9: Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien

Name	Referenz	Resistenz
pBlueScript-LTB-2A-LTA	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	Ampicillin
pCR-Script	Addgene, Watertown, USA	Ampicillin
pMOWS-puro-GFP	Ketteler <i>et al.</i> , 2002	Puromycin
pEGFP	AG Scheller	Kanamycin
pcDNA3.1-FLAG-HmlL23	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1-LTB-2A-LTA	In dieser Arbeit generiert	Ampicillin
pcDNA3.1-mLTA-HA	In dieser Arbeit generiert	Ampicillin
pcDNA3.1-mLTB-myc	In dieser Arbeit generiert	Ampicillin
pCR-Script-mLTA	In dieser Arbeit generiert	Ampicillin
pCR-Script-mLTB	In dieser Arbeit generiert	Ampicillin
pMOWS-puro-LTB-2A-LTA	In dieser Arbeit generiert	Puromycin
pMOWS-puro-LTB-myc	In dieser Arbeit generiert	Puromycin
pcDNA3.1-mLTBΔ1	In dieser Arbeit generiert	Ampicillin
pcDNA3.1-mLTBΔ2	In dieser Arbeit generiert	Ampicillin
pcDNA3.1-mLTBΔ3	In dieser Arbeit generiert	Ampicillin

3.1.9 Puffer und Lösungen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tab. 10: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Hersteller
10x Standard Restriktionspuffer	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
10x T4 DNA Ligasepuffer	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	10% (w/v) APS
Blockierlösung Intercept TBS	LI-COR Biosciences GmbH
Ethanol (70%, 96%, 99,9%) (v/v)	Sigma-Aldrich, München
FACS-Puffer	1% BSA in PBS
Gibco® fötales bovines Serum (FCS)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
JAK-Lysis Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA

	0,5% (v/v) NP40 1 mM NaCO ₃ 10 mM MgCl ₂ 1 Complete Protease Inhibitor Tablette auf 50 ml
5 x Lämmli (nicht-reduzierend)	125 mM Tris-HCl 50% (m/V) Glycerol 10% (m/V) SDS 1 Spatelspitze Bromphenolblau
5 x Lämmli (reduzierend)	125 mM Tris-HCl 50% (m/V) Glycerol 10% (m/V) SDS 5% (m/V) β-Mercaptoethanol 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Lösung 1 (S1) für DNA-Minipräparation	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0 1:1.000 RNase 10% SDS
Lösung 2 (S2) für DNA-Minipräparation	200 mM NaOH 1% SDS
Lösung 3 (S3) für DNA-Minipräparation	3 M Kaliumacetat 11,5% (v/v) Essigsäure
<i>Phosphat buffered saline (PBS)</i>	1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 137 mM NaCl pH 7,4
SDS-PAGE Laufpuffer	0,4 M Tris-HCl, pH 8,25 0,1 M Glycin 0,1% SDS
SDS-PAGE Probenpuffer (6x)	375 mM Tris-HCl, pH 6,8 9% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerol 9% β-Mercaptoethanol 0,03% (w/v) Bromphenol Blau
SDS-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4% SDS
SDS-Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
TAE-Puffer	400 mM Tris-HCl, pH 8,8 10 mM EDTA 200 mM Essigsäure
TBS-T	5 M NaCl 200 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,1% (v/v) Tween20
Transferpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 M Glycerin 0,01% SDS 5% Methanol
<i>Tris buffered saline (TBS)</i>	5 M NaCl 200 mM Tris-HCl, pH 7,5
Trypsin/EDTA-Lösung	1:10 Trypsin/EDTA (10x) in PBS

3.1.10 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tab. 11: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Falcon Reaktionsgefäße (15 mL und 50 mL)	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Kryoröhrchen	VWR, Randor, USA
Microtubes (1,5 mL und 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
NAP-25	GE Healthcare, Chicago, USA
Nitrilhandschuhe	Ansell, München, Deutschland
PCR Kappen Gr. 125	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
PCR Tubes 0,2 mL	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PVDF-Transfermembran	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rollerbottle	IBS integra bioscience, Zizers, Schweiz
Whatman-Papier	VWR, Randor, USA
Zellkulturflasche T75	Sarstedt AG & Co.KG, Deutschland
Zellkulturschale 10 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale 6-well	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
Zellkulturschale 12-well	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
Zellkulturschale 96-well	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
Zellkulturschale 10 cm ² (adhärent)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale 6-well (adhärent)	TPP, Trasadingen, Schweiz

3.1.11 Zelllinien

Zur Klonierung und Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* (E. coli) XL1-Blue (endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [: TN10 proAB+lacIqΔ(lacZ)M15] hsdR17(rk-mK+)) verwendet (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Zusätzlich wurden die in Tabelle 12 aufgeführten eukaryotischen Zelllinien verwendet.

Tab. 12: Übersicht der verwendeten eukaryotischen Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Zellart	Hersteller
Ba/F3/gp130	murine prä-B-Zelllinie	Suspensionszellen	Immunex, Seattle, USA (Gearing <i>et al.</i> , 1994)
Phoenix-Eco	humane embryonale Nierenzelle	adhärente Zellen	DKFZ, Ursula Klingmüller, Heidelberg, Deutschland (Pear <i>et al.</i> , 1993)
HEK293T	humane embryonale Nierenzelle	adhärente Zellen	Thermo Scientific, St. Leon-Rot (Graham <i>et al.</i> , 1977)
Jurkat	T-Zell-Leukämie (humaner T-Lymphozyt)	Suspensionszellen	ATCC, Manassas, USA (Schwenk und Schneider, 1977)

3.1.12 Zytokine

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zytokine sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tab. 13: Übersicht der verwendeten Zytokine

Zytokin	Stammkonzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Hersteller
Hyper IL-6	5	AG Scheller

3.1.13 Software und Websites

Tab. 14: Übersicht der verwendeten Programme und Websites

Software/Website	Hersteller
BioRender	BioRender, Toronto, Kanada
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA
Microsoft Office 365 Excel	Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA
SnapGene™	GSL Biotech LCC, San Diego, California, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Messung von DNA-Konzentrationen

Die Konzentration von DNA wurde mittels spektrometrischer Messung am NanoDrop 2000 bestimmt. Die Reinheit der DNA- oder RNA-Proben wurde durch das Absorptionsverhältnis $A_{260}/280$ überprüft, die Reinheit bei 260 nm. Ziel hierbei war ein Quotient $> 1,8$. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Formel 1):

$$\text{Konzentration} \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = \frac{A_{280}}{\varepsilon(M^{-1}\text{cm}^{-1})} \times 1 (\text{cm}) \times \text{Molekulargewicht (Da)}.$$

Formel 1: Lambert-Beer'sches Gesetz.

3.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Um die Größe von DNA-Fragmenten zu bestimmen, wurden diese in ein Agarosegel gegeben, an das eine elektrische Spannung angelegt wurde. Da DNA negativ geladen ist, begannen die Fragmente, sich in Richtung der Kathode zu bewegen, und zwar umso schneller, je kleiner die Fragmente sind. So erfolgte eine Trennung der Fragmente nach ihrer Größe und ihrem Molekulargewicht.

Je höher die Agarosekonzentration des Gels war, desto langsamer bewegten sich die Fragmente, weshalb eine hohe Agarosekonzentration die spezifische Detektion kleiner Fragmente ermöglichte, während eine geringe Konzentration besser für die Größentrennung großer Fragmente geeignet war. Zur Herstellung der Gele wurde eine entsprechende Agarose in TAE-Puffer gegeben und aufgekocht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden, sofern nicht anders angegeben, 1%ige Agarosegele verwendet. Zur Visualisierung der Fragmente unter UV-Licht wurde das Agarosegel vor der Polymerisation mit *HD Green DNA Stain* versetzt, das zwischen die Basen der DNA interkalierte und so deren Fluoreszenz bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöhte. Zudem wurde neben den Proben, deren Länge bestimmt werden sollte, noch ein DNA-Marker, beispielsweise *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, mit definierten Fragmentlängen zugegeben. Dieser diente bei der Auswertung zur Abschätzung der Länge der Fragmente. Die Visualisierung und Dokumentation erfolgte durch das Geldokumentationssystem der Firma INTAS (Göttingen, Deutschland).

3.2.1.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Gelextraktion erfolgte nach der Größentrennung der DNA-Fragmente. Hierzu wurden die DNA-Fragmente auf einem Transilluminator bei 470 nm beleuchtet. Das in die DNA interkalierte *HD Green* wurde dadurch angeregt und bewirkte ein grünliches Aufleuchten der Banden. Die relevanten Banden konnten dadurch mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Dies ermöglichte die Extraktion der Nukleinsäuren mittels *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* gemäß Herstellerangaben.

3.2.1.4 Restriktion der DNA über Endonukleasen

Die Restriktionsspaltung wurde durchgeführt, um ein Insert aus der Plasmid-DNA (pDNA) zu entfernen, um es anschließend in ein Plasmid zu klonieren. Zusätzlich wurde die DNA mithilfe von Restriktionsenzymen (Thermo Fisher Scientific, Waltham) hydrolysiert, um die korrekte Ligation der neu generierten Plasmide zu überprüfen. Dabei erkannten die Restriktionsenzyme die DNA-Sequenz spezifisch und hydrolysierten die Phosphodiesterbindung. Abhängig vom verwendeten Restriktionsenzym konnten DNA-Doppelstränge mit Überhängen (*sticky ends*) oder ohne Überhänge (*blunt ends*) entstehen. Die Restriktion von jeweils 10 µg Plasmid-DNA erfolgte mit 10 U des gewünschten Restriktionsenzym und dem vom Hersteller

empfohlenen Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 2 Stunden oder über Nacht bei 37°C. Zur Kontrolle der korrekten Klonierung wurden dabei 4 µg pDNA verwendet, während für die Klonierung mindestens 30 µg verwendet wurden. Nach der Restriktion wurden 10 µl *TriTrack* DNA-Ladefarbstoff zu je 50 µl Reaktionsansatz hinzugefügt, und es wurde eine analytische oder präparative Gelelektrophorese durchgeführt.

3.2.1.5 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Zur Vermeidung der Religierung des 5'- und 3'-Endes der Plasmid-DNA nach Restriktionsspaltung wurde das 5'-Ende dephosphoryliert. Hierzu erfolgte nach Hydrolyse des Restriktionsansatzes eine Reinigung mittels *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit*, wodurch die Restriktionsenzyme sowie der jeweilige Puffer entfernt wurden. Der gereinigten DNA wurde 1 U Fast-AP (Thermo-Fisher, Waltham) zugegeben. Der Ansatz wurde für 1 Stunde oder über Nacht bei 37°C inkubiert, woraufhin eine erneute Reinigung erfolgte. Bei Vektoren, die *sticky end*-hydrolysiert wurden, war eine Dephosphorylierung in der Regel nicht notwendig.

3.2.1.6 Phosphorylierung von DNA

Da Amplifikate einer PCR nicht über die für eine Ligation notwendige 5'-Phosphatgruppe verfügen, erfolgte bei diesen Inserts vor Ligation eine Phosphorylierung. Hierzu wurde durch eine T4-Polynukleotidkinase (PNK) der Transfer einer Phosphatgruppe eines ATPs auf eine 5'-Hydroxygruppe der Nukleinsäure katalysiert. Der Ansatz der Reaktion erfolgte nach folgendem Schema:

PCR-Produkt
5 µl Ligase-Puffer
1 µl PNK
ad 50 µl H₂O_{dd.}

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung erfolgte eine Inkubation bei 75°C für 5 min. Im Anschluss daran war eine Ligation möglich.

3.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Um zwei DNA- oder RNA-Fragmente, etwa aus einem Restriktionsendonuklease-spaltung, miteinander zu verbinden, wurde eine Ligation durchgeführt. Es wurde unterschieden zwischen dem Vektor, einem prokaryotischen ringförmigen DNA-Strang, der mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen an definierten Stellen gespalten

werden kann und üblicherweise eine Antibiotikaresistenzkassette enthält, und dem Insert, also dem Zielgen, das in den Vektor integriert werden sollte.

Nach abgeschlossener Dephosphorylierung (vgl. Abschnitt 3.2.1.5) erfolgte die enzymatische Verknüpfung von Insert und Vektor. Die DNA-Ligase, die *in vivo* an der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen und der DNA-Replikation beteiligt ist, katalysierte ATP-abhängig die Ausbildung einer Phosphordiesterbindung zwischen dem 3-Hydroxyende eines Fragments und dem 5'-Phosphatende des anderen Fragments. Um eine molekulare Kompatibilität von Vektor-DNA und Insert zu erzielen, erfolgte zuvor eine Restriktionsendonukleasespaltung beider Komponente durch die gleichen Restriktionsenzyme.

Folgender Ansatz wurde für eine Ligation verwendet:

x µl Vektor
x µl Insert
2 µl T4-Ligase-Puffer
2 µl PEG4000
2 µl T4-Ligase
ad 20 µl H₂O_{dd.}

Die eingesetzte Menge an Vektor-DNA wurde so berechnet, dass sich etwa 100 ng des Vektors in dem Ansatz befinden. Die Menge an Insert-DNA war abhängig von der Masse des Vektors, der Länge des Vektors und der Länge des Inserts selbst und wurde nach Formel 2 berechnet. Somit enthielt der Ligationsansatz einen molaren Überschuss an Insert im Verhältnis 1:5 im Vergleich zum Vektor. Als Negativkontrolle wurde ein weiterer Ansatz ohne Insert angesetzt.

$$\frac{5 * \text{Masse Vektor [ng]} * \text{Länge Insert [bp]}}{\text{Länge Vektor [bp]}} = x \text{ ng Insert .}$$

Formel 2: Berechnung der Menge an Insert zum Erreichen eines molaren Vektor-Insert-Verhältnisses von 1:5.

Der Ligationsansatz wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert, danach erfolgte eine Transformation des ligierten Plasmids in chemisch kompetente Zellen.

3.2.1.8 Transformation in chemisch kompetente XL1-Blue Bakterien

Als Kompetenz wird die Fähigkeit einer Zelle bezeichnet, frei vorliegende DNA aus dem sie umgebenden Medium aufzunehmen. Während Bakterienarten wie *Bacillus subtilis* über eine natürliche Kompetenz verfügen, muss diese bei den in dieser Arbeit zur Transformation verwendeten *E.coli* künstlich durch einen Hitzeschock herbeigeführt werden, weshalb diese Zellen als chemisch-kompetent bezeichnet werden.

Zur Transformation wurden die aliquotierten kompetenten Zellen zunächst bei 4°C aufgetaut. Danach wurden sie mit 0,5 µl pDNA oder 30 µl Ligationsansatz vermischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock: die Bakterien wurden für 50 Sekunden auf 42°C erhitzt, wodurch die Zellwände der Bakterien durchlässig gemacht wurden und das Plasmid ins Zellinnere eindringen konnte. Nachdem die Bakterien weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert wurden, wurde der Ansatz für 60 min unter Schütteln mit 1 ml antibiotikafreiem LB-Medium inkubiert. Abschließend wurden 100 µl des Ansatzes auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmedium gegeben und über Nacht inkubiert.

3.2.1.9 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Um die pDNA, mit der die *E.coli* transformiert wurden, zu analysieren, wurde die pDNA isoliert. Dazu wurde jeweils eine *E. coli*-Kolonie in 1,8 ml LB_{amp}- oder LB_{kan}-Medium über Nacht bei 37°C und 1.000 rpm inkubiert. Die Isolierung der pDNA erfolgte dann mittels Mini-Präparation nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Hierbei wurde die Bakterienkultur zentrifugiert (15.000 g, 1 min, RT), und das Zellpellet wurde in 100 µl kaltem S1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl S2-Puffer hinzugefügt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl kaltem S3-Puffer, um die Lyse durch das im S3-Puffer enthaltene Kaliumacetat zu neutralisieren. Nach einer weiteren Zentrifugation (17.000 g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µl kaltes Isopropanol zugegeben und erneut zentrifugiert (17.000 g, 15 min, 4°C). Die präzipitierte pDNA wurde mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen, erneut zentrifugiert (17.000 g, 5 min, 4°C) und das DNA-Präzipitat wurde nach leichtem Antrocknen in 50 µl H₂O_{dd} wieder gelöst.

3.2.1.10 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung und Isolierung größerer Mengen pDNA wurde eine Midi-Präparation durchgeführt. Ähnlich wie bei der Mini-Präp wurde auch hier LB_{amp}- oder LB_{kan}-Medium

mit einer Bakterienkolonie beimpft, jedoch wurden für die Midi-Präparation 100 ml Medium verwendet. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C und 150 rpm wurde die Suspension zentrifugiert (4.000 g, 30 min, 4°C), sodass ein Zellpellet entstand. Aus diesem wurde mit dem *NucleoBond Xtra Midi Kit* gemäß den Herstellerangaben die pDNA isoliert. Nach Lösung in 200 µl H₂O_{dd} erfolgte eine Kontrolle der DNA-Konzentration wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben.

3.2.1.11 PCR

Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dient dazu, einen zuvor definierten Abschnitt der Ausgangs-DNA, das sogenannte *Template*, zu amplifizieren. Hierzu werden neben dem Template spezifische Oligonukleotide für Anfangs- und Endpunkt des *Templates* (*Primer*), Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs), eine hitzestabile DNA-Polymerase sowie auf die jeweilige Polymerase abgestimmte Puffer benötigt.

PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Bei der PCR handelt es sich um einen zyklischen, exponentiellen Prozess, der durch einen Thermocycler automatisiert durchgeführt wird. Ein Zyklus besteht aus folgenden Schritten:

1. Hitzedenaturierung: Erhitzen der Probe auf 95°C, sodass sich die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge aufspalten.
2. *Annealing*: Herunterkühlen der Probe auf die Temperatur, bei der die Primer an ihre spezifischen, komplementären DNA-Abschnitte binden. Die Temperatur, bei der dies geschieht, ist abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt der Primer und somit Primer-spezifisch.
3. Elongation: Erhöhung der Temperatur auf 72°C, das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase. Die DNA-Polymerase kann nun ausgehend von den Primern neue komplementäre DNA-Stränge synthetisieren.

Ergänzt werden diese Schritte durch eine initiale Denaturierung bei 95°C, einer abschließenden Elongation bei 72°C nach Ende des letzten Zyklus, sowie einer Kühlung und Lagerung der Proben bei 4°C. Ein exemplarischer Ablauf ist in Tabelle 15 aufgeführt.

Tab. 15: PCR-Programm zur Amplifikation definierter DNA-Abschnitte

Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	1 min	
<i>Annealing</i>	60°C ¹	1 min	x 30 Zyklen
Elongation	72°C	1 min/kbp	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Kühlung	4 °C		

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die *Phusion High-Fidelity Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine hitzestabile DNA-Polymerase mit 5' → 3'-Polymerase-Aktivität und 3' → 5'-Exonuklease-Aktivität. Sie verfügt somit über eine Korrekturlesefunktion (*proof reading*), ist also in der Lage, den Einbau eines falschen Nukleotids zu detektieren und dieses wieder aus dem DNA-Strang zu entfernen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen standardmäßig ein 50 µl-Ansatz verwendet, der sich wie folgt zusammensetzt:

1 µl Template DNA (1:100 verdünnt)
10 µl HF-Puffer
2,5 µl forward Primer (1:10 verdünnt)
2,5 µl reverse Primer (1:10 verdünnt)
1 µl dNTPs (10 mM)
0,5 µl *Phusion High-Fidelity Polymerase*
32,5 µl H₂O_{dd}

Σ 50 µl

Zur Kontrolle der erfolgreichen Amplifikation wurde das PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese (vgl. Abschnitt 3.2.1.2) analysiert. Bei erfolgreicher Amplifikation erfolgte eine Reinigung des Produkts mittels *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit*. Nach einer abschließenden Phosphorylierung (vgl. Abschnitt 3.2.1.6) konnte das Amplifikat dann in den entsprechenden Vektor ligiert werden (vgl. Abschnitt 3.2.1.7).

¹ Die für das *Annealing* angegebenen 60°C sind beispielhaft und wurden an die jeweils verwendeten Primer angepasst.

Colony-PCR (cPCR)

Zur Überprüfung der korrekten Klonierung wurde eine cPCR aus ausgewählten Kolonien chemisch-transformierter Bakterien nach Ligation durchgeführt. Eine vorherige Isolation der pDNA aus den Bakterien war hier nicht notwendig. Als *Template* diente hier die pDNA in der Bakteriensuspension, die durch Lösung einer Kolonie in 20 µl H₂O_{dd} erzeugt wurde.

Als Polymerase wurde *DreamTaq Green Master Mix 2x* verwendet, da im Gegensatz zur Amplifikation von DNA-Fragmenten hier kein *proof reading* notwendig ist. Im Folgenden ist ein beispielhafter PCR-Ansatz dargestellt:

5 µl Dream Taq Puffer
4 µl MgCl₂
0,25 µl forward Primer (100 pmol/µl)
0,25 µl reverse Primer (100 pmol/µl)
1 µl dNTPs (10 mM)
0,2 µl Dream Taq (5U/µl)
19,3 µl H₂O_{dd}

Σ 50 µl

Das PCR-Programm, das standardmäßig verwendet wurde, ist in Tabelle 14 aufgeführt.

Tab. 16: Colony-PCR-Programm.

Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	30 sec	
<i>Annealing</i>	55 °C	30 sec	x 30 Zyklen
Elongation	72 °C	1 min/kbp	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Kühlung	4 °C	∞	

Im Anschluss erfolgte eine Überprüfung der korrekten Klonierung mittels Gelelektrophorese (vgl. Abschnitt 3.2.1.2).

SOE-PCR

Zur Erzeugung der Deletionsmutanten von mLT β wurde eine *splicing by overlap extension* PCR (SOE-PCR) durchgeführt. Der Ablauf einer Deletions-SOE-PCR ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Es erfolgte zunächst eine initiale Amplifikation, bei der die Fragmente, die miteinander verbunden werden sollen, im Bereich der Fusionsstelle mit Überhängen amplifiziert wurden. Diese Überhänge waren jeweils komplementär zueinander. In der darauffolgenden Fusions-PCR wurden die zuvor erzeugten Fragmente gemeinsam eingesetzt und über die jeweils außen liegenden Primer miteinander verbunden. Hierzu wurde die *Pfu* Polymerase mit *proof reading* Aktivität verwendet.

Im Folgenden ist ein beispielhafter Reaktionsansatz dargestellt:

1 μ l *template* DNA (1:100 verdünnt)
5 μ l *Pfu*-Puffer
3 μ l *forward* Primer (1:10 verdünnt)
3 μ l *reverse* Primer (1:10 verdünnt)
1 μ l dNTPs (10 mM)
0,5 μ l *Pfu*-Polymerase
36,5 μ l H₂O_{dd}

Σ 50 μ l

Die Reaktion wurde standardmäßig mit folgendem Programm durchgeführt:

Tab. 17: SOE-PCR-Programm

Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	1 min	
<i>Annealing</i>	60°C	1 min	x 30 Zyklen
Elongation	72°C	2 min/kbp	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Kühlung	4°C		

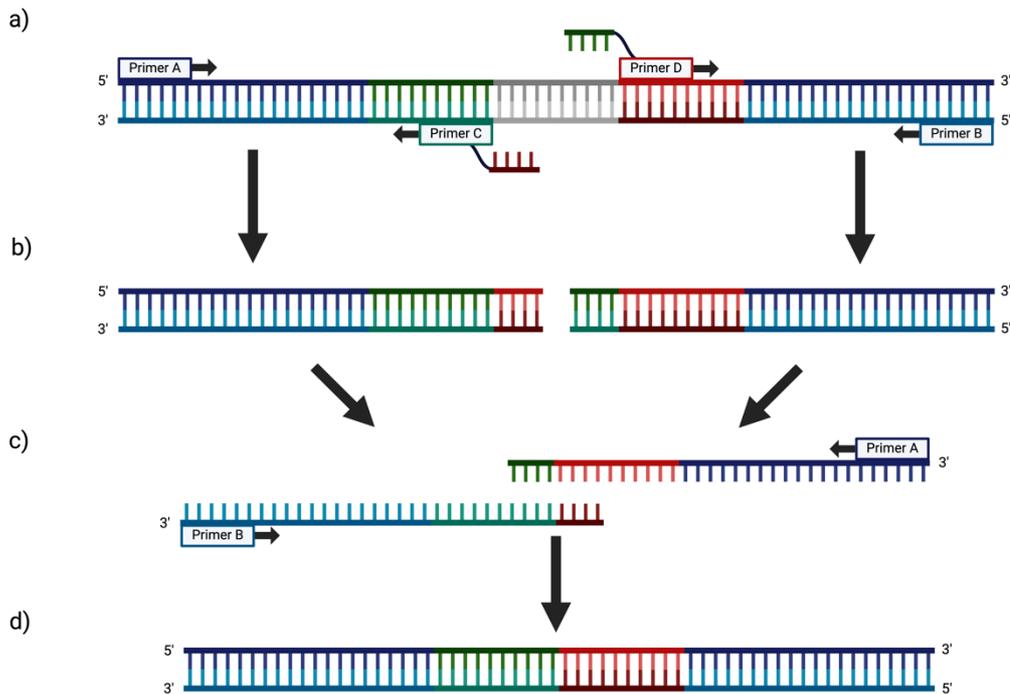


Abb. 4: Ablauf einer SOE-PCR am Beispiel einer Deletion. Neben der *template-DNA* wurden vier Primer benötigt (a). Primer A und Primer B sorgten für eine Amplifikation in 5'-3'-Richtung, während Primer C und Primer D in 3'-5'-Richtung an der Grenze zu dem Abschnitt banden, der deletiert werden sollte. Sie begrenzten so, wie weit der Komplementärstrang amplifiziert wird. Zudem trugen diese Primer eine kurze Einzelstrang-Basensequenz, die den Basen auf der anderen Seite der Deletion entsprach. So kam es nach Amplifikation zu einem Überlappen der Amplifikate (b). In einer weiteren PCR wurden diese Amplifikate und Primer A und B eingesetzt. Nach Spaltung der DNA-Doppelstränge konnten beide Amplifikate durch ihre komplementäre Überlappungsregion aneinanderbinden (c), die DNA-Polymerase vervollständigte die Einzelstränge zu einem Doppelstrang. Dieser entsprach in seiner Sequenz exakt der *template-DNA*, jedoch ohne die Deletionsregion (d).

3.2.1.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Kontrolle der klonierten Plasmide wurden diese extern durch die Firma SeqLab Sequence Laboratories GmbH (Göttingen) analysiert. Zur Sequenzierung wurde die Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Hierzu wurden die Proben einschließlich der jeweiligen Oligonukleotide eingesandt und es erfolgte eine Sequenzierung des klonierten DNA-Abschnitts. Gelegentlich erfolgte ebenfalls eine Sequenzierung des *Backbones*.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten

HEK293-T-Zellen und CHO-K1-Zellen wurden 48 h Stunden nach der Transfektion lysiert. Hierzu wurde das Medium entfernt und zur weiteren Analyse filtriert. Danach wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml PBS von der Platte abgelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die schwach adhärenen HEK293-T-Zellen konnten mit Hilfe einer Pipette von der Platte gespült werden, während zur Ablösung der stark adhärenen CHO-K1-Zellen ein Zellschaber verwendet wurde. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (14.000 rpm, 4°C, 5 min), der Überstand verworfen und das verbleibende Zellpellet in 60-200 µl JAK-Lysepuffer resuspendiert; die Lyse erfolgte bei 4°C unter stetigem Rollen für 2 Stunden.

Nach erneuter Zentrifugation (14.000 rpm, 4°C, 10 min) wurde der Überstand, also das Zelllysate, in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die genaue Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure-Assay (vgl. Abschnitt 3.2.2.2) bestimmt.

3.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate erfolgte nach Herstellerangaben mittels *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher, Waltham). Zur Durchführung des Assays wurden die Lysate in einem Verhältnis von 1:20 mit H₂O verdünnt, wovon dann je 25 µl in zwei Kavitäten einer 96-Well-Platte pipettiert wurden. Zunächst wurde in Anwesenheit der Proteine in einem alkalischen Milieu Cu²⁺ zu Cu⁺ reduziert, wodurch eine Komplexbildung zwischen Bicinchoninsäure und Cu⁺ ermöglicht wird. Dieser Komplex zeichnet sich durch eine violette Färbung aus und bildet sich proportional zur Proteinkonzentration. Die Absorption wurde im Fluorometer bei 562 nm gemessen. Zur Auswertung des Assays erfolgte die Erstellung einer Standardgerade mit fetalem Kälberserum (BSA). Hierzu wurde das BSA in definierten Schritten sukzessive verdünnt und die Verdünnungsreihe gemeinsam mit der zu untersuchenden Probe im Fluorometer analysiert.

3.2.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Detektion spezifischer Proteine im Western Blot (vgl. Abschnitt 3.2.2.4) wurde zunächst eine Trennung der Proteine nach Molekulargewicht durchgeführt. Dies erfolgte mittels *sodium dodecyl sulphate* (SDS)-PAGE. Nach initialer Denaturierung und Reduktion der Disulfidbrücken bei 95°C in Proteinauftragspuffer waren die Proteine durch das SDS negativ geladen. Unter elektrischer Spannung bewegten sie

sich nun im polymerisierten Polyacrylamidgel in Richtung der Anode, wobei sich große Proteine langsamer bewegen als kleine. Die Gele wurden bei Untersuchung von Zelllysaten mit 50 µg Gesamtprotein oder mit 33 µl bei Analyse von Zellkulturüberständen beladen.

Durch das Anlegen einer Spannung von 100 V wurde die Elektrophorese gestartet. Sobald die Proteine das Trenngel erreichten, wurde die Spannung auf 130 V erhöht. In Abhängigkeit des Molekulargewichts der zu untersuchenden Proteine wurden 10- oder 15%ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet.

3.2.2.4 Western Blot

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 3.2.2.3) wurden diese zur Durchführung einer Westernblotanalyse auf eine PVDF-Membran transferiert. Dies erfolgte in einem *Trans Blot-Turbo semi-dry* Transfersystem von BioRad (München, Deutschland) durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen der PVDF-Membran mit den Proteinen. Vor dem Transfer wurde die Membran für 2 min in Methanol aktiviert und danach für 1 min in Transferpuffer gewaschen. Zudem wurde *Whatman*-Papier im Transferpuffer getränkt und in drei Lagen unter die nun aktivierte Membran gelegt. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde aus seiner Halterung entfernt und auf die PVDF-Membran gelegt, dann wurde das Gel mit drei weiteren Lagen *Whatman*-Papier bedeckt, sodass der Gel-Membrankomplex von beiden Seiten von *Whatman*-Papier umgeben war.

Der Transfer erfolgte für 1 h bei 25 V. Um nicht-besetzte Bindungsstellen der Proteine zu blockieren und so Störsignale bei der Auswertung zu vermeiden, wurde die Membran im Anschluss für mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur in ca. 10 ml Blockierlösung inkubiert. Die Membran wurde dann mit dem primären Antikörper versetzt und unter Rotation über Nacht bei 4°C inkubiert. Zusätzlich wurde die Membran mit 5%-Milch-TBS-T versetzt. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde der sekundäre Antikörper für 1 h zugegeben, im Anschluss wurde die Membran zweimal mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Zugabe von *ECL Prime Western Blot Detection Reagent*, wodurch die gebundenen Antikörper am INTAS Chemo Cam Imager (INTAS, Göttingen, Deutschland) visualisiert werden konnten.

3.2.2.5 Enzyme-Linked-Immunoabsorbent-Assay (ELISA)

Zur Quantifizierung von der Proteinkonzentrationen von humanem und murinem LT α in Zellkulturüberständen wurde ein Sandwich-ELISA verwendet. Gemäß den Herstellerangaben wurde eine bereits mit Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte verwendet, in deren Wells die Analysate gegeben wurden. Dieser Antikörper wird auch als *capture antibody* bezeichnet. Während der Inkubationszeit kam es zu einer Bindung der spezifischen Proteine an die Antikörper, mit denen die Wells beschichtet waren. Nicht-gebundene Proteine wurden nach der Inkubation mittels spezieller Waschlösungen in mehreren Waschschrritten entfernt. Im Anschluss wurde ein Detektionsantikörper (*detection antibody*) in die Wells gegeben. Dieser zeichnet sich durch zwei Besonderheiten aus: zum einen bindet er an ein anderes Epitop des Zielproteins als der *capture antibody*, was die Spezifität des ELISAs erhöht, zum anderen ist er an eine Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gebunden, was die Detektion ermöglicht. Die Bindung der beiden eingesetzten Antikörper an unterschiedliche Epitope ist spezifisch für den Sandwich-ELISA; bei einem kompetitiven ELISA binden beide Antikörper an das gleiche Epitop.

Nun kam es während der folgenden Inkubation zur Bildung eines Komplexes aus Zielprotein, *capture antibody* und *detection antibody*. Nach dem Auswaschen überschüssiger, nicht gebundener Antikörper wurde den Wells Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Dieses fungierte als Substrat für die HRP und wurde durch diese in ein farbiges Oxidationsprodukt umgewandelt. Sobald es zu einem sichtbaren Farbumschlag kam, wurde eine Stop-Lösung zugegeben, die die Reaktion beendete. Nun konnte die Menge des Oxidationsproduktes spektroskopisch gemessen werden, wobei die Farbintensität proportional zur Menge des Zielproteins in der Lösung war.

3.2.3 Zellkultur

3.2.3.1 Kultivierung von adhärenenten und Suspensionszellen

Jurkat-Suspensionszellen wurden in T75-Zellkulturflaschen (Sarstedt, Deutschland) in 75 ml RPMI-Medium kultiviert. Selektionsantibiotika wurden alle 7 Tage zugegeben. Die Zellen wurden alle sieben Tage in einem Verhältnis von 1:10.000 passagiert. Adhärenente HEK293- oder Phönix-Eco-Zellen wurden in 10 cm Petrischalen in DMEM^{+/+} kultiviert. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage in einem Verhältnis von 1:1000 passagiert, dabei wurde jedes Mal das Selektionsantibiotikum zugegeben.

Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ sowie in einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre kultiviert.

3.2.3.2 Transfektion von HEK293- und Phoenix-Eco-Zellen

Zur Transfektion wurden an Tag -1 HEK293-Zellen in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät. An Tag 0 wurden 7,5 µg pDNA mit 15 µl *Turbofect* (Thermo Fisher Scientific, Waltham) in 1 ml DMEM^{-/-} gegeben und vermischt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation bei RT für 15 min, woraufhin die Lösung tropfenweise zu den Zellen gegeben wurde. An Tag 2 wurde die Transfektion der Zellen kontrolliert.

Phoenix-Eco-Zellen wurden an Tag -1 mit 8×10^5 Zellen in einem 6-well ausgesät. Nach Mischung von 1 µg pDNA und 2 µl *Turbofect* und 200 µl DMEM^{-/-} an Tag 0 wurde der Ansatz 15 min bei RT inkubiert und dann tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 6 h wurde das Medium entfernt und durch DMEM^{+/+} mit 30% FCS ersetzt. An Tag 1 konnten die Überstände zur retroviralen Transduktion genutzt werden (vgl. Abschnitt 3.2.3.3).

3.2.3.3 Retrovirale Transduktion

Um eine stabile Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen zu erzielen, wurde eine retrovirale Transduktion durchgeführt. Bei Ba/F3-gp130-Zellen handelt es sich um murine prä-B-Zellen mit stabil transduzierter cDNA für humanes gp130. Die Proliferation dieser Zelllinie ist abhängig von humanem IL-6 und löslichem IL-6R bzw. Hyper IL-6 (HIL-6) (Fischer *et al.*, 1997). HIL-6 ist ein künstliches Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R, das eine 100-1000-fach stärkere Aktivität aufweist als der nicht-kovalent gebundene Komplex aus IL-6 und sIL-6. (Fischer *et al.*, 1997).

Hierbei wird die Fähigkeit von Phoenix-Zellen genutzt, transfizierte DNA in mRNA zu transkribieren und diese in Virushüllproteinen zu verpacken; die Phoenix-Zellen dienen also als Verpackungszelllinie. Die von den Phoenix-Zellen synthetisierten und sezernierten Viruspartikel können dann genutzt werden, um Ba/F3-Zellen zu infizieren. Die übertragene mRNA wird dort durch eine reverse Transkriptase in cDNA umgewandelt und dann in das Genom der Wirtszelle integriert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden LTβ sowie LTA-2A-LTB in den retroviralen Expressionsvektor pMOWS-puro kloniert, der zur Selektion der transduzierten Zellen über eine Puromycinresistenzkassette verfügt.

Zur Durchführung der Transduktion wurden die Phoenix-Zellen zunächst, wie unter 3.2.3.2 beschrieben, mit dem pMOWs Plasmid mit dem *Gene of Interest* transfiziert. Sechs Stunden später erfolgte ein Mediumswechsel mit DMEM^{+/+} mit 30% FCS. Am folgenden Tag wurden die Zellkulturüberstände bei Raumtemperatur zentrifugiert (1800 rpm, 5 min), um Zelltrümmer zu entfernen. Danach wurden 250 µl des Überstands mit 1×10^5 Ba/F3-Zellen vermischt, zusätzlich wurden 3 µl Polybrene zugegeben, was die Bindung der Viruspartikel an die Ba/F3-Zellen erleichtert. Nach zweistündiger Zentrifugation bei 1800 rpm und RT wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet wurde in 5 ml DMEM^{+/+} resuspendiert, dann wurde die Suspension in die Wells einer 6-Well-Platte gegeben.

Der Ansatz wurde mit 10 µl HIL-6 versetzt, um die BaF3-Zellen zu stimulieren, und dann in einem CO₂-Shaker inkubiert. 48 Stunden nach der Transduktion wurde Puromycin (1,5 µl/ml) zugegeben, um alle untransduzierten Zellen abzutöten.

3.2.3.4 Proliferationsassay

Zur Kontrolle von der retroviralen Transduktion (vgl. Abschnitt 3.2.3.3) wurde ein Zellviabilitätsassay der stabil transfizierten Ba/F3-Zellen durchgeführt und die Proliferation der Zellen analysiert. Dieser Assay beruht auf der Reduktion von Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin. Diese Umsetzung erfolgt durch zelluläre Dehydrogenasen und ist somit nur in metabolisch aktiven, also vitalen Zellen möglich. Die Stärke der Fluoreszenz ist daher proportional zur Zellproliferation.

Die Ba/F3-Zellen wurden dazu dreimal mit PBS gewaschen und danach auf eine Zelldichte von 5×10^4 Zellen/ml DMEM^{+/+} verdünnt. Diese Suspension wurde als Triplikat in einem Volumen von je 100 µl in eine Kavität einer 96-Well-Zellkulturplatte gegeben und für 72 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden in jede Kavität 20 µl *CellTiter-Blue* gegeben. Dieses Reagenz enthält Resazurin, sodass mit der Zugabe die Reduktion zum fluoreszierenden Resorufin initiiert wird. Die Detektion dieser Strahlung erfolgte unmittelbar nach Zugabe mit einem Tecan Infinite M200 PRO Reader (Tecan, Männedorf) bei 560 nm. Die folgende Messung fand nach 40 min statt, gefolgt von einer weiteren Messung alle 20 min bis zu einer Gesamtdauer von 120 min. Zusammen mit der initialen Messung (Zeitpunkt 0) ergaben sich somit insgesamt sechs Messzeitpunkte. Im Anschluss wurde Zeitpunkt 0 von der letzten Messung subtrahiert.

3.2.3.5 Starving von HEK293T- und Jurkat-T-Zellen

Vor der Analyse des induzierten *Sheddings* wurde den zu untersuchenden Zellen das FBS-haltige Medium entzogen; dieser Prozess wird als *Starving* bezeichnet. So konnte die Signaltransduktion, die durch das serumhaltige Wachstumsmedium hervorgerufen wurde, minimiert werden. Hierzu wurden die Zellen zunächst in ein 50 ml-Falcon überführt und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Zellpellet in PBS resuspendiert. Dieser Prozess wurde insgesamt dreimal durchgeführt, um durch das PBS sämtliche Überreste des serumhaltigen Mediums auszuwaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellpellet in serumfreiem DMEM^{-/-} (HEK293T-Zellen) beziehungsweise RPMI^{-/-} (Jurkat-T-Zellen) resuspendiert und vor Beginn des *Shedding*-Assays 4 h bei 37°C 5% CO₂ inkubiert.

3.2.3.6 Induziertes *Shedding*

Nach erfolgreichem *Starving* (vgl. 3.2.3.5) erfolgte eine Bestimmung der Zellkonzentration. In die Wells einer 6-Well-Platte wurden eine definierte Menge Zellen in einem Volumen von 1 ml gegeben und die Zellen wurden 30 min mit Inhibitoren (3 µM GI254023X [ADAM10], 3 µM GW280264X [ADAM10 und ADAM17], 10 µM Marimastat [Breitband-Metalloproteinase-Inhibitor]) inkubiert. Nach der Inkubation wurde zur Stimulation von ADAM17 100 nM Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, Merck, Deutschland) für 2 Stunden zugegeben. Zur Stimulation von ADAM10 wurde 1 µM Ionomycin (Sigma-Aldrich, Steinheim) für 1 h zugegeben. Der Überstand wurde danach in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Entfernung von Zelltrümmern zentrifugiert (5 min, 15.000 rpm). Die gereinigten Überstände konnten dann mittels ELISA analysiert werden.

3.2.3.7 Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Oberflächenexpression membranständiger Proteine von Ba/F3-Zellen wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Hierzu wurden 1x10⁶ Zellen pro Zelllinie für fünf Minuten bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet wurde zweimal mit 1 ml FACS-Puffer (0,5% BSA in PBS) gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das gewaschene Pellet in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert, mit dem primären Antikörper versetzt und für zwei Stunden auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen und resuspendiert, woraufhin der Sekundärantikörper zugegeben und für 1 Stunde in Dunkelheit inkubiert

wurde. Abschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die vorbereiteten Zellen konnten dann in ein FACS-Röhrchen überführt und mittels FACS Canto II analysiert werden. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit Hilfe der Software FloJo_V10 (Ashland, USA).

4. Ergebnisse

4.1 Klonierung der Expressionsvektoren für LT α und LT β

In silico Design des LTB-2A-LTA-Plasmids

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Zytokine LT α und LT β untersucht werden. Um die Expression beider Zytokine in der gleichen Zelle analysieren zu können wurde ein Plasmid benötigt, das zur Koexpression beider Zytokine führt. Ein einfaches Aneinanderreihen der Sequenzen beider Proteine würde jedoch zur Bildung eines Fusionsproteins führen. Dieses Problem wurde durch den Einsatz eines 2A-Peptids gelöst (Abb. 5). Hierbei werden die Sequenzen einzelner Proteine durch ein 18 bis 22 Aminosäuren langes 2A-Peptid voneinander getrennt. Bei der Transkription führt die terminale Sequenz NPGP zu *ribosome skipping* (Liu *et al.*, 2017), was die Synthese zweier voneinander getrennter Proteine bewirkt. Zudem bestehen die Möglichkeiten, dass das *ribosome skipping* zwar gelingt, die zweite Sequenz in Leserichtung jedoch nicht erfolgt, sodass nur die erste Sequenz translatiert wird (*ribosome fall-off*), oder dass trotz des 2A-Peptids ein Fusionsprotein entsteht (*ribosome read through*). Um die Wahrscheinlichkeit eines *ribosome fall-off* oder *ribosome read through* zu verringern, wurde zwischen die erste kodierende Sequenz (LT β) eine Furinschnittstelle eingefügt, die zu einer proteolytischen Abspaltung des 2A-Peptids durch Furin führt (Chng *et al.*, 2015).

Zudem wurden die kodierenden Sequenzen von Polypeptiden, sogenannten *tags*, an das C-terminale Ende der kodierenden Sequenzen der von LT α und LT β gehängt. Diese können in späteren Experimenten mittels spezifischer Antikörper detektiert und sichtbar gemacht werden. An das C-terminale Ende von LT α wurde ein HA-*tag*, an das C-terminale Ende von LT β ein myc-*tag* angehängt.

Für das in dieser Arbeit verwendete Plasmid pBS-LTB-2A-LTA wurden die Sequenzen für murines LT α und LT β verwendet, als 2A-Peptid wurde T2A verwendet, da hier die Wahrscheinlichkeit für *ribosome fall-off* und *ribosome read through* am geringsten ist. Das Plasmid wurde von Dr. Doreen Floss und Dr. Kristina Vogel (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Düsseldorf) designed und von General Biosystems (Durham, USA) synthetisiert.

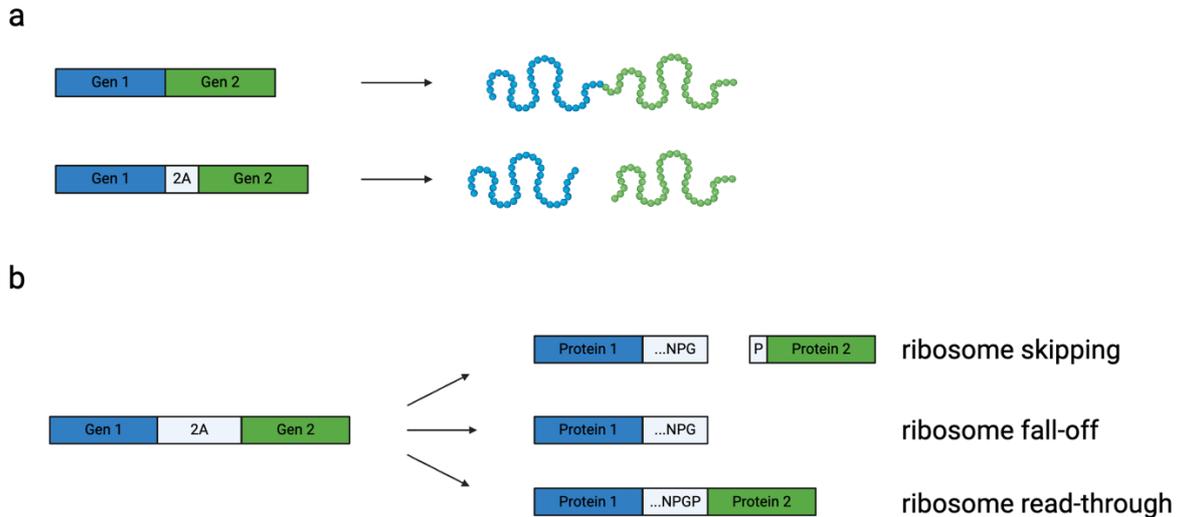


Abb. 5: Koexpression multipler Gene aus einem einzelnen Expressionsvektor. a) Bloße Aneinanderreihung der Sequenzen zweier Gene bewirkt die Synthese eines Fusionsproteins. Durch Einschub eines 2A-Peptids ist die Koexpression beider Proteine möglich. b) (modifiziert nach Liu *et al.*, 2017) Beim Einsatz einer 2A-medierte Proteinexpression bestehen drei Möglichkeiten: 1) die terminale NPGP-Sequenz des 2A-Peptids bewirkt ein *ribosome skipping*, bei dem das C-terminale Prolin am *downstream* gelegenen Protein verbleibt; 2) das *skipping* gelingt, jedoch wird die Translation nicht fortgesetzt und nur das *upstream* des 2A-Peptids gelegene Gen wird exprimiert („*ribosome fall-off*“); 3) das *skipping* gelingt nicht und ein Fusionsprotein wird exprimiert („*ribosome read-through*“). Im Vergleich verschiedener 2A-Peptide ist die Wahrscheinlichkeit eines *ribosome fall-off* oder *ribosome read-through* bei dem hier verwendeten T2A-Peptid am geringsten (Liu *et al.*, 2017). Eine Furinschnittstelle zwischen Gen 1 und dem 2A-Peptid führt im Falle eines *ribosome fall-off* und *ribosome read-through* dazu, dass das 2A-Peptid proteolytisch von Gen 1 abgespalten wird.

Subklonierung von LTB-2A-LTA in pcDNA3.1-LTB-2A-LTA

Nach Erhalt des *in silico* designten Plasmids pBS-LTB-2A-LTA erfolgte zunächst die Umklonierung in ein pcDNA3.1-Backbone. Der pcDNA3.1-Vektor wurde enzymatisch aus dem Plasmid pcDNA3.1-FLAG-HmIL23 (Floss *et al.*, 2013) geschnitten und nach Dephosphorylierung mit dem LTB-2A-LTA-Insert ligiert. Nach erfolgreicher Klonierung und Endonukleasespaltung (vgl. Abb. 7) erfolgte eine abschließende Kontrolle des Plasmids mittels Sequenzierung. Der schematische Ablauf der Klonierung von pcDNA3.1-LTB-2A-LTA ist in Abb. 6 dargestellt.

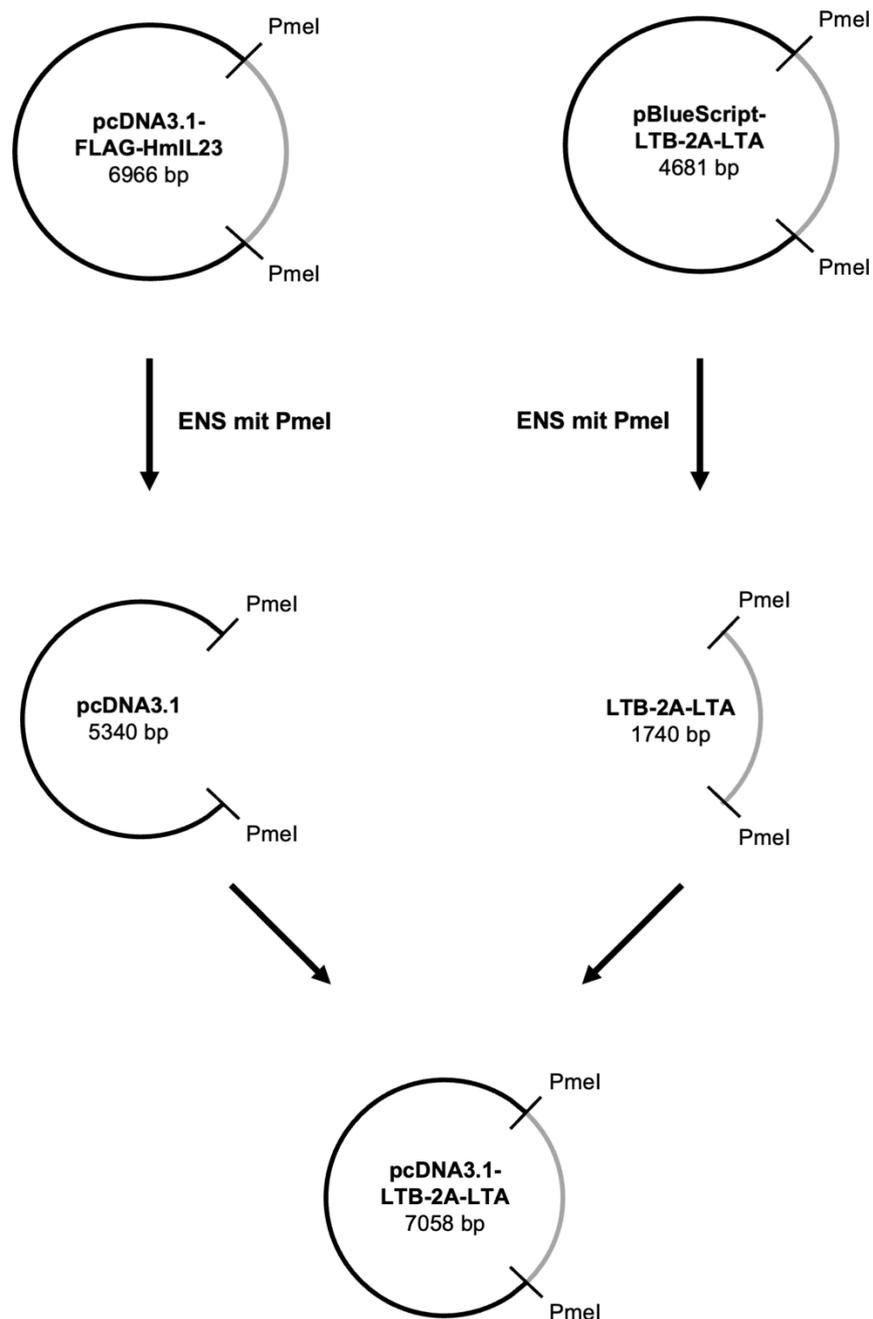


Abb. 6: Schematische Darstellung der Subklonierung von pBlueScript-LTB-2A-LTA in einen pcDNA3.1-Vektor. Das Insert LTB-2A-LTA ist umgeben von Basensequenzen, an die das Restriktionsenzym PmeI bindet. Gleichzeitig ist auch das Insert des Plasmids pcDNA3.1-FLAG-HmIL23 von den Schnittstellen von PmeI umgeben, sodass eine Restriktionsendonukleasespaltung von beiden Plasmiden mit PmeI zum einen das Insert LTB-2A-LTA, zum anderen den Vektor pcDNA3.1 generiert. Die Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese getrennt und unter UV-Licht extrahiert. Abschließend wurden Insert und Backbone mittels Ligation miteinander verbunden, wodurch das Plasmid pcDNA3.1-LTB-2A-LTA entstand. (ENS: Endonukleasespaltung)

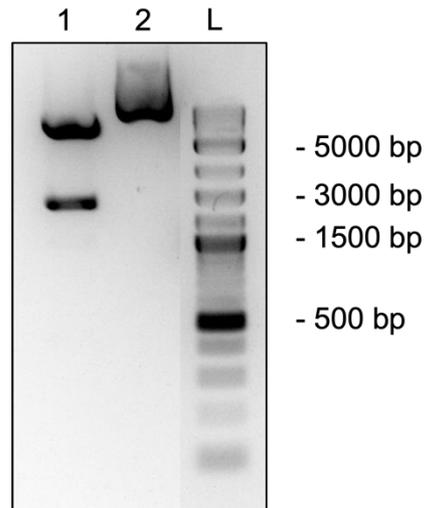
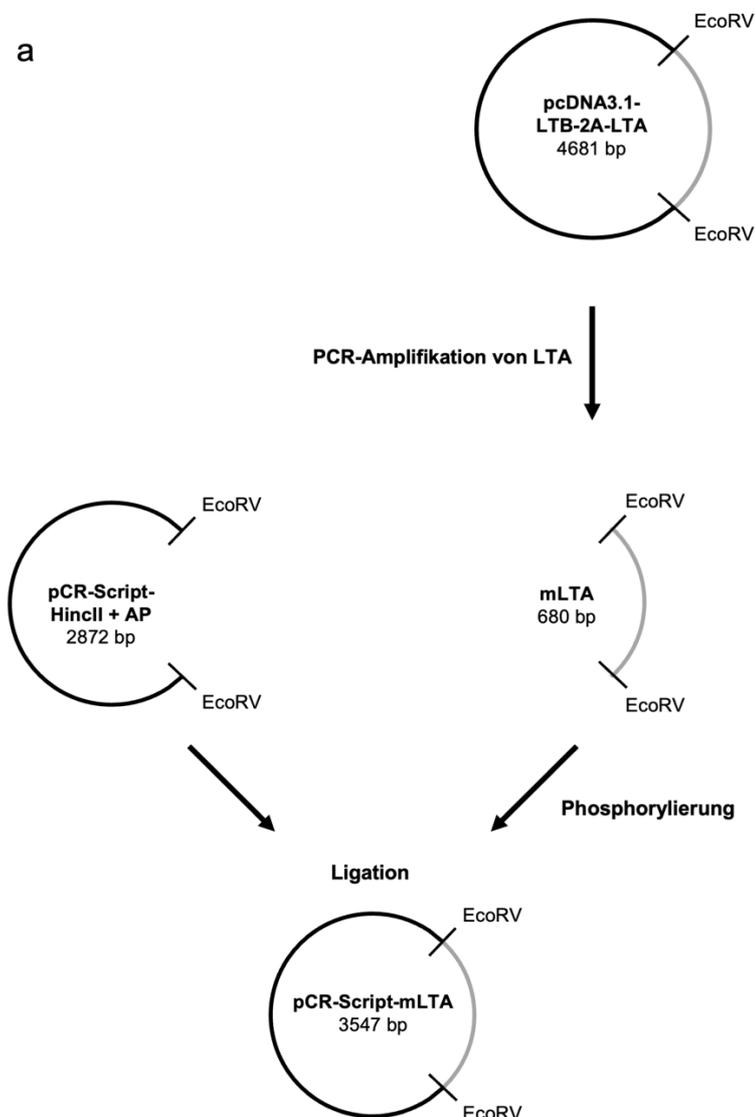


Abb. 7: Analytische Restriktionsendonukleasespaltung von pcDNA3.1-LTB-2A-LTA. Nach Abschluss der Klonierung wurde das resultierende Plasmid mittels Endonukleasespaltung analysiert und sequenziert. Abgebildet ist die Restriktionsspaltung mittels SpeI. Das zirkuläre Plasmid hat eine Größe von 7058 bp, die erwartete Länge der Fragmente beträgt 2334 bp und 4724 bp. Die DNA des unter 1 eingesetzten Klons weist Fragmente dieser Länge auf. Unter 2 ist zirkuläre DNA desselben Klons dargestellt.

Subklonierung von LTA in einen pcDNA3.1-Vektor

Um LT α unabhängig von der Expression von LT β analysieren zu können, ist eine Isolation der jeweils für diese Proteine kodierenden Sequenzen notwendig. Hierzu erfolgte zunächst eine PCR, in der spezifische Primer für die für LT α kodierende Sequenz verwendet wurden. Die Primer wurden so designed, dass sich an den Enden des PCR-Produktes die spezifischen Bindungssequenzen für das Restriktionsenzym EcoRV befanden. Nach Kontrolle des Amplifikats mittels Gelelektrophorese wurden die Plasmide in Vorbereitung auf die Ligation phosphoryliert. Als Vektor wurde pCR-Script-HincII + AP verwendet. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert, im Anschluss erfolgte eine Transformation mit chemisch kompetenten *E. coli*-Bakterien. Die nach erneuter Inkubation gewachsenen Kolonien wurden mittels cPCR überprüft, woraufhin die positiven Klone in LB-Medium expandiert und mittels Restriktionsendonukleasespaltung (vgl. Abb. 9a) kontrolliert wurden. Abschließend wurden die Plasmide sequenziert. Das resultierende Plasmid wurde pCR-Script-mLTA genannt. Im nächsten Schritt erfolgte die Umklonierung des mLTA-Inserts in einen pcDNA3.1-Vektor. Hierzu erfolgte zunächst eine präparative Restriktionsspaltung des Plasmids pCR-Script-mLTA mit EcoRV. Die Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese

kontrolliert und extrahiert. Im Anschluss erfolgte die Elution des Inserts aus dem Agarosegel. Der Vektor wurde wie oben beschrieben aus pcDNA3.1-FLAG-HmIL23 gewonnen und dephosphoryliert. Nach erfolgreicher Ligation wurden der Ligationsansatz inkubiert und in *E.coli* transformiert. Nach Kontrolle der Kolonien mittels cPCR und Expansion der positiven Klone erfolgte eine analytische Restriktionsspaltung (vgl. Abb. 9b). Das Plasmid wurde pcDNA3.1-mLTA-HA genannt. Der schematische Ablauf der Klonierung ist in Abb. 8 dargestellt.



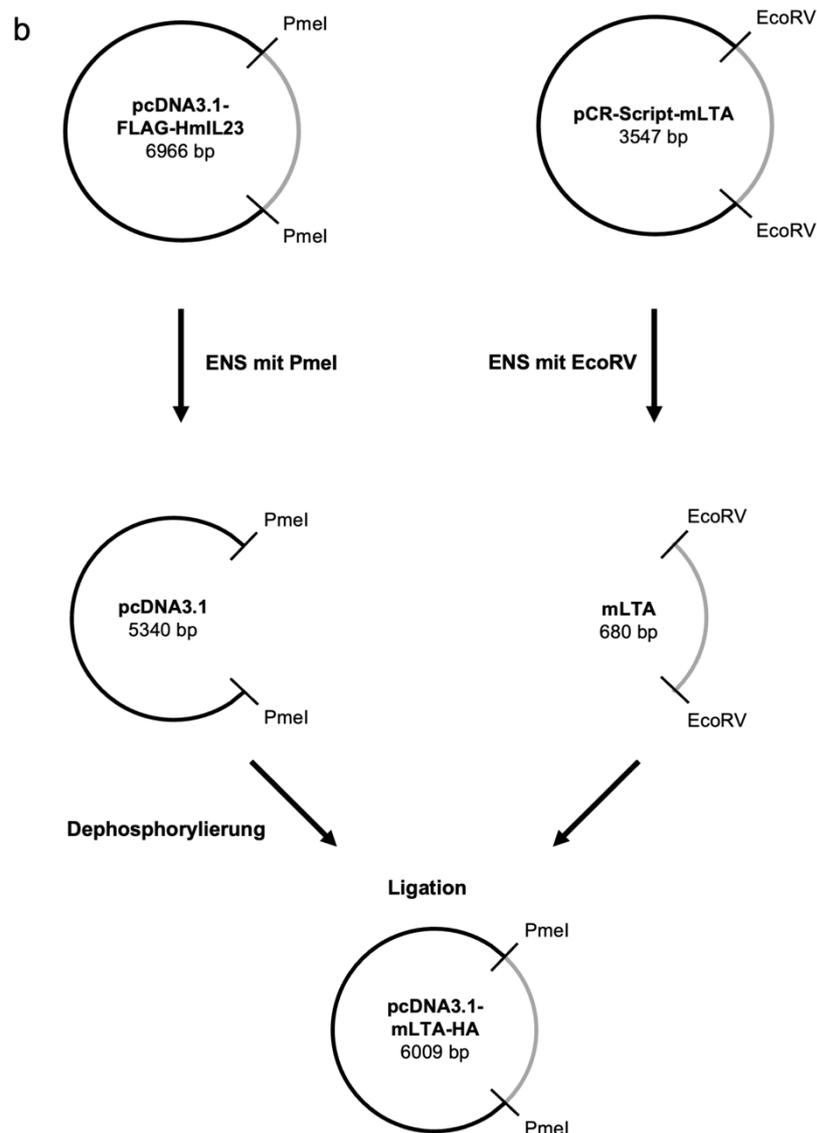


Abb. 8: Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-mLTA-HA über pCR-Script-mLTA als Zwischenschritt. a) Das Insert mLTA wurde mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass das Insert von den Bindungsstellen des Restriktionsenzym EcoRV umgeben ist. Als Vektor wurde pCR-Script HincII + AP aus Institutsbeständen verwendet. Nach einer Phosphorylierung des Amplifikats erfolgte die Ligation von Vektor und Insert zu pCR-Script-mLTA. Das Plasmid wurde anschließend mittels analytischer Restriktionsspaltung und Sequenzierung kontrolliert. b) Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde pCR-Script-mLTA präparativ durch EcoRV gespalten, wodurch das Insert isoliert wurde. Analog zu Abb. 6 wurde pcDNA3.1-FLAG-HmIL23 durch PmeI gespalten, um einen pcDNA3.1-Vektor zu erzeugen. Nach Dephosphorylierung des Vektors wurden Insert und Vektor ligiert und in chemisch-kompetente Zellen überführt. Das Plasmid wurde abschließend mittels Restriktionsspaltung und Sequenzierung kontrolliert und pcDNA3.1-mLTA-HA genannt. (ENS: Endonukleasespaltung)

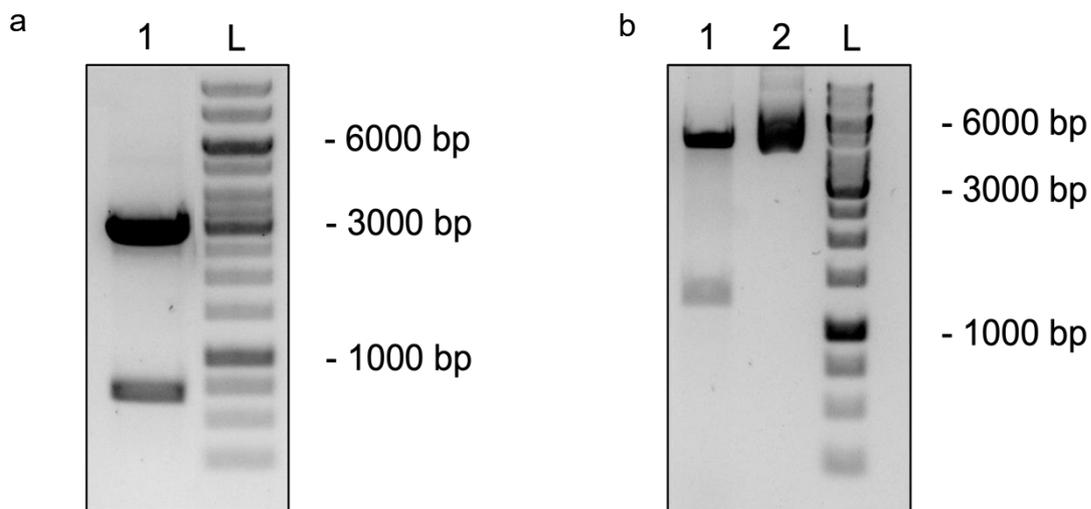
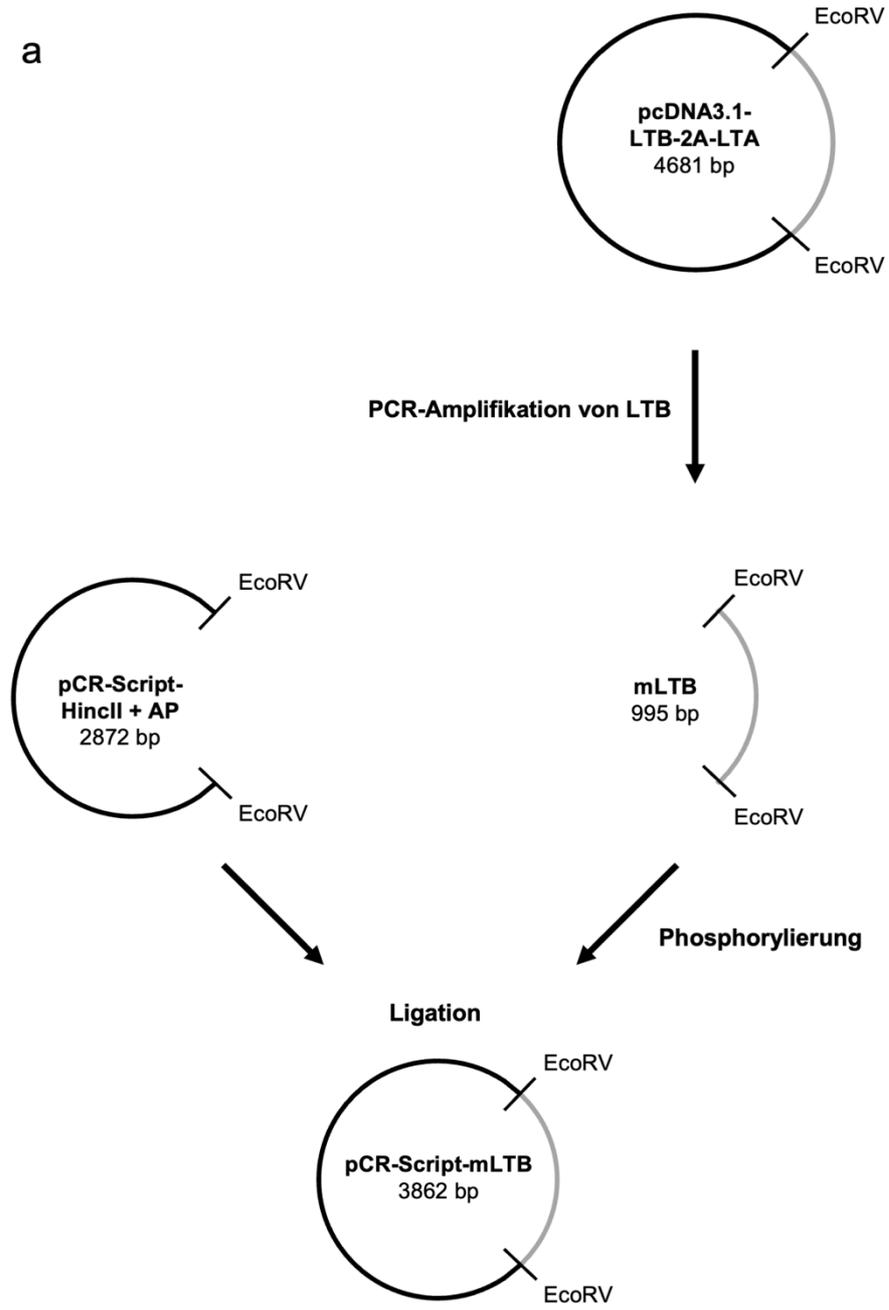


Abb. 9: analytische Restriktionsendonukleasespaltung von pCR-Script-mLTA und pcDNA3.1-mLTA-HA. a) Nach Abschluss der Klonierung erfolgte eine analytische Restriktionsspaltung von pCR-Script-mLTA mit EcoRV. Das zirkuläre Plasmid hat eine Größe von 3547 bp, die erwartete Länge der Fragmente beträgt 669 bp und 2878 bp. Die DNA des unter 1 eingesetzten Klons weist Fragmente dieser Länge auf. b) Auch das Plasmid pcDNA3.1-mLTA-HA wurde mittels Restriktionsspaltung analysiert, als Enzym wurde hier SpeI eingesetzt. Die Länge erwartete Länge der Fragmente nach Endonukleasespaltung beträgt 1284 bp und 4725 bp, das zirkuläre Plasmid hat eine Länge von 6009 bp. Die unter 1 aufgeführten Fragmente entsprechen den erwarteten Längen. Unter 2 ist das zirkuläre Plasmid aufgeführt.

Subklonierung von LTB in einen pcDNA3.1-Vektor

Um auch die Expression von LT β unabhängig analysieren zu können, erfolgte analog zu LT α eine Isolierung von LTA aus pcDNA3.1-LTB-2A-LTA. Das Vorgehen entspricht weitestgehend dem oben beschriebenen Schema und ist in Abb. 10 schematisch dargestellt. Lediglich die eingesetzten Primer zur Amplifikation von LTB aus pcDNA3.1-LTB-2A-LTA unterschieden sich, um entsprechend die kodierende Sequenz für LTB zu amplifizieren. Auch hier erfolgte zur Kontrolle der Plasmide eine Restriktionsspaltung (vgl. Abb. 11) sowie eine Sequenzierung.

a



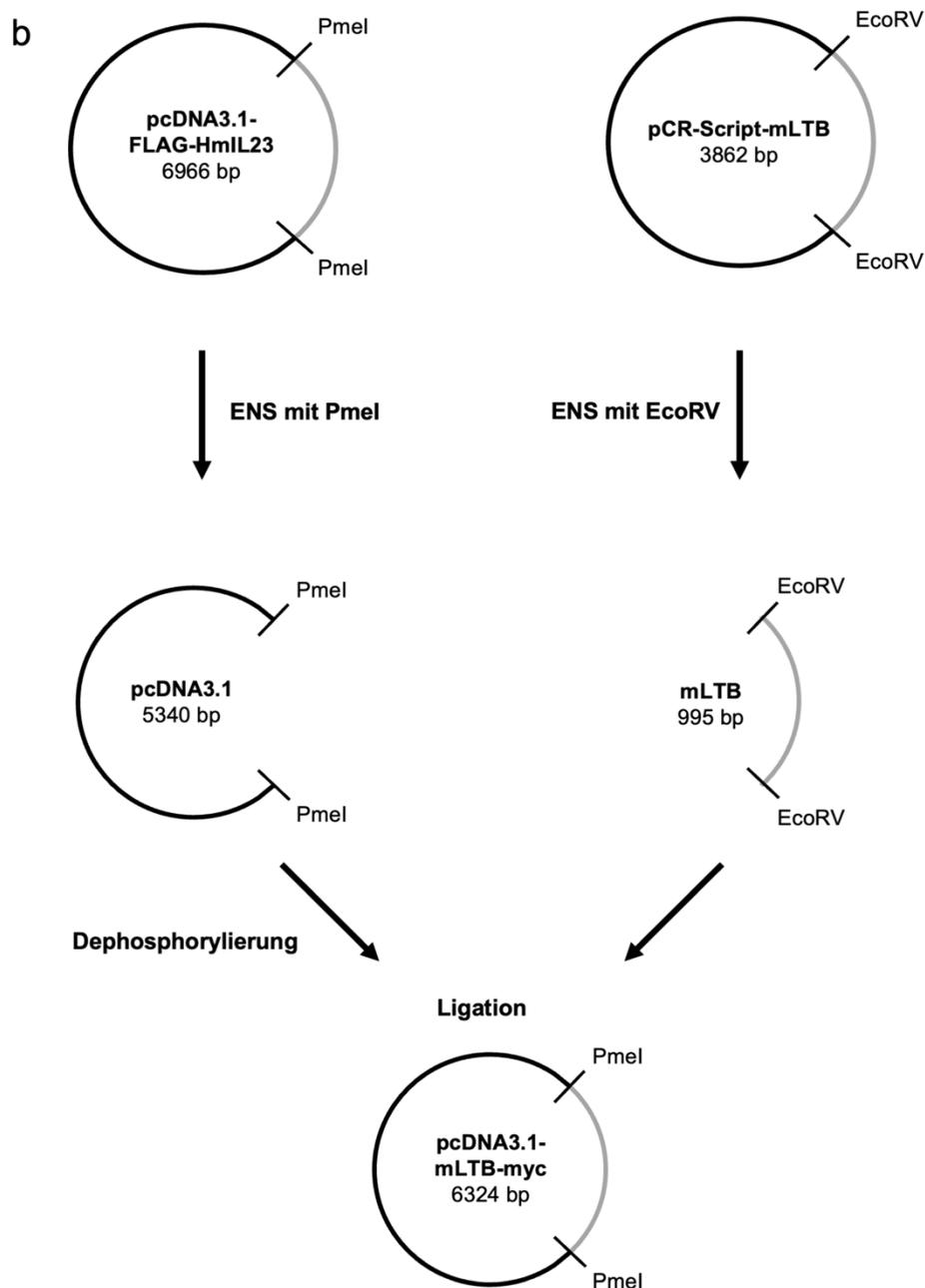


Abb. 10: Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-mLTB-myc über pCR-Script-mLTB als Zwischenschritt. a) Das Insert mLTB wurde mittels PCR aus pcDNA3.1-LTB-2A-LTA amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass das Insert von den Bindungsstellen des Restriktionsenzym *EcoRV* umgeben ist. Als Vektor wurde pCR-Script HincII + AP aus Institutsbeständen verwendet. Nachdem das Amplifikat phosphoryliert wurde, erfolgte die Ligation von Insert und Vektor. Das resultierende Plasmid wurde mittels Restriktionsendonukleasespaltung und Sequenzierung kontrolliert und pCR-Script-mLTB genannt. b) pCR-Script-mLTB wurde präparativ durch *EcoRV* gespalten, um so das Insert mLTB aus dem Plasmid zu schneiden. Analog zu Abb. 9 wurde pcDNA3.1-FLAG-HmIL23 durch *PmeI* gespalten, um einen pcDNA3.1-Vektor zu erzeugen. Der Vektor wurde dephosphoryliert, im Anschluss erfolgte die Ligation von Insert und Vektor. Das Plasmid wurde

in chemisch kompetente E. coli überführt und nach Kontrolle der Kolonien mittels cPCR wurde das Plasmid in mittels Restriktionsspaltung und Sequenzierung analysiert. Das fertige Plasmid wurde pcDNA3.1-mLTB-myc genannt. (ENS: Endonukleasespaltung)

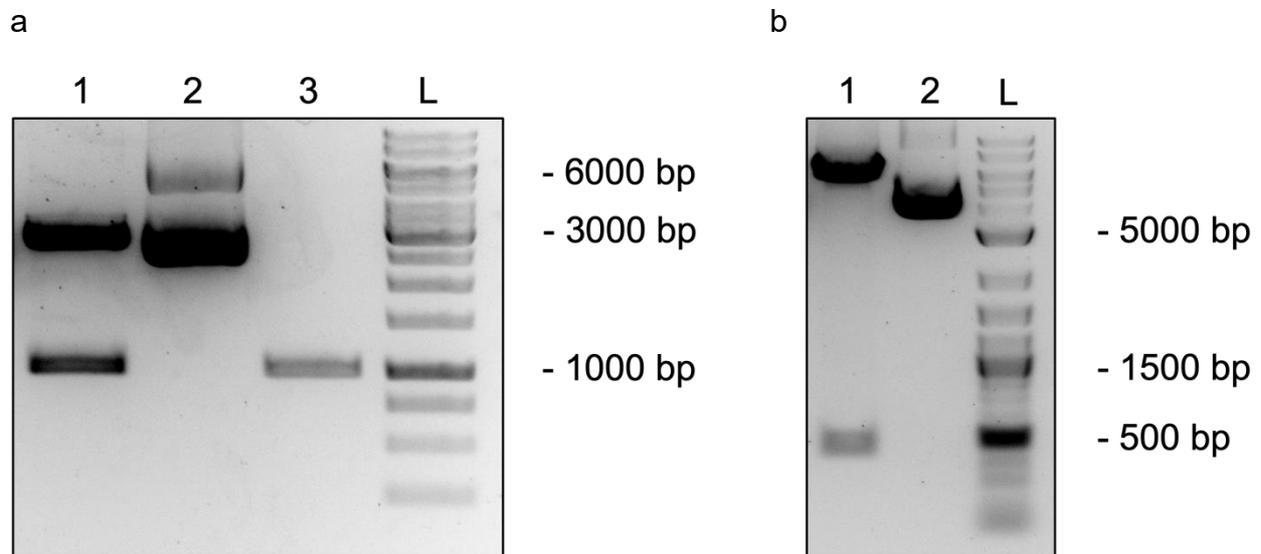


Abb. 11: analytische Restriktionseendonukleasespaltung von pCR-Script-mLTB und pcDNA3.1-mLTB-myc. a) Nach Abschluss der Klonierung von pCR-Script-mLTB erfolgt eine analytische Restriktionsspaltung mit EcoRV. Die erwartete Länge der Fragmente beträgt 984 bp und 2878 bp, dies ist vereinbar mit den unter 1 dargestellten Banden. Als Kontrollbedingungen ist unter 2 das zirkuläre Plasmid aufgeführt, unter 3 das zirkuläre Insert mLTB. b) Auch das Plasmid pcDNA3.1-mLTB-myc wurde nach Abschluss der Klonierung mittels Restriktionsspaltung analysiert. Die Länge des zirkulären Plasmids beträgt 6324 bp, die erwarteten Fragmentlängen nach Restriktionsspaltung durch NdeI und AflII betragen 431 bp und 5893 bp. Dies ist vereinbar mit den unter 2 dargestellten Banden. Unter 2 ist das ungespaltene Plasmid aufgeführt.

Subklonierung von pcDNA3.1-LTB-2A-LTA in den Expressionsvektor pMOWS-puro

Zur Durchführung einer retroviralen Transduktion von pcDNA3.1-LTB-2A-LTA erfolgte eine Subklonierung in einen pMOWS-puro-Vektor (vgl. Abb. 12). 10 µg des Plasmids pcDNA3.1-LTB-2A-LTA wurde mit PmeI geschnitten und die gesuchten Fragmente nach Gelelektrophorese aus dem Agarosegel eluiert. Als Vektor wurde ein bereits geschnittenes pMOWS-puro-Plasmid aus Institutsbeständen verwendet. Das Insert und der Vektor wurden ligiert (vgl. Abschnitt 3.2.1.7), anschließend erfolgten eine Transformation und Präparation der ligierten DNA. Das resultierende Plasmid wurde pMOWS-puro-LTB-2A-LTA genannt.

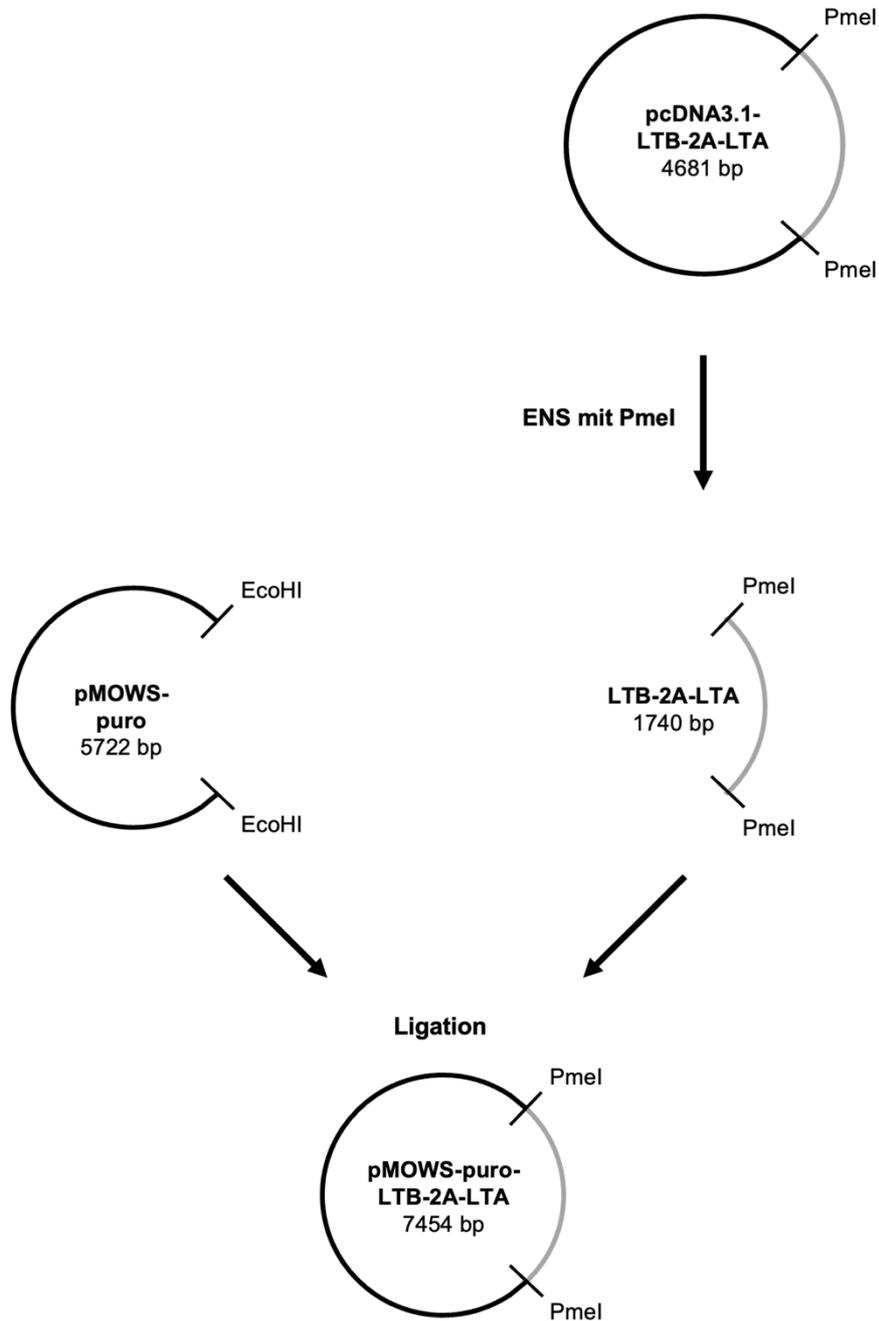


Abb. 12: Überführen von pcDNA3.1-LTB-2A-LTA in einen pMOWS-puro-Expressionsvektor. Die Umklonierung ist schematisch dargestellt. Durch eine präparative Endonukleasespaltung mit PmeI wird das LTB-2A-LTA-Insert aus dem pcDNA3.1-Vektor isoliert. Als Vektor wurde ein bereits präpariertes pMOWS-puro-Plasmid verwendet. In einem Ligationsansatz wurde das Insert in den Vektor eingefügt. Das fertige Plasmid wurde pMOWS-puro-LTB-2A-LTA genannt. (ENS: Endonukleasespaltung)

4.1.1 Expression von $LT\alpha$ und $LT\beta$ in HEK293T-Zellen

Um zu überprüfen, ob die klonierten cDNAs im Rahmen der Transkription und Translation in die entsprechenden Proteinketten umgesetzt werden, erfolgte eine

Transfektion in HEK293-T-Zellen. Hierzu wurde eine 10 cm Schale mit HEK293-T-Zellen mit 5 µg Plasmidansatz versetzt und für zwei Tage inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die Proteine in den Lysaten mittels SDS-PAGE voneinander getrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurden die Proteine mit Antikörpern detektiert; dabei wurde für LT α ein HA-Antikörper, für LT β ein myc-Antikörper verwendet (vgl. 4.1). Zur Analyse der Sekretion der Proteine erfolgte ebenfalls eine Analyse der Zellkulturüberstände. Das Vorgehen hier entsprach dem bei der Verarbeitung der Zelllysaten, jedoch konnte bei den Überständen auf eine Lyse verzichtet werden.

Wie in Abb. 13 zu sehen ist, waren LT α und LT β in allen entsprechend transfizierten Zelllysaten nachweisbar. In den Zellkulturüberständen konnte zwar LT α nachgewiesen werden, nicht jedoch LT β . Aufgrund der posttranslationalen Glykosylierung der Proteine fällt die im Western Blot gemessenen Molekulargewichte höher aus als in Abschnitt 1.2.1 beschrieben. Da die Proteinkonzentration der Zelllysate und Zellkulturüberstände nicht bestimmt wurde und eine Standardmenge von 40 µl Lysat bzw. Zellkulturüberstand in Lämmli-Puffer geladen wurde, ist ein Rückschluss auf die quantitative Expression nicht möglich. Die Lysate und Zellkulturüberstände, die zur Bestimmung von LT α und LT β verwendet wurden, stammten aus derselben Zellkulturschale. Diese Ergebnisse bestätigen somit, dass die zuvor auf cDNA-Ebene klonierten Expressionsplasmide in der HEK293T-Zelllinie exprimiert werden. Insbesondere konnte auch nachgewiesen werden, dass das Plasmid pcDNA3.1-LTB-2A-LTA in der Lage ist, sowohl LT α als auch LT β zu exprimieren. Die Plasmide können somit für weitere Experimente eingesetzt werden.

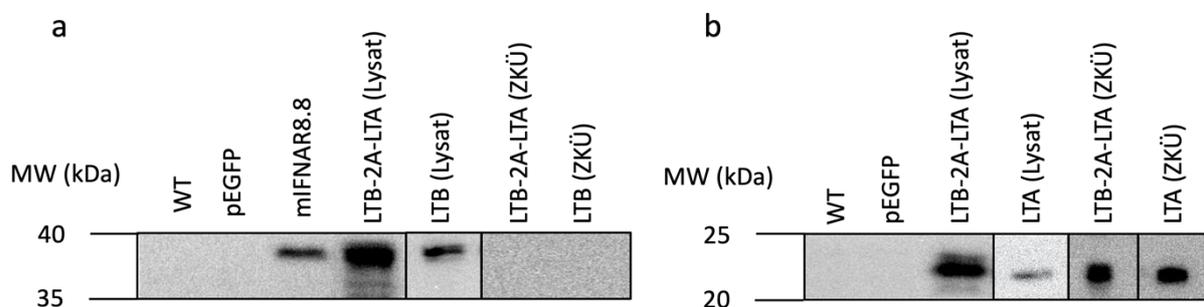


Abb. 13: Expression der LT-Plasmide in HEK293T-Zellen. Die Plasmide pcDNA3.1-mLTA-HA, pcDNA3.1-mLTB-myc und pcDNA3.1-LTB-2A-LTA wurden in HEK293T-Zellen transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen lysiert sowie die Zellkulturüberstände (ZKÜ) abzentrifugiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Als Kontrollen sind Wildtyp-Zellen (WT), pEGFP sowie mIFNAR8.8 aufgetragen. a) Bei Zugabe von anti-myc-Antikörpern konnte Lymphotoxin β in Zellen nachgewiesen

werden, die mit pcDNA3.1-mLTB-myc oder pcDNA3.1-LTB-2A-LTA transfiziert wurden. Lymphotoxin β besitzt nach posttranslationaler Modifikation ein Molekulargewicht von ca. 37 kDa, ebenso mFNAR8.8. Die dargestellten Banden entsprechen dieser Größe. In den Zellkulturüberständen ließ sich LT β nicht nachweisen. b) Bei Verwendung eines anti-HA-Antikörpers zur Detektion von Lymphotoxin α ließ sich dieses Protein sowohl in Lysaten als auch in Zellkulturüberständen der Zellen nachweisen, die mit pcDNA3.1-mLTA-HA oder pcDNA3.1-LTB-2A-LTA transfiziert wurden. Das Molekulargewicht von Lymphotoxin α beträgt 22 kDa, was den Banden der Blots entspricht.

4.1.2 Erzeugung stabiler Ba/F3-gp130-Zellen mit LT α und LT β

Zur Analyse der Signaltransduktion von Lymphotoxin α und β wurde die murine prä-B-Zelllinie Ba/F3-gp130 verwendet. Diese entstammen ursprünglich murinem Knochenmark und stellen eine frühe Entwicklungsstufe der lymphoblastischen Zelllinie dar. Interleukin 3 (IL-3)-abhängige Zellen eignen sie sich gut zur Untersuchung der Signaltransduktion von Zytokinen (Suthaus *et al.*, 2010). Da diese Zellen über das membranständige Rezeptorprotein Glykoprotein 130 (gp130) verfügen, können die Zellen durch Hyper-Interleukin-6 (HIL-6, vgl. 3.2.3.3) stimuliert werden.

Der zuvor generierte pMOWS-Expressionsvektor (vgl. Abb. 12) wurde entsprechend dem in 3.2.3.3 genannten Vorgehen transduziert. Nach zweiwöchiger Selektion der Zellen durch das Selektionsantibiotikum Puromycin wurden die Zellen mit Hilfe spezifischer Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch auf die Expression von LT α und LT β auf ihrer Zellmembran untersucht.

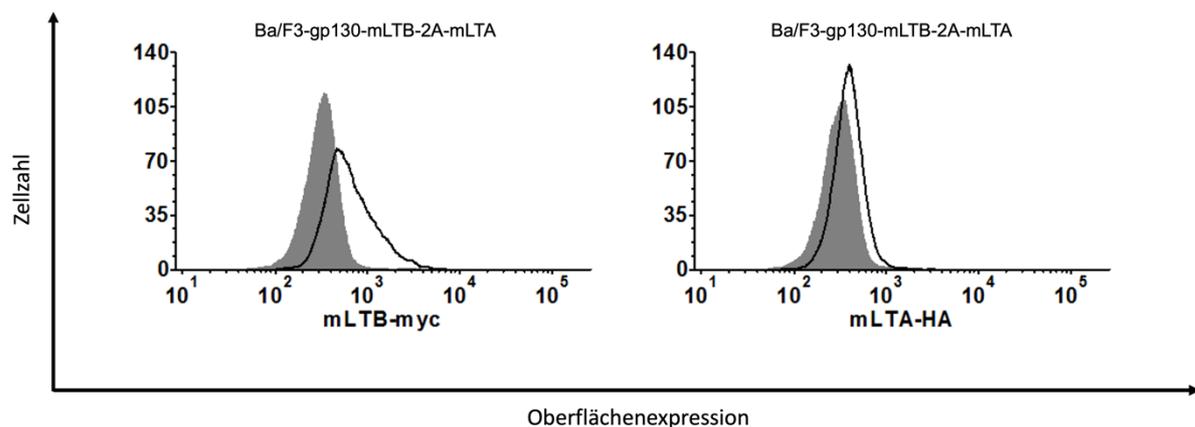


Abb. 14: Analyse der Oberflächenexpression von LT α und LT β in Ba/F3-gp130-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die untersuchte Zelllinie wurde durch Anfärben mit einem für das jeweilige Protein spezifischen Antikörper (anti-HA bzw. anti-myc) und anschließender Durchflusszytometrie auf die Oberflächenexpression der jeweiligen Zytokine untersucht. Auf der Abszisse ist die Intensität der Fluoreszenz aufgetragen, die somit indirekt das Maß der Zytokinexpression darstellt. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Zellen mit bestimmter Fluoreszenz abgebildet. Die grau hinterlegten Histogramme

stellen Ba/F3-gp130-Zellen dar und dienen als Negativkontrolle, während die weißen Histogramme der im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Zelllinien darstellen. Die Rechtsverschiebung der Intensität der Fluoreszenz zwischen der Negativkontrolle und den stabil transfizierten Zellen stellt die Expression von LT β bzw. LT α dar.

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der FACS-Analyse. Auf der Abszisse ist die Intensität der Fluoreszenz und somit die Stärke der Lymphotoxin-Oberflächenexpression dargestellt, die Ordinate zeigt die Anzahl der Zellen mit definierter Fluoreszenz. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte BaF3-gp130-Zellen, die ebenfalls mit den Antikörpern gefärbt und als graue Histogramme dargestellt wurden. Die Histogramme der im Rahmen dieser Arbeit generierten Ba/F3-gp130-LTB-2A-LTA-Zellen sind als schwarze Linie dargestellt. Es zeigt sich bei Zugabe eines myc-Antikörpers, der an LT β bindet, eine deutliche Rechtsverschiebung des Histogramms der Zellen, sowie eine geringfügige Rechtsverschiebung bei Zugabe eines HA-Antikörpers zur Detektion der LT α -Oberflächenexpression. Diese Daten belegen, dass sowohl LT α als auch LT β auf der Oberfläche der Ba/F3-gp130-Zellen exprimiert werden, wobei die unterschiedlich ausgeprägte Rechtsverschiebung auf eine stärkere Oberflächenexpression von LT β hinweist.

Die Ba/F3-gp130-LTB-2A-LTA-Zelllinie wurde nicht weiter im Rahmen dieser Arbeit untersucht und verblieb als Grundlage weiterer Analysen in der AG Scheller.

4.2 Generierung von LT β -Deletionsmutanten

In-silico Analyse und Design der Primer

Um zu untersuchen, welche Region von LT β für das ADAM17-Shedding für Bedeutung ist, wurden drei verschiedene Deletionsmutanten des Zytokins erstellt, in denen unterschiedliche Teile der *Stalk*-Region von LT β deletiert wurden. Die Identifikation der Domänengrenzen erfolgte durch die Datenbank *Uniprot* sowie durch ein Alignment von humanem und murinem LT β (vgl. Abb. 15).

wurden (vgl. Abschnitt 3.2.1.11). Für die Durchführung der SOE-PCR wurde nach dem in Abschnitt 3.2.1.11 genannten Schema verfahren. Das PCR-Produkt und der gewünschte Vektor wurden anschließend mit den gleichen Enzymen geschnitten, die in der Klonierung von pcDNA3.1-mLTB-myc verwendet wurden. Die Fragmente wurden aus Agarosegelen extrahiert und ligiert. Abschließend wurden diese Inserts in chemisch kompetenten *XL1 blue E.coli*-Zellen transformiert, mittels Antibiotikum selektiert und nach Colony-PCR in einer Mini- oder Midi-Präparation aus den Bakterien isoliert. Entsprechend der jeweiligen Deletion in Abb. 27 wurden die resultierenden Plasmide pcDNA3.1-mLTB $\Delta 1$, $-\Delta 2$ bzw. $-\Delta 3$ genannt.

Das genaue Verfahren soll im Folgenden exemplarisch an Deletionsmutante $\Delta 1$ erläutert werden:

Die erste PCR erfolgte mit Primer V (5') und Primer X (3') mit pcDNA3.1-mLTB-myc als Template (Fragmentgröße 327 bp). Die zweite PCR wurde mit Primer VIII (5') und Primer VI (3') durchgeführt, auch hier diente pcDNA3.1-mLTB-myc als Template (Fragmentgröße: 560 bp). Die PCR-Produkte wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese getrennt. Anschließend wurden die Fragmente unter UV-Beleuchtung mit einem Skalpell ausgeschnitten und mithilfe eines Kits extrahiert und gereinigt. Die beiden PCR-Produkte wurden nun als Templates für eine dritte PCR genutzt, wobei die Primer V und VI eingesetzt wurden (Fragmentgröße: 581 bp). Erneut wurde das PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese extrahiert und über ein Kit gereinigt. Das resultierende PCR-Produkt wurde zur Sequenzierung verschickt.

Tab. 18: Übersicht über die Klonierung der Deletionsmutanten

Nr.	Template-DNA	Primer	Fragmentlänge	Restriktionsenzyme
$\Delta 1$	pcDNA3.1-mLTB-myc	PCR 1: MJ5 und MJ10	327 bp	EcoRV, AflIII + NotI
		PCR 2: MJ8 und MJ6	560 bp	
		PCR 3: MJ5 und MJ6	847 bp	
$\Delta 2$	pcDNA3.1-mLTB-myc	PCR 1: MJ5 und MJ12	217 bp	EcoRV, AflIII + NotI
		PCR 2: MJ11 und MJ6	825 bp	
		PCR 3: MJ5 und MJ6	997 bp	
$\Delta 3$	pcDNA3.1-mLTB-myc	PCR 1: MJ5 und MJ16	267 bp	EcoRV, AflIII + NotI
		PCR 2: MJ14 und MJ6	611 bp	
		PCR 3: MJ5 und MJ6	838 bp	

4.2.1 Expression der Deletionsmutanten in HEK293T- und Ba/F3-gp130-Zellen

Um zu überprüfen, ob die mittels SOE-PCR generierten Plasmide exprimiert wurden, erfolgte eine Klonierung der Plasmide in einen pcDNA3.1-Vektor mit anschließender Restriktionsendonukleasespaltung (vgl. Abb. 16a). Anschließend wurden die Plasmide transient in HEK293T-Zellen transfiziert und die Zelllysate im Western Blot durch myc-spezifische Antikörper detektiert. Wie Abb. 16b zeigt, kam es bei allen drei Deletionsmutanten zu einer Expression von LT β .

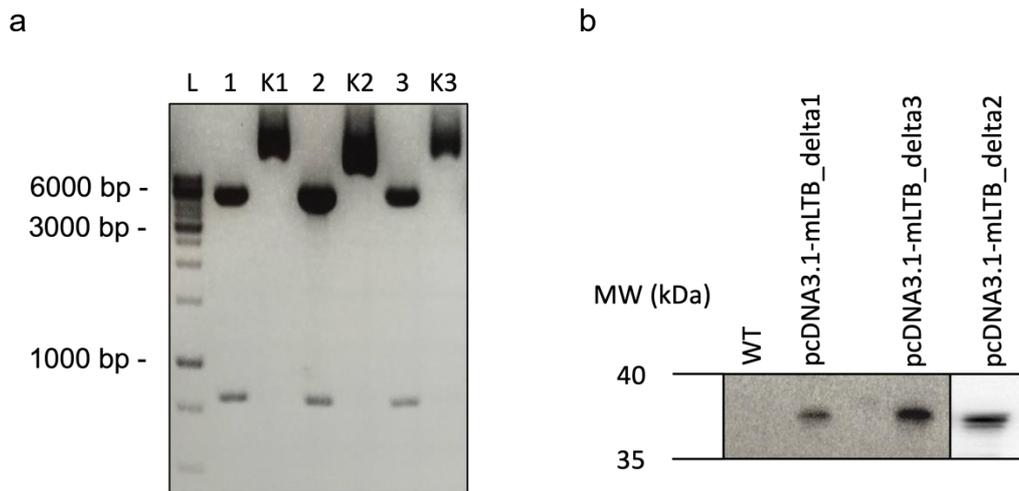


Abb. 16: Testendonukleasespaltung und -expression der LT β -Deletionsmutanten in HEK293T-Zellen. a) Die zuvor generierten Plasmide der drei Deletionsmutanten wurden in einen pcDNA3.1-Vektor kloniert. Zur Überprüfung der korrekten Klonierung erfolgte eine Endonukleasespaltung mit AflIII und NotI, im Anschluss wurden die Plasmide mittels Gelelektrophorese getrennt und unter UV-Licht dargestellt. Als Kontrolle (K1-3) wurden die zirkulären Plasmide verwendet. Die erwarteten Fragmentgrößen betragen für Variante 1 5360 bp + 766 bp, für Variante 2 5360 bp + 916 bp und für Variante 3 5360 bp + 757 bp. Die erwarteten Größen der zirkulären Plasmide beträgt 6126 bp (Variante 1), 6276 bp (Variante 2) und 6117 bp (Variante 3). Dies ist mit den dargestellten Banden vereinbar. b) Nach erfolgreicher Endonukleasespaltung wurden die Plasmide transient in HEK293T-Zellen transfiziert, um die Expression der Plasmide zu überprüfen. Als Kontrolle dienten untransfizierte HEK293T-Zellen (WT). Die dargestellte Bande ist vereinbar mit der erwarteten Zytokingröße von 37 kDa.

Abschließend wurden die Plasmide in Vorbereitung der Generierung einer stabilen Zelllinie in Ba/F3-Zellen in einen pMOWS-Vektor kloniert, das Vorgehen hier entsprach dem in Abschnitt 4.1.2. Die resultierenden Plasmide wurden pMOWS-puro-mLTB_delta1, -mLTB_delta2 und -mLTB_delta3 genannt. Wie Abb. 17 zeigt, kam es in den Lysaten der transfizierten HEK293T-Zellen zu einer schwachen Expression von LT β .

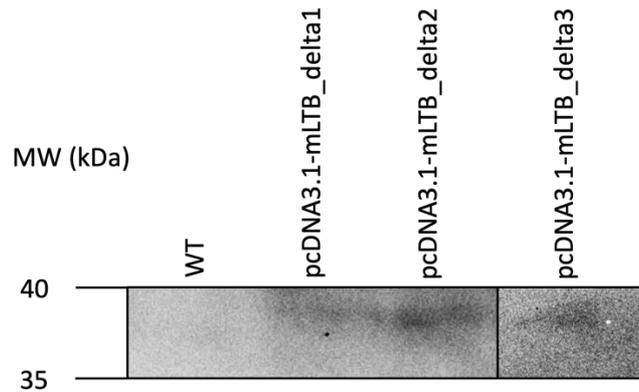


Abb. 17: Testexpression der Plasmide pMOWS-puro-mLTB_delta1, -mLTB_delta2 und -mLTB_delta3 in HEK293T-Zellen. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK293T-Zellen verwendet. Die dargestellten Banden sind mit der erwarteten Größe von 37 kDa vereinbar.

Die generierten Plasmide verblieben in der AG Scheller und dienten als Grundlage der Dissertation von Stephan Pieper (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Düsseldorf).

4.3 Der Einfluss von ADAM10 und ADAM17 auf die LT α -Sekretion

4.3.1 Die *Shedding*-Analyse von LT α erfordert die Entwicklung eines spezifischen Assays

Zur Untersuchung der Sekretion von LT α und LT β wurde zunächst ein institutsintern validiertes *Shedding*assayprotokoll verwendet, das zur Analyse der *Shedding*-Aktivität von ADAM17 entwickelt wurde (Franke, 2016). Hierzu wurden die Zelllinie Ba/F3-gp130-mLTB-2A-mLTA verwendet (vgl. Abschnitt 4.1.2). Hierdurch soll einerseits überprüft werden, dass die zuvor stabil transfizierten Zellen (vgl. 4.1.2) LT α und LT β sekretieren, andererseits wurde der Effekt unterschiedlicher ADAM-Inhibitoren auf die Sekretion der Zytokine überprüft.

Die Zellen wurden von der Zellkulturschale gelöst bei 1200 g für 5 Minuten bei RT abzentrifugiert und nach Resuspension in 6 ml DMEM^{+/+} gleichmäßig in die Vertiefungen einer 6-Well-Platte gegeben, wobei je 1 ml Suspension pro Vertiefung verwendet wurde. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurde das Medium durch DMEM^{-/-} ersetzt und die Zellen für 30 min mit Inhibitoren inkubiert. Hierzu wurden 3 μ M GI254023X (Hemmung von ADAM10, GI) sowie 3 μ M GW280264X (Hemmung von ADAM10 und ADAM17, GW) und 10 μ M Marimastat (Breitbandmetalloproteinase-

hemmer) eingesetzt. Anschließend erfolgte eine gleichzeitige Stimulation von ADAM10 sowie von ADAM17 durch Zugabe von 100 nM PMA für zwei Stunden. Als Kontrollbedingung wurde 100 nM DMSO für 30 min zugegeben. Das Experiment wurde insgesamt dreimal wiederholt und die Messergebnisse gemittelt.

Der Zellkulturüberstand wurde abschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Entfernung von Zelltrümmern zentrifugiert (5 min, 15.000 g, RT). Die gewonnenen Überstände wurden für die Analyse im ELISA verwendet.

In den Überständen konnten sowohl $LT\alpha$ als auch $LT\beta$ nachgewiesen werden. Wie Abb. 18 jedoch zeigt, fand sich im $LT\beta$ -ELISA der ZKÜ kein Effekt der Inhibition, und im $LT\alpha$ -ELISA lag die Konzentration in allen Inhibitionsbedingungen unterhalb der DMSO-Kontrolle.

Aus diesem Experiment folgte, dass die Verwendung des etablierten Protokolls zur Untersuchung von induziertem *Shedding* nicht zur Analyse der $LT\alpha$ -Sekretion geeignet ist und dass die Entwicklung eines spezifischen Assays notwendig ist.

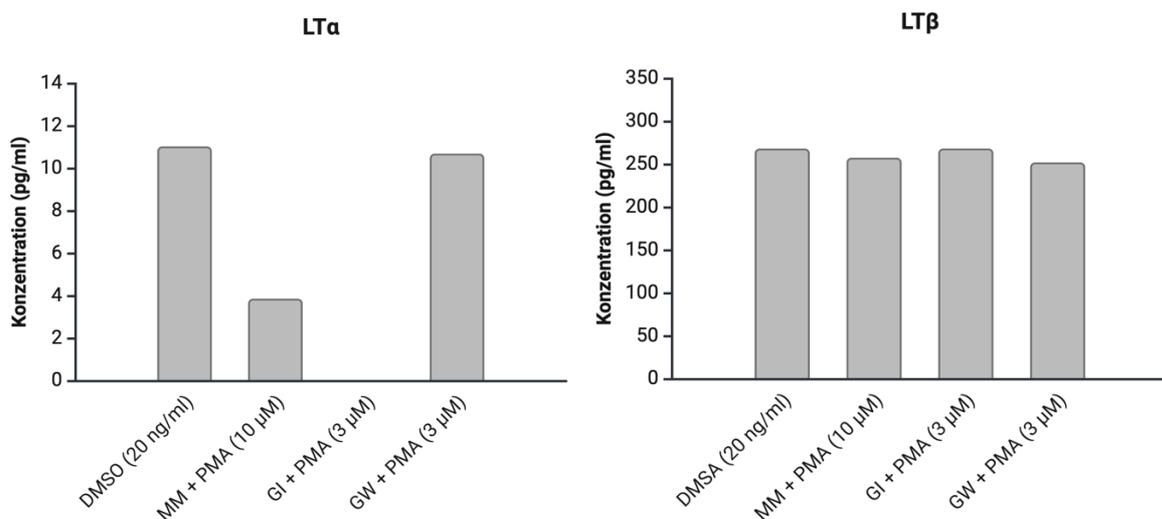


Abb. 18: $LT\alpha$ und $LT\beta$ im ZKÜ stabil transfizierter Ba/F3-Zellen. Die Abszissen beider Diagramme zeigen die jeweiligen Stimulationsbedingungen inkl. eingesetzter Konzentrationen, die Ordinaten die jeweilige LT-Konzentration. Bestimmt wurden die Konzentrationen in den ZKÜ der Zellen, wobei jeweils aus denselben Überständen $LT\alpha$ und $LT\beta$ bestimmt wurden. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

4.3.2 PMA-Stimulation führt zu einer Steigerung der $LT\alpha$ -Sekretion

Zur weiteren Untersuchung der $LT\alpha$ -Sekretion wurden in folgenden Experimenten humane Jurkat-T-Zellen verwendet, da diese endogen $LT\alpha$ synthetisieren (Li *et al.*,

1999) und aufgrund ihrer einfacheren Kultivierung schneller zur Durchführung der Versuche expandiert werden konnten.

Bevor die Experimente zum Einfluss von ADAM10 und ADAM17 erfolgen konnten, musste zunächst experimentell untersucht werden, dass eine induzierte Sekretion von LT α in diesen Zellen möglich ist. Zur Induktion des *Sheddings* wurde der Phorbolester PMA eingesetzt. Wildtyp-Jurkat-T-Zellen wurden hierzu von einer Zellkulturflasche in ein 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß übertragen und bei 1500 rpm und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml RPMI^{+/+}-Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Im Anschluss erfolgte der Transfer von $1 \cdot 10^6$ Zellen in eine 10-cm-Schale, die dann mit RPMI^{+/+} auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt wurde. Somit befand sich in jedem Well die gleiche Menge Zellen, in der gleichen Menge Zellkulturmedium. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C erfolgte die Bestimmung der Zellvitalität, wobei nur bei einer Vitalitätsmessung $\geq 98\%$ mit dem Versuch fortgefahren wurde. Es erfolgte die Zugabe von 20 ng/ml PMA. Als Kontrollbedingung wurde einer zweiten Zellkulturschale 20 ng/ml DMSO zugesetzt, eine dritte Schale wurde nicht stimuliert. Nach 30-minütiger und 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Zellsuspension jeweils einer Schale aller drei Experimental- und Kontrollbedingungen bei 1500 rpm und RT zentrifugiert und der Zellkulturüberstand mittels ELISA auf humanes LT α untersucht. Das Experiment wurde insgesamt dreimal wiederholt.

Wie Abb. 19 zeigt, führte die PMA-Gabe zu einem deutlichen Anstieg der LT α -Sekretion im Vergleich zu LT α -Konzentration 30 Minuten nach Beginn der Stimulation. In weiteren Experimenten wurde daher die Gabe von PMA zur Stimulation der Ausschüttung von LT α verwendet. Das hier etablierte Vorgehen wurde daher in allen folgenden Experimenten zur Steigerung der LT α -Sekretion als Positivkontrolle und in Kombination mit GI, GW und Marimastat zur *Shedding*-Analyse eingesetzt.

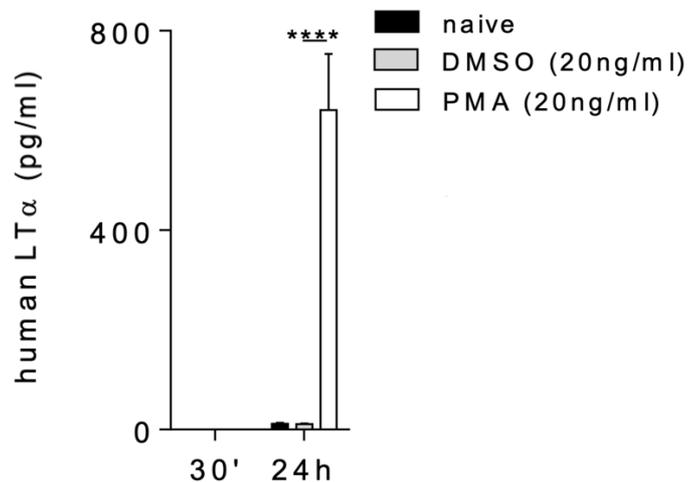


Abb. 19: PMA-Stimulation bewirkt einen Anstieg der LT α -Sekretion. Auf der Abszisse sind die Zeitpunkte nach Beginn der Stimulation mit PMA angegeben, die Messzeitpunkte liegen bei 30 Minuten und 24 Stunden. Auf der Ordinate ist die im ELISA gemessene LT α -Konzentration aufgetragen. Die Farbe der Balken gibt an, ob es sich um die mit PMA stimulierte Experimentalbedingung (weiß), die Kontrollbedingung mit DMSO (grau) oder die unstimulierte Kontrollbedingung (schwarz) handelt. Die dargestellten Daten entsprechen den gemittelten, in drei biologischen Replikaten gemessenen Werten. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der LT α -Konzentration unter PMA-Stimulation ($p < .000001$). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

4.3.3 Der Einfluss der ADAM-Inhibition auf die LT α -Sekretion unterliegt einer zeitlichen Kinetik

Nachdem im vorangegangenen Versuch gezeigt werden konnte, dass die Stimulation von Jurkat-T-Zellen mit PMA zu einer verstärkten Sekretion von LT α führt, wurden im nächsten Versuch die in 4.3.1 verwendeten Inhibitionsbedingungen verwendet. Da die Stimulationszeit in 4.3.1 nicht ausreichte, um nachweisbare Konzentrationen an LT α zu erzeugen, wurde eine Kinetik über einen Zeitraum von 24 h mit Messungen der LT α -Konzentration nach 2, 6, 12 und 24 h durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen wurde entsprechend dem Protokoll in Abschnitt 4.3.2 durchgeführt, die Inhibitionsbedingungen entsprechen dem Vorgehen in Abschnitt 4.3.1. Der Versuchsaufbau wurde um eine Positivkontrolle mit PMA ergänzt, um den Erfolg der Stimulation zu überprüfen. Das Experiment wurde insgesamt dreimal wiederholt und die Messergebnisse gemittelt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 20 dargestellt. In der Positivkontrolle mit PMA zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg der LT α -Konzentration im ZKÜ, während es in der Negativkontrolle mit DMSO über den gesamten Stimulationszeitraum zu keinem relevanten Anstieg kam. In den Experimentalbedingungen zeigte sich ein

kontinuierlicher Anstieg in allen Bedingungen in den ersten 6 h. Nach 12 h übersteigt die LT α -Konzentration unter Inhibition mit GI oder Marimastat die unter Inhibition mit PMA und GW. Im Zeitraum von 12 – 24 h kommt es unter GI und Marimastat zu keinem weiteren Konzentrationsanstieg, während die LT α -Konzentration unter PMA und GW weiter ansteigt.

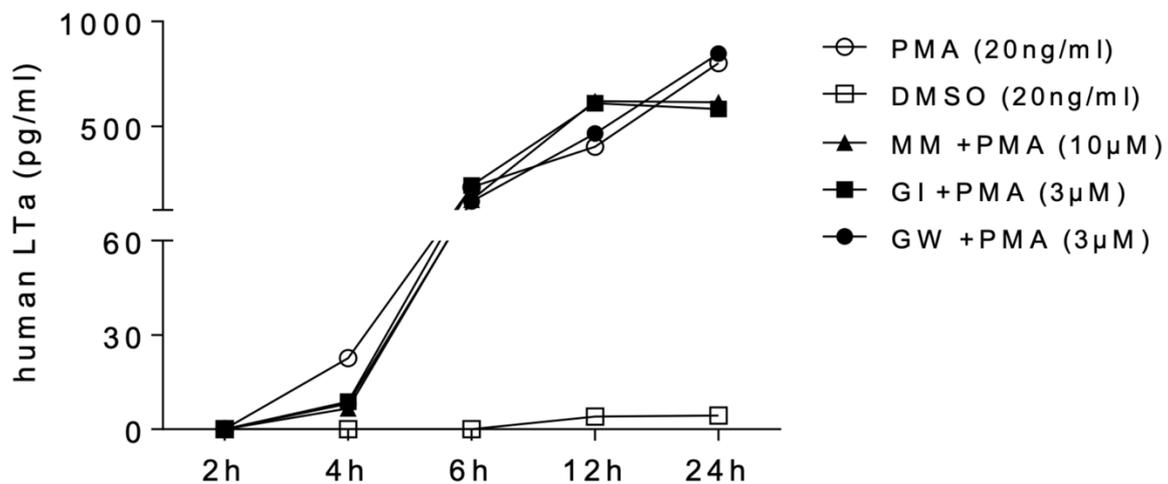


Abb. 20: Der größte relative Unterschied in der LT α -Konzentration zwischen Stimulations- und Inhibitionsbedingungen besteht 4 h nach Beginn der Stimulation bzw. Inhibition. $1 \cdot 10^6$ Jurkat-T-Zellen wurden mit Marimastat (10 μ M), GI (3 μ M) oder GW (3 μ M) stimuliert. Als Kontrollen wurden PMA (20 ng/ml) und DMSO (20 ng/ml) verwendet. Jede Inhibitionsbedingung (Marimastat, GI, GW) wurde mit der gleichen Menge PMA versetzt. Auf der Abszisse ist die Dauer der Stimulation aufgetragen, auf der Ordinate die gemessene LT α -Konzentration. Es wurde eine diskontinuierliche Darstellung gewählt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

4.3.4 Die Erhöhung der Konzentration der ADAM-Inhibitoren beeinflusst die LT α -Sekretion maßgeblich

Nachdem in dem vorangegangenen Experiment relevante Zeitraum der Inhibition auf einen Zeitraum von 4 - 6 h eingegrenzt wurde, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, inwieweit die Konzentration der Inhibitoren die LT α -Sekretion beeinflusst.

Dazu wurde die Konzentration der Inhibitoren erhöht. Die Konzentration von Marimastat wurde von 10 μ M auf 30 μ M erhöht, die Konzentration von GI und GW jeweils von 3 μ M auf 10 μ M. Die Konzentrationen von DMSO und PMA blieben

unverändert bei 20 ng/ml. Zudem wurde die Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ pro Well auf $0,5 \cdot 10^6$ Zellen reduziert.

Darüber hinaus wurde der Versuchsablauf aus Experiment 4.3.3 übernommen, wobei die Analyse des ZKÜ beruhend aus den Ergebnissen der in 4.3.3 geschilderten Versuche 4 h, nach Zugabe der Inhibitoren, durchgeführt wurde. Der Versuch wurde insgesamt dreimal wiederholt und die Ergebnisse gemittelt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 21 dargestellt. Es zeigte sich nach 4 h keinerlei $LT\alpha$ im ZKÜ, wenn gleichzeitig mit GW inhibiert wurde. Auch die Zugabe von GI führte zu einem deutlichen Rückgang der $LT\alpha$ -Konzentration im Vergleich zur Kontrollbedingung mit PMA-Stimulation.

Wie Abb. 22 zeigt, führt eine reine Inhibition von ADAM10 (GI) zwar zu einem deutlich stärkeren Rückgang der $LT\alpha$ -Sekretion als eine Hemmung von ADAM10 und ADAM17 (GW), jedoch kommt die Sekretion erst unter Hemmung beider Metalloproteinasen völlig zum Erliegen.

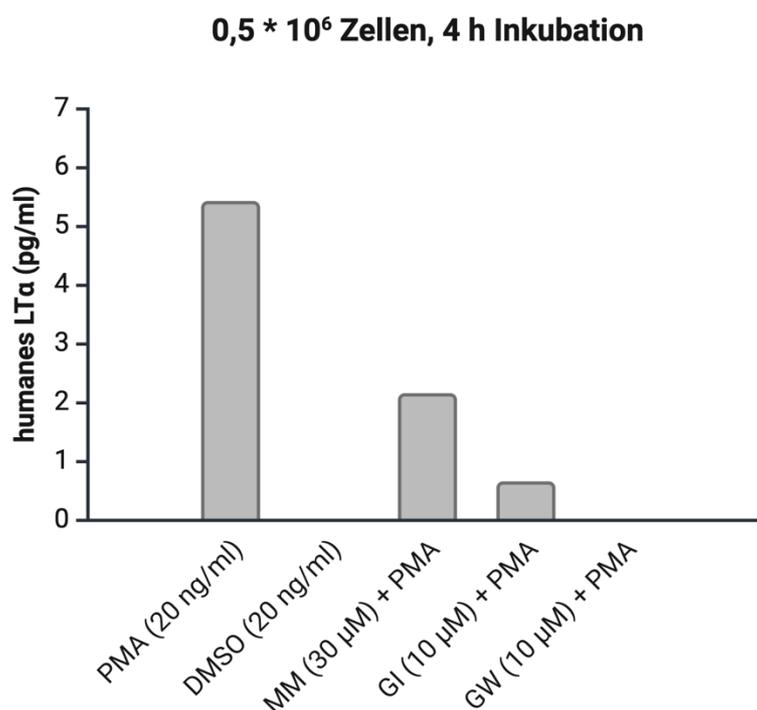


Abb. 21: Die Inhibition von ADAM10 und ADAM17 bewirkt einen deutlichen Rückgang der $LT\alpha$ -Sekretion. Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der Probenentnahme aufgetragen, der hier 4 Stunden entspricht. Auf der Ordinate ist die gemessene $LT\alpha$ -Konzentration in pg/ml aufgetragen. $0,5 \cdot 10^6$ Jurkat-T-Zellen wurden mit Marimastat (30 μ M), GI (10 μ M) oder GW (10 μ M) behandelt. Als Kontrolle wurden PMA (20 ng/ml) und DMSO (20 ng/ml) verwendet. Zusätzlich wurde jede Inhibitionsbedingung (Marimastat, GI, GW) mit der gleichen Menge PMA versetzt und mittels hLTA-ELISA die $LT\alpha$ -

Konzentration gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Abb. 22 zeigt die Daten des 4 h Zeitpunktes aus Abb. 21 mit angepasster Skala und als Balkendiagramm zur besseren Lesbarkeit. Vergleicht man die Ergebnisse der Experimente in den Abbildungen 20 (bzw. 22) und 21 zum 4 h Zeitpunkt, zeigt sich, dass die in Abb. 22 beobachteten Unterschiede in der $LT\alpha$ -Sekretion zwischen den verschiedenen Inhibitionsbedingungen erst unter Erhöhung der Konzentration der Inhibitorkonzentration sichtbar werden. Dies wirft die Frage auf, ob durch eine weitere Erhöhung der Konzentration ein vollständiges Erliegen der $LT\alpha$ -Sekretion erreicht werden kann.

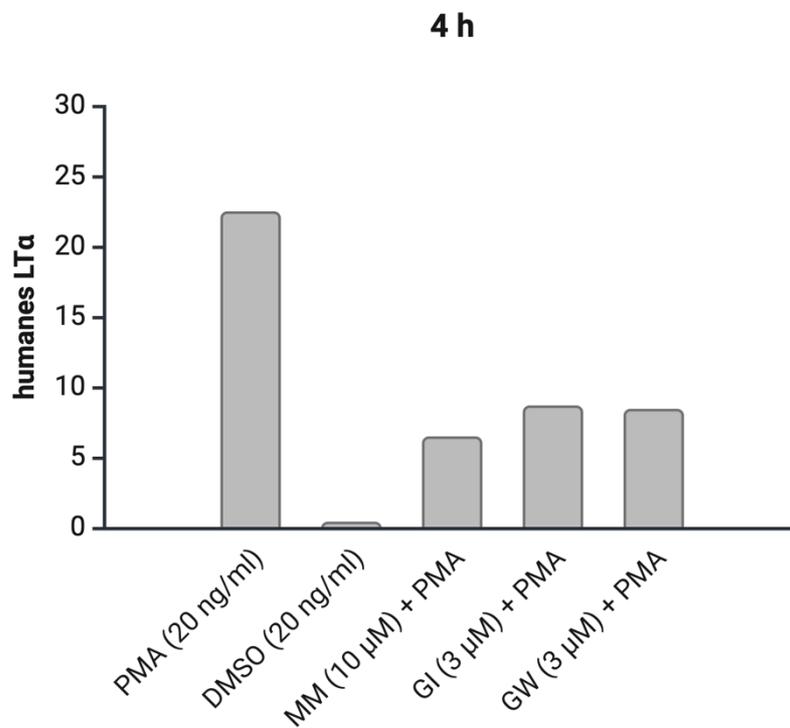


Abb. 22: Isolierte Darstellung des 4 h Zeitpunktes aus Abb. 20. Auf der Abszisse ist die zeitliche Dauer zwischen Zugabe der Inhibitoren und Entnahme der ZKÜ dargestellt (4h). Die Ordinate gibt die mittels h $LT\alpha$ -ELISA gemessene $LT\alpha$ -Konzentration in pg/ml an. In den Experimentalbedingungen wurden GI und GW in mit einer Konzentration von je 3 μ M und Marimastat mit 10 μ M eingesetzt, PMA und DMSO wurden als Kontrollen in einer Konzentration von 20 ng/ml verwendet.

4.3.5 Eine hochkonzentrierte Inhibition von Metalloproteinasen bewirkt ein Erliegen der $LT\alpha$ -Sekretion

In den vorangegangenen Experimenten zeigte sich, dass eine geringe Inhibitorkonzentration zu einem Absinken der $LT\alpha$ -Konzentration führt, ohne dass sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Inhibitoren zeigten (vgl. Abb. 20). Wurde

die Konzentration erhöht, kam es insbesondere unter ADAM10-Inhibition zu einem deutlichen Absinken der $LT\alpha$ -Konzentration im Vergleich zur kombinierten ADAM-10- und ADAM17-Inhibition sowie zur unspezifischen Breitbandinhibition verschiedener Metalloproteinasen durch Marimastat (vgl. Abb 22). Somit stellt sich die Frage, ob durch eine ausreichend hohe Konzentration an Inhibitoren ein vollständiges Erliegen der $LT\alpha$ -Sekretion erzielt werden kann.

Um diese Frage zu untersuchen wurde der gleiche Versuchsaufbau wie in Abschnitt 4.3.3 verwendet. Die eingesetzte Zellzahl pro Schale betrug $0,5 \cdot 10^6$ Zellen. Nach der initialen Gabe der Inhibitoren wurde alle zwei Stunden die gleiche Konzentration der Inhibitoren erneut zugegeben, eine erneute Zugabe von PMA erfolgte jedoch nach der Initialgabe nicht. Der Beobachtungszeitraum wurde auf 6 h festgelegt, damit Inhibitorkonzentrationen erreicht werden, die sich nennenswert von den Konzentrationen in den vorangegangenen Experimenten unterscheiden. Nach Ablauf der sechsständigen Inkubation wurden die ZKÜ abzentrifugiert und mittels h $LT\alpha$ -ELISA analysiert.

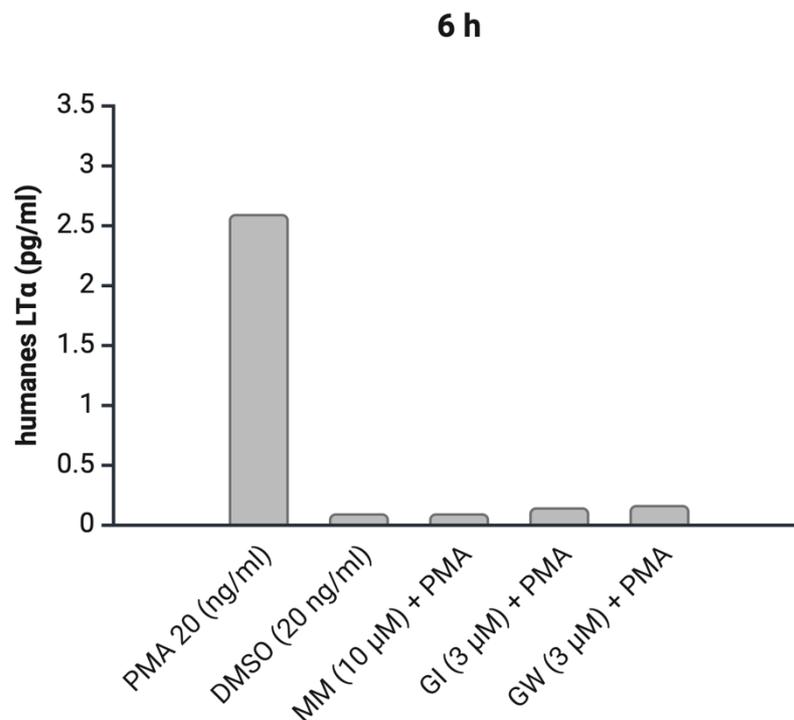


Abb. 23: Hochdosierte Metalloproteinase-Inhibition bewirkt ein Erliegen der $LT\alpha$ -Sekretion. Auf der Abszisse ist die zeitliche Dauer zwischen Beginn der ersten Inhibitorengabe und der Entnahme der ZKÜ aufgetragen (6 Stunden). Die Ordinate zeigt die h $LT\alpha$ -Konzentration. In den Experimentalbedingungen wurden GI und GW in mit einer Konzentration von je 3 μ M und Marimastat mit 10 μ M

eingesetzt, PMA und DMSO wurden als Kontrollen in einer Konzentration von 20 ng/ml verwendet. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 2 und 4 Stunden, somit liegt die Gesamtkonzentration der jeweiligen Reagenzien (PMA, DMSO, MM, GI, GW) bei der dreifachen Konzentration. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

Wie Abb. 23 zeigt, konnte in keiner der Inhibitionsbedingungen $LT\alpha$ nachgewiesen werden, während sich in der Kontrollbedingung mit PMA $LT\alpha$ nachweisen ließ.

5. Diskussion

In unveröffentlichten Vorversuchen zeigte sich ein Einfluss der Aktivität von iRhom2 auf die Sekretion von LT α . Die wesentliche Funktion von iRhom2 liegt in der Reifung und Aktivitätsmodulation von ADAM17 (Luo *et al.*, 2017). Da LT α über keine Transmembrandomäne verfügt (Boehmer, 1997, Browning *et al.*, 1993) und somit keinem ADAM17-abhängigem *Shedding* unterliegen kann, erscheint ein direkter Zusammenhang zwischen iRhom2 und LT α unwahrscheinlich. Eine wahrscheinlichere Ursache für diesen Zusammenhang ist somit vermutlich ein indirekter Zusammenhang zwischen beiden Proteinen.

Als erster Schritt zur Aufklärung dieses Zusammenhangs wurde daher in dieser Arbeit die Sekretion von LT α und LT β eingehend untersucht. Es gelang die Herstellung stabiler Zelllinien, die beide Zytokine synthetisieren. Zudem wurde ein *Shedding-Assay* entwickelt, der den Ausgangspunkt für weitergehende Untersuchungen der Sekretion von LT α darstellt. Außerdem gelang die Klonierung von Deletionsmutanten von LT β , deren *Stalk*-Region modifiziert wurde. Da zur Bildung von LT β -Heterotrimeren LT α -Monomere notwendig sind (Borelli & Irla, 2021), ist zur Aufklärung der Mechanismen der LT α -Sekretion eine Aufklärung des genauen *Shedding*-Mechanismus von LT β notwendig. Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Deletionsmutanten bilden hierfür die Grundlage.

5.1 Tandem-Expression von LT α und LT β

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Erzeugung von stabilen Zellen, die sowohl LT α als auch LT β bilden. Hierzu wurde ein 2A-Peptid genutzt, das die für die beiden Zytokine kodierenden Sequenzen voneinander trennt und so zur Synthese von zwei separaten Proteinen führte (Liu *et al.*, 2017). Es konnte dabei in Zelllysaten und Zellkulturüberständen murines LT α und LT β detektiert werden, was zeigt, dass die Zytokine nicht nur im endoplasmatischen Retikulum der Zellen synthetisiert werden, sondern auch von den Zellen sezerniert werden.

Da in dieser Arbeit sowie in unpublizierten Daten von K. Vogel und P. Lang eine Reduktion der LT α -Sekretion durch einen Knock out von iRhom2 bzw. eine Inhibition von ADAM17 gezeigt werden konnte, ist eine Mediation dieses Effektes über LT β denkbar. Dies gilt insbesondere, da physiologisch alle Zellen, die die LT α bilden, auch

LT β bilden (Ware *et al.*, 1992); ausgenommen hiervon sind maligne oder *in vitro* erzeugte Zelllinien.

In der Literatur wurde beschrieben, dass lösliches LT β (LT $\alpha_1\beta_2$) im Zellkulturüberstand nur nachweisbar ist, wenn es als Heterotrimer vorliegt (Browning *et al.*, 1995); somit ist es denkbar, dass das *Shedding* durch ADAM17 nur an LT $\alpha_1\beta_2$ -Heterotrimeren erfolgt. Da es bislang jedoch keine näheren Untersuchungen zu dem genauen Ablauf des *Sheddings* von LT β gibt, ist zur Untersuchung dieser Hypothese weitere Forschung notwendig.

Die Beobachtung von Browning und Kollegen (1995) ist kongruent zu den Ergebnissen der Testexpression des Plasmids pcDNA3.1-mLTB-myc (vgl. Abb. 13). In Western Blots von Zellen, die mit diesem Plasmid transfiziert wurden, ließ sich in Zelllysaten zwar LT β nachweisen, nicht jedoch in den Zellkulturüberständen. Bei einer Co-Expression von LT α hingegen gelang der Nachweis von LT β auch im Überstand (vgl. Abb. 18). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen ist, dass LT β -Monomere (LT β_1) im Zytosol exprimiert wurden, sich jedoch aufgrund des fehlenden LT α nicht zu Heterotrimeren zusammenlagern konnten und somit nicht *geshededet* wurden.

Tumanov und Kollegen konnten 2009 zeigen, dass LT β eine entscheidende Rolle für das Überleben nach partieller Hepatektomie spielt. In dieser Studie wird jedoch nicht das *Shedding* von LT β berücksichtigt, dieses wurde erst ein Jahr später von Young und Kollegen erstmals beschrieben. Auch in Folgestudien (z.B. Sorg *et al.*, 2016) wurde bei der Analyse der LT β -Expression nicht zwischen membrangebundenem und löslichem LT β unterschieden. Somit ist derzeit unklar, ob lösliches oder membrangebundenes oder beide Formen für die Leberregeneration entscheidend sind.

Sollte die oben ausgeführte und derzeit unbestätigte Hypothese, dass ADAM17 nur heterotrimeres LT $\alpha_1\beta_2$ *sheddet*, zutreffen, ließe sich hierdurch der in 1.3.4 beschriebene Effekt erklären: in der Literatur ist beschrieben, dass eine partielle Hepatektomie unter physiologischen Bedingungen einen erhöhten Bedarf an löslichem LT β bewirkt, wodurch es zu einem Anstieg der mRNA kommt, die für LT α - und LT β -Monomere kodiert (Sorg *et al.*, 2016). Es lagern sich die Monomere verstärkt zu LT β zusammen, welches wiederum durch ADAM17 in seine lösliche Form überführt wird.

In diesem Rahmen ist denkbar, dass zugleich die starke Expression von $LT\alpha$ -Monomeren, gewissermaßen als Nebenprodukt, auch vermehrt $LT\alpha$ sezerniert wird.

Besteht nun ein *iRhom2-Knock-out*, erfolgt kein *Shedding* des membrangebundenen $LT\beta$. Ein putativer Feedback-Mechanismus, der bei hinreichender Sekretion von $LT\beta$ zu einer verminderten Expression von $LT\alpha$ - und $LT\beta$ -Monomeren führen würde, würde also aufgrund des Mangels an löslichem $LT\beta$ nicht aktiviert. Es käme daher zu einer anhaltend hohen Expression beider Monomere, die sich aufgrund des hohen Angebots an $LT\beta$ -Monomeren bevorzugt zu $LT\beta$ -Heterotrimeren zusammenlagern würden. Dem zugrundeliegend käme es zu einer verminderten Bildung von $LT\alpha$ -Homotrimeren, was erklären würde, warum im Serum der *Knock-out*-Mäuse nur sehr geringe Mengen an $LT\alpha$ nachweisbar waren. Auch wenn die Bildung von $LT\beta$ -Heterotrimeren deutlich eher präferiert ist als die von $LT\alpha$ -Homotrimeren, würde über die Zeit immer mehr $LT\alpha$ akkumulieren. Eine schematische Darstellung dieses hypothetischen Ablaufs ist in Abb. 24 zu finden.

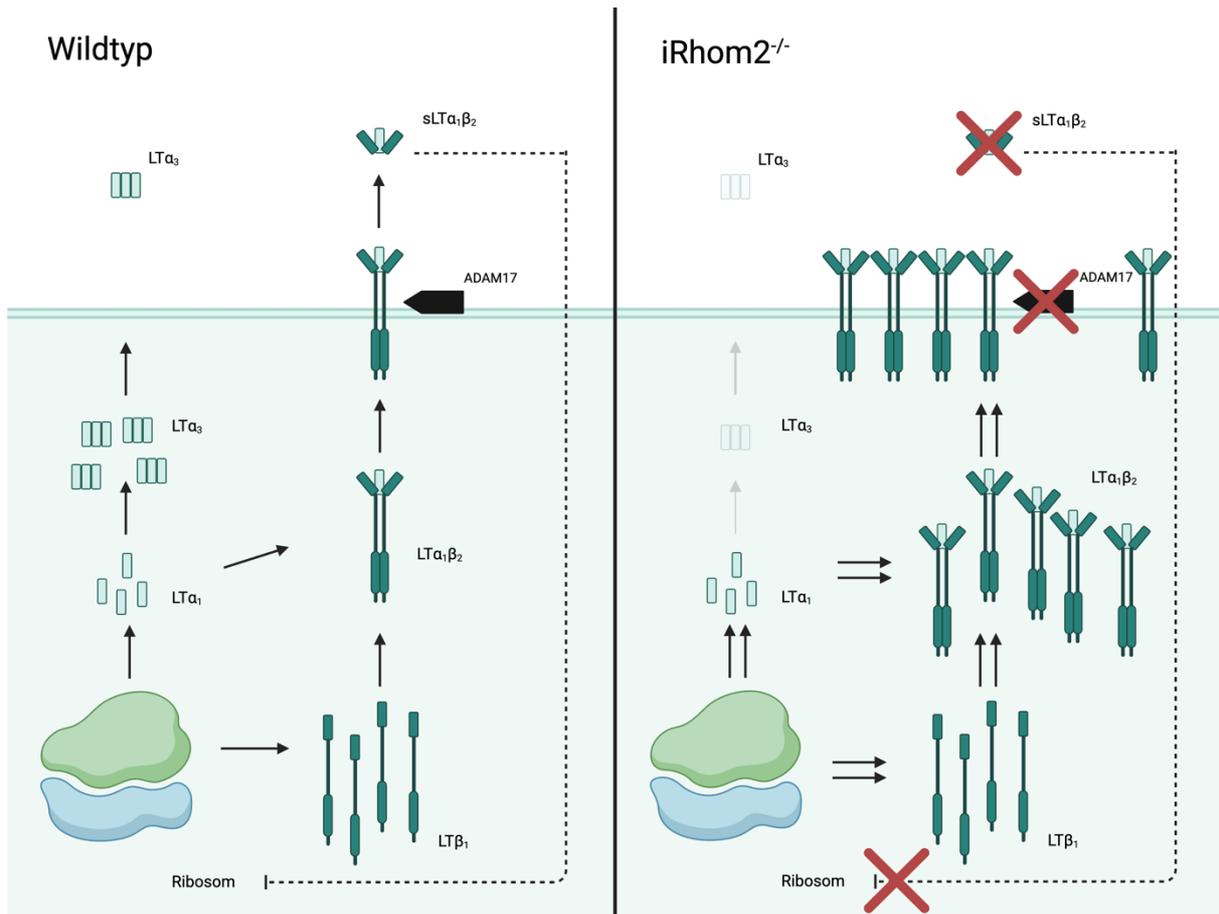


Abb. 24: Möglicher Einfluss eines iRhom2-Knock-outs auf die Expressierung von LTα und löslichem LTβ. Die linke Hälfte der Abbildung stellt die physiologische LTα-/ LTβ-Ausschüttung nach PHx dar. In den Ribosomen werden die Gene für LTα- (hellgrün) und LTβ-Monomere (dunkelgrün) transkribiert. Noch in unmittelbarer Nähe zu den Ribosomen lagern sich die Ribosomen zu LTα₃ oder LTα₁β₂ zusammen und werden dann an die Zellmembran transportiert, wo LTα₃ aufgrund seiner fehlenden TMD sekretiert wird, während LTα₁β₂ durch seine beiden TMD an die Zellmembran gebunden ist. Durch ADAM17 wird LTα₁β₂ von der Membran abgespalten und in seine lösliche Form überführt. Es ist denkbar, dass es einen Feedback-Mechanismus gibt, über den eine hohe Konzentration an löslichem LTα₁β₂ zu einer verminderten Transkription der kodierenden Gene führt (gestrichelte Linie), hierzu existieren derzeit jedoch keine Daten. Die rechte Hälfte der Abbildung zeigt den möglichen Einfluss eines iRhom2-Knock-outs auf diese Signaltransduktion. Ohne iRhom2 ist keine Reifung von ADAM17 möglich, somit kann membrangebundenes LTα₁β₂ nicht in die lösliche Form überführt werden. Existiert der postulierte Feedback-Loop, würde das ausbleibende *Shedding* zu einer anhaltend hohen Expressierung beider LT-Monomere führen. In Gegenwart einer hohen Konzentration von LTβ-Monomeren ist es denkbar, dass die LTα-Monomere bevorzugt an diese binden. Dies könnte einerseits zu hohen Konzentrationen an LTα₁β₂, andererseits zu geringen Mengen an LTα₃ führen.

Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass nach partieller Hepatektomie ein stärkerer Anstieg der Expression der Gene, die für LTβ-Monomere kodierenden

beschrieben wurde als der Gene, die für $LT\alpha$ -Monomere kodieren (Sorg *et al.*, 2016); die Expression von $LT\beta$ -Monomeren wird also stärker hochreguliert als die von $LT\alpha$ -Monomeren. Es ist anzunehmen, dass es zu einer Veränderung des Mengenverhältnisses zwischen homotrimerem $LT\alpha$ und heterotrimerem $LT\beta$ kommt, da sich das Mengenverhältnis der zugrundeliegenden Monomere ändert, was mit dem in Abb. 24 postulierten Mechanismus vereinbar wäre.

Der hier postulierte Feedback-Mechanismus, über den hohe Konzentrationen von löslichem $LT\beta$ zu einer verminderten Expressierung führen, erscheint mit Blick auf das eng verwandte $TNF\alpha$, das ebenfalls in membrangebundener und löslicher Form vorliegen kann, nicht unwahrscheinlich. Lösliches $TNF\alpha$ führt über einen Feedback-*Loop* via dem AP- α 2-Transkriptionsfaktor zu einer *Down-Regulation* der ADAM17-Aktivität, was zu einem vermindertem *Shedding* von $TNF\alpha$ führt (Ge & Vujanovic, 2017). Membrangebundenes $TNF\alpha$ wiederum führt über zahlreiche komplexe Regulationsmechanismen zu einer verminderten Expressierung von $TNF\alpha$ (Varfolomeev & Vucic, 2018).

Letztlich handelt es sich hierbei jedoch um eine bislang nicht bewiesene Hypothese, zu deren Überprüfung weiterführende Experimente notwendig sind. Grundlage weiterer Forschung könnte eine Wiederholung der *Shedding*-Experimente dieser Arbeit sein, wobei nicht nur die $LT\alpha$ -Konzentration in Zellkulturüberständen, sondern auch in Lysaten und zusätzlich die entsprechenden Konzentrationen von $LT\beta$ gemessen werden sollten. Zudem ist es denkbar, dass in dem in Abb. 20 dargestellten Experiment die eingesetzten Konzentrationen der Inhibitoren nicht ausreichend waren. Entsprechend könnte dieser Versuch wiederholt werden mit den in 4.3.4 verwendeten Inhibitorkonzentrationen.

5.2 *Shedding*-Analyse von $LT\beta$

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Klonierung von drei unterschiedlichen Deletionsvarianten von murinem $LT\beta$, die sowohl mittels Sequenzierung als auch durch den erfolgreichen Nachweis von $LT\beta$ in den Lysaten transfizierter Zellen nachgewiesen werden konnte.

Strukturell besteht $LT\beta$ aus einer zytosolischen Domäne, einer Transmembrandomäne, einer *Stalk*-Region sowie einer extrazellulären Domäne (Eck *et al.*, 1992, vgl. Abb. 25). Das *Shedding* von $LT\beta$ erfolgt durch die Protease ADAM17,

möglicherweise besteht auch eine Interaktion mit ADAM10 (Young *et al.*, 2010). Da die *Shedding Site* von ADAM17 bzw. ADAM10 höchstwahrscheinlich im Bereich der *Stalk*-Region liegt, erfolgten alle drei Mutationen in diesem Bereich.

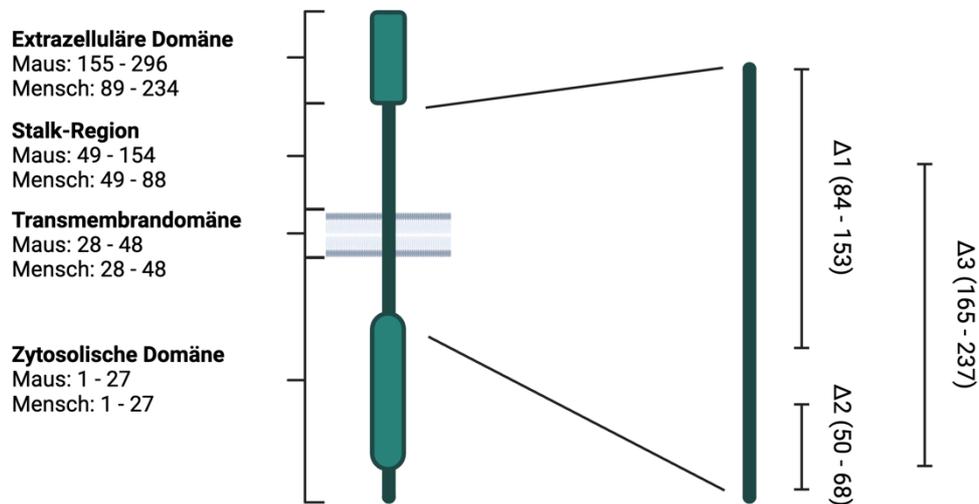


Abb. 25: Struktur von LTβ. LTβ lässt sich strukturell in eine zytoplasmische Domäne, eine Transmembrandomäne, eine Stalk-Region und eine extrazelluläre Domäne unterteilen. Die Deletionen erfolgten in der *Stalk*-Region, da hier die *Shedding Site* zu erwarten ist. Zusätzlich sind die Aminosäurepositionen der jeweiligen Domänen bei Maus und Mensch angegeben. Die rechte Hälfte der Abbildung stellt schematisch die Lokalisation der einzelnen Deletionen sowie deren Aminosäureposition dar. Die vollständige Aminosäuresequenz des Proteins mit Darstellung der Deletionen ist in Abb. 27 zu finden.

Obwohl die genauen Umstände, die eine *Shedding Site* für ADAM10 oder ADAM17 definieren, derzeit noch unklar sind, sind in der Literatur verschiedene Kriterien beschrieben, die erfüllt sein müssen, damit die Proteasen binden und *Shedding* induzieren können. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass 40% der Substrate von ADAM10 und ADAM17 ein Leucin unmittelbar angrenzend an die *Shedding Site* tragen (Tucher *et al.*, 2014). Als Grundlage dieser Erkenntnisse wurden die drei zu deletierenden Sequenzen im *Stalk* von LTβ ausgewählt.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in Zellen, die mit den Plasmiden der Deletionsmutanten transfiziert wurden, LTβ in Lysaten nachweisbar war (vgl. Abb. 18). Dies zeigt, dass trotz der Deletion in allen Zellen LTβ exprimiert wurde. Zusätzlich konnte der Erfolg der Deletion mittels Sequenzierung nachgewiesen werden.

Diese Plasmide können künftig zur weiteren Untersuchung der *Shedding*-Mechanismen von LTβ eingesetzt werden. So kann durch eine Bestimmung der

Shedding-Site dazu beitragen, die genauen Mechanismen des ADAM-*Sheddings* weiter aufzuklären. Interessanter für die hier diskutierten Themen ist jedoch die Idee, zunächst die *Shedding-Site* zu identifizieren und diese dann in einem zweiten Schritt zu entfernen. Hierdurch gelänge die Synthese einer LT β -Variante, die nicht *geshededet* werden kann. Mit einer solchen Variante könnten etwa die in 5.1 beschriebenen Versuche leichter durchgeführt werden, da zur Unterbindung des *Sheddings* hier kein *iRhom2-Knock-out* mehr notwendig ist. Außerdem würde dies die Möglichkeit bieten, funktionelle Unterschiede zwischen membrangebundenem und löslichem LT β zu bestimmen.

5.3 Induzierte LT α -Sekretion in Jurkat-T-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Jurkat-T-Zellen mit PMA zu einem signifikanten Anstieg der LT α -Konzentration im Zellkulturüberstand führte. Dieses Ergebnis ist kongruent mit den in der Literatur beschriebenen Befunden: Li und Kollegen konnten 1999 zeigen, dass durch PMA-Stimulation eine erhöhte LT α -Sekretion im Zellkulturüberstand erzielt werden kann, auch wenn die Zunahme dort deutlich geringer ausfiel als in dieser Arbeit. In den Experimenten von Li und Kollegen konnte zudem gezeigt werden, dass die Expression von LT α durch eine Inhibition der p21^{ras}-raf-MEK-ERK-Kaskade deutlich verringert wird, was die komplexe Regulation der LT α -Expression widerspiegelt (Li *et al.*, 1999). Diese Beobachtung und ihre Implikationen für die vorliegende Arbeit werden in Abschnitt 5.4. ausführlich diskutiert.

Weiterhin ist in der Literatur beschrieben, dass eine PMA-Stimulation zu einer erhöhten Synthese von LT β -mRNA führt (Voon *et al.*, 2001). Voon und Kollegen konnten weiterhin zeigen, dass bei PMA-Stimulation der Anstieg der LT β -mRNA und der LT α -mRNA nahezu identisch ist (Voon *et al.*, 2001). Dies spricht für einen gemeinsamen Regulationsmechanismus beider Proteine.

An diesem Punkt stellt sich die Frage, ob diese Hochregulation letztlich der vermehrten Expression von trimerem LT α , LT β oder beider Formen dient. Mit den Ergebnissen von Voon *et al.* (2001) lässt sich diese Frage nicht abschließend beantworten, da lediglich die Veränderungen der mRNA-Konzentrationen berichtet werden, nicht jedoch die absoluten Werte. Zwar lässt sich argumentieren, dass der beobachtete Anstieg der LT β -mRNA eher für eine vermehrte Expression von LT β spricht, da diese

mRNA für die Bildung von LT α -Trimeren nicht notwendig ist, jedoch sind hier weitere Experimente notwendig, um eine fundierte Aussage treffen zu können.

Da die Regulationsmechanismen von LT α und LT β derzeit nur in den Grundzügen verstanden sind, muss es Ziel künftiger Forschung sein, die Zusammenhänge der Expression beider Zytokine näher zu untersuchen. Das im Rahmen dieser Arbeit generierte Plasmid pcDNA3.1-LTB-2A-LTA kann hierbei von Nutzen sein, da es eine Tandem-Expression in äquimolarer Menge ermöglicht. Hier sollten neben den Konzentrationen von LT α und LT β im ZKÜ auch die entsprechenden Konzentrationen in Lysaten und, analog zu Voon *et al.* (2001), die jeweiligen mRNA-Konzentrationen bestimmt werden.

5.4 Einfluss von ADAM10 und ADAM17 auf die LT α -Sekretion

Nachdem ein initialer *Shedding-Assay* keine Effekte einer Inhibition von Metalloproteinasen zeigen konnte, gelang im Rahmen dieser Arbeit in einem adaptiven Prozess die Etablierung eines spezifischen LT α -*Shedding-Assays*. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich ein maximaler Effekt der Metalloproteinase-Hemmung gegenüber der Stimulation mit PMA nach ca. 4 Stunden zeigte, während sich über einen längeren Beobachtungszeitraum keine relevanten Unterschiede aufwiesen (vgl. Abb. 21). Bei einer fokussierten Untersuchung des Zeitraums von 4 bis 6 Stunden nach Beginn der Stimulation bzw. Inhibition konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass unter Hemmung von ADAM10 und ADAM17 durch GW die LT α -Konzentration am geringsten ist, während bei alleiniger Hemmung von ADAM10 durch GI, die LT α -Konzentration tendenziell höher ist (vgl. Abb. 20a und 20b).

Somit weisen diese *in vitro* Experimente darauf hin, dass eine Hemmung von ADAM17 zu verringerter LT α -Sekretion führt, was die in Abschnitt 2 dargestellten *in vivo* Daten stützt. Dies ist kongruent mit der Beobachtung, dass auch Marimastat als Breitbandmetalloproteinaseninhibitor zu einer verminderten LT α -Sekretion führt, wenn auch in geringerem Maße als eine ADAM17-Inhibition. In der Literatur ist beschrieben, dass Marimastat neben ADAM17 andere MMP-8 hemmt (de Meijer *et al.*, 2010), die beide das *Shedding* von LT β induzieren können (Young *et al.*, 2010), was die Beobachtungen unter ADAM17-Hemmung durch GI unterstreicht.

Da LT α jedoch über keine Transmembrandomäne verfügt (Boehmer, 1997), stellt sich die Frage, welcher Mechanismus diesen Zusammenhang vermittelt. Zwar existieren verschiedene Publikationen, die LT α als Substrat von ADAM17 aufführen (erstmalig in

Scheller *et al.*, 2011), diese gehen jedoch nach eingehender Literaturrecherche auf die Studie von Young und Kollegen (2010) zurück, in der von „*lymphotoxin $\alpha\beta$* “ die Rede ist, gemeint ist also das $LT\alpha_1\beta_2$ -Heterotrimer, nicht $LT\alpha_3$.

Ein möglicher Erklärungsansatz ist ein Einfluss der ADAM17-Inhibition bzw. des *iRhom2-Knock-outs* auf eine Signalkaskade, die wiederum eine verringerte $LT\alpha$ -Sekretion bewirkt. Somit wäre der Effekt der ADAM17-Inhibition auf die $LT\alpha$ -Sekretion als indirekt anzusehen. Eine ausführliche Diskussion dieser Hypothese würde bei der Vielzahl an Substraten von ADAM17 (vgl. Scheller *et al.*, 2011) sowie der Komplexität der Substratspezifität in Abhängigkeit von *iRhom2* (Maney *et al.*, 2015) und deren Signalkaskaden über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen. Daher soll im Folgenden beispielhaft an HB-EGF (*heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor*) und dem MAP-Kinase-Weg (*mitogen-activated protein*) erläutert werden, welche Art von Interaktion zwischen ADAM17 und der $LT\alpha$ -Sekretion denkbar ist.

Der MAP-Kinase-Weg ist eine Signalkaskade, die an regulatorisch zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt ist, darunter Proliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung (Zhang & Liu, 2002). Zu den Proteinen, die durch den MAP-Kinase-Weg reguliert werden, zählt auch der Wachstumsfaktor HB-EGF, der unter anderem an Wundheilung und Angiogenese beteiligt ist (Taylor *et al.*, 2014).

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von $LT\alpha$ wesentlich durch den MAP-Kinase-Weg reguliert wird (Li *et al.*, 1999). Am Anfang dieser Signalkaskade kann beispielsweise der EGF-Rezeptor stehen, der wiederum durch HB-EGF aktiviert werden kann (Lee *et al.*, 2016, Rao *et al.*, 2020). Da HB-EGF vor Bindung an den EGF-Rezeptor durch ADAM17 *geshededet* werden muss (Maretzky *et al.*, 2013), könnte eine ADAM17-Inhibition bzw. ein *iRhom2-Knock-out* die Aktivierung des EGF-Rezeptors über HB-EGF deutlich reduzieren, was eine verringerte Aktivierung der Signalkaskade zur Folge hätte. Dies wiederum könnte zu einer reduzierten Expression von $LT\alpha$ führen, die insbesondere dann ins Gewicht fiele, wenn $LT\alpha$ in großen Mengen exprimiert werden muss, so beispielsweise nach einer PHx (Behnke *et al.*, 2018). Eine vereinfachte schematische Darstellung dieses Prozesses ist in Abb. 26 zu finden.

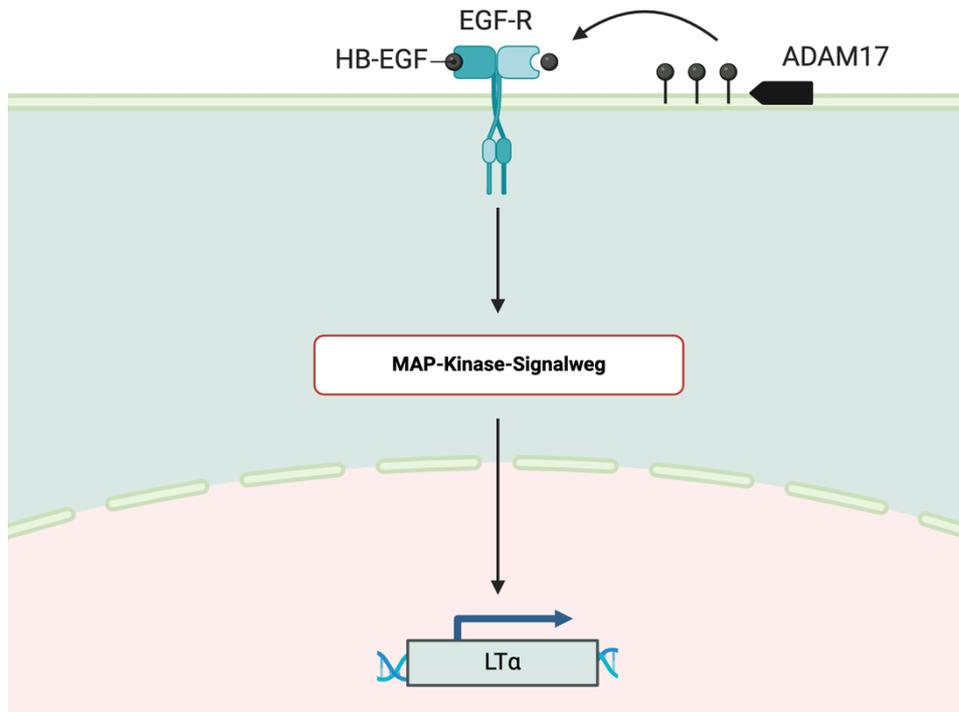


Abb. 26: Beispielhafte Darstellung eines möglichen ADAM17-vermittelten Einflusses des MAP-Kinase-Signalwegs auf die Transkription von $LT\alpha$. ADAM17 katalysiert das *Shedding* von HB-EGF, das in löslicher Form an den EGF-Rezeptor bindet. Dieser aktiviert den MAP-Kinase-Signalweg, was zu einer verstärkten Transkription von $LT\alpha$ führt. Bei einem *iRhom2-Knock-out* oder einer ADAM17-Inhibition kommt es zu einem Ausbleiben dieser verstärkten Aktivierung. Die Darstellung ist stark vereinfacht.

Unklar hingegen ist der Effekt der ADAM10 Hemmung auf die $LT\alpha$ -Sekretion. Einerseits konnte in den durchgeführten Experimenten stets ein Effekt der Hemmung von ADAM10 durch GI beobachtet werden (vgl. Abb. 22 und 23) sowie zusätzlich bei der Hemmung von ADAM17, da GW neben ADAM17 auch ADAM10 hemmt (R&D Systems). Dies ist jedoch nicht ohne weiteres mit der Literatur vereinbar, da die Reifung und Aktivität von ADAM10 nicht von *iRhom2*, sondern von TSPAN8 abhängig ist (Eschenrenner *et al.*, 2019). Somit sollte ein *iRhom2-Knock-out* keinen Einfluss auf die Aktivität dieses Enzyms haben. Zudem gibt es in der Literatur keine Belege dafür, dass ADAM10 am *Shedding* von $LT\alpha$ oder $LT\beta$ beteiligt ist.

Ein Erklärungsansatz hierfür könnte an der geringen Substratspezifität von ADAM10 und ADAM17 sowie deren Beeinflussung durch die Bindung an *iRhom1* oder *iRhom2* liegen. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung an *iRhom1* oder *iRhom2* sogar die Substratspezifität verändern kann (Maretzky *et al.*, 2013). Alternativ wäre denkbar, dass ADAM10 über einen noch unbekanntem Mechanismus am *Shedding* von $LT\beta$ beteiligt ist. Hierfür sprechen neben den Ergebnissen der genannten Experimente

auch die in Abb. 24 dargestellten Daten: bei wiederholter hochkonzentrierter Gabe von Inhibitoren, darunter auch mit GW, ein ADAM10 spezifischer Inhibitor, kam es zu einem völligen Erliegen der $LT\alpha$ -Sekretion. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass ADAM10 eine wesentliche Rolle beim *Shedding* von $LT\alpha$ und $LT\beta$ spielt, wobei der Einfluss auf die $LT\alpha$ -Sekretion wie beschrieben indirekter Natur sein kann.

5.5 Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch PMA eine Steigerung der $LT\alpha$ -Sekretion in Jurkat-T-Zellen bewirkt werden kann. Zudem zeigten sich Hinweise darauf, dass eine Inhibition von ADAM10 und ADAM17 zu einer verringerten $LT\alpha$ -Sekretion führt und dass dieser Effekt vor allem auf eine Hemmung von ADAM17 zurückzuführen ist. Die Interpretation der Ergebnisse wird jedoch dadurch erschwert, dass zur Hemmung von ADAM17 mit GW eine Substanz verwendet wurde, die zeitgleich auch ADAM10 hemmt, sodass die beobachteten Effekte nicht zweifelsfrei auf die ADAM17-Inhibition zurückgeführt werden können.

Um dieses Problem zu lösen, könnte statt GW der Metalloproteinasehemmer TAPI-0 eingesetzt werden, der spezifisch ADAM17 hemmt und nicht mit ADAM10 interagiert (Choi *et al.*, 2012). Hierzu könnte der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte *Shedding-Assay* eingesetzt werden. Darüber hinaus könnte auch eine Aufkonzentrierung der ZKÜ in Betracht gezogen werden, um höhere Konzentrationen von $LT\alpha$ zu erzielen. Wie die Experimente in dieser Arbeit zeigten, konnten in den Versuchen stets nur geringe Konzentrationen an $LT\alpha$ gemessen werden, was insbesondere die Auswertung von geringen Unterschieden zwischen verschiedenen Inhibitionsbedingungen erschwert. Durch Aufdosierung könnte es möglich sein, signifikante Unterschiede verschiedener Bedingungen aufzudecken.

Da sich in dieser Arbeit Hinweise auf eine entscheidende Rolle der Anlagerung der LT -Monomere für die Expressierung von $LT\alpha$ und $LT\beta$ gezeigt haben, sollte es Ziel künftiger Forschung sein, diese Zusammenhänge eingehender zu untersuchen. Hierzu könnten die in dieser Arbeit generierten Plasmide und Zellen genutzt werden, um den Zusammenhang zwischen der mRNA beider Monomere, mit den in Lysaten und ZKÜ nachweisbaren Trimeren zu vergleichen und somit Rückschlüsse auf die Mechanismen zu ziehen, durch die die Monomere aneinanderbinden.

Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang auch das *Shedding* von LT β . In dieser Arbeit gelang die erfolgreiche Generierung von Deletionsvarianten von LT β zur Analyse des *Sheddings*. Sollten mithilfe dieser die *Shedding Site* von ADAM17 identifiziert werden können, würde dies die gezielte Synthese von ausschließlich membranständigem LT β ermöglichen. Es könnte somit untersucht werden, welche funktionellen Unterschiede zwischen der membranständigen und der löslichen Form von LT β bestünde.

6. Literaturverzeichnis

- Alimzhanov MB, Kuprash DV, Kosco-Vilbois MH, Luz A, Turetskaya RL, Tarakhovsky A, Rajewsky K, Nedospasov SA, Pfeffer K. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Aug 19;94(17):9302-7.
- Al-Salihi MA, Lang PA. iRhom2: An Emerging Adaptor Regulating Immunity and Disease. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 8;21(18):6570.
- Anders RA, Subudhi SK, Wang J, Pfeffer K, Fu YX. Contribution of the lymphotoxin beta receptor to liver regeneration. *J Immunol*. 2005 Jul 15;175(2):1295-300.
- Ansel KM, Cyster JG. Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development. *Curr Opin Immunol*. 2001 Apr;13(2):172-9.
- Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci*. 2001 Nov;4(11):1116-22.
- Bandsma RH, van Goor H, Yourshaw M, Horlings RK, Jonkman MF, Schölvinck EH, Karrenbeld A, Scheenstra R, Kömhoff M, Rump P, Koopman-Keemink Y, Nelson SF, Escher JC, Cutz E, Martín MG. Loss of ADAM17 is associated with severe multiorgan dysfunction. *Hum Pathol*. 2015 Jun;46(6):923-8.
- Banks TA, Rouse BT, Kerley MK, Blair PJ, Godfrey VL, Kuklin NA, Bouley DM, Thomas J, Kanangat S, Mucenski ML. Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J Immunol*. 1995 Aug 15;155(4):1685-93.
- Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*. 1993 May 7;73(3):431-45.
- Behnke, K., Sorg, U.R., Herebian, D. et al. The role of the lymphotoxin-β receptor (LTβR) in hepatocyte-mediated liver regeneration. *Eur J Med Res* 19 (Suppl 1), S3 (2014).
- Behnke K, Zhuang Y, Xu HC, Sundaram B, Reich M, Shinde PV, Huang J, Modares NF, Tumanov AV, Polz R, Scheller J, Ware CF, Pfeffer K, Keitel V, Häussinger D, Pandya AA, Lang KS, Lang PA. B Cell-Mediated Maintenance of Cluster of Differentiation 169-Positive Cells Is Critical for Liver Regeneration. *Hepatology*. 2018 Dec;68(6):2348-2361.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 1997 Feb 20;385(6618):729-33.

- Blanchot-Jossic F, Jarry A, Masson D, Bach-Ngohou K, Paineau J, Denis MG, Labois CL, Mosnier JF. Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. *J Pathol.* 2005 Oct;207(2):156-63.
- Blaydon DC, Biancheri P, Di WL, Plagnol V, Cabral RM, Brooke MA, van Heel DA, Ruschendorf F, Toynbee M, Walne A, O'Toole EA, Martin JE, Lindley K, Vulliamy T, Abrams DJ, MacDonald TT, Harper JI, Kelsell DP. Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. *N Engl J Med.* 2011 Oct 20;365(16):1502-8.
- Böcker W, Docheva D, Prall WC, Egea V, Pappou E, Rossmann O, Popov C, Mutschler W, Ries C, Schieker M. IKK-2 is required for TNF-alpha-induced invasion and proliferation of human mesenchymal stem cells. *J Mol Med (Berl).* 2008 Oct;86(10):1183-92.
- Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci.* 2002 Jan;27(1):19-26.
- von Boehmer H. Lymphotoxins: from cytotoxicity to lymphoid organogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Aug 19;94(17):8926-7.
- Borelli A, Irla M. Lymphotoxin: from the physiology to the regeneration of the thymic function. *Cell Death Differ.* 2021 Aug;28(8):2305-2314.
- Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Feb;111(2 Suppl):S460-75.
- Browning JL, Ngam-ek A, Lawton P, DeMarinis J, Tizard R, Chow EP, Hession C, O'Brine-Greco B, Foley SF, Ware CF. Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell.* 1993 Mar 26;72(6):847-56.
- Browning JL, Douglas I, Ngam-ek A, Bourdon PR, Ehrenfels BN, Miatkowski K, Zafari M, Yampaglia AM, Lawton P, Meier W, et al. Characterization of surface lymphotoxin forms. Use of specific monoclonal antibodies and soluble receptors. *J Immunol.* 1995 Jan 1;154(1):33-46.
- Browning JL, Sizing ID, Lawton P, Bourdon PR, Rennert PD, Majeau GR, Ambrose CM, Hession C, Miatkowski K, Griffiths DA, Ngam-ek A, Meier W, Benjamin CD, Hochman PS. Characterization of lymphotoxin-alpha beta complexes on the surface of mouse lymphocytes. *J Immunol.* 1997 Oct 1;159(7):3288-98.
- Browning JL, Allaire N, Ngam-Ek A, Notidis E, Hunt J, Perrin S, Fava RA. Lymphotoxin-beta receptor signaling is required for the homeostatic control of HEV differentiation and function. *Immunity.* 2005 Nov;23(5):539-50.
- Calvete, J. J., C. Marcinkiewicz, D. Monleon, V. Esteve, B. Celda, P. Juarez and L. Sanz (2005). "Snake venom disintegrins: evolution of structure and function." *Toxicon* 45(8): 1063-1074

- Cavadas M, Oikonomidi I, Gaspar CJ, Burbridge E, Badenes M, Félix I, Bolado A, Hu T, Bileck A, Gerner C, Domingos PM, von Kriegsheim A, Adrain C. Phosphorylation of iRhom2 Controls Stimulated Proteolytic Shedding by the Metalloprotease ADAM17/TACE. *Cell Rep.* 2017 Oct 17;21(3):745-757.
- Chalaris A, Adam N, Sina C, Rosenstiel P, Lehmann-Koch J, Schirmacher P, Hartmann D, Cichy J, Gavrilova O, Schreiber S, Jostock T, Matthews V, Häsler R, Becker C, Neurath MF, Reiss K, Saftig P, Scheller J, Rose-John S. Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med.* 2010 Aug 2;207(8):1617-24.
- Chang YH, Hsieh SL, Chen MC, Lin WW. Lymphotoxin beta receptor induces interleukin 8 gene expression via NF-kappaB and AP-1 activation. *Exp Cell Res.* 2002 Aug 15;278(2):166-74.
- Chenxu G, Minxuan X, Yuting Q, Tingting G, Jinxiao L, Mingxing W, Sujun W, Yongjie M, Deshuai L, Qiang L, Linfeng H, Jun T. iRhom2 loss alleviates renal injury in long-term PM2.5-exposed mice by suppression of inflammation and oxidative stress. *Redox Biol.* 2018 Oct;19:147-157.
- Chng J, Wang T, Nian R, Lau A, Hoi KM, Ho SC, Gagnon P, Bi X, Yang Y. Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells. *MAbs.* 2015;7(2):403-12.
- Choi JY, Park HJ, Lee YJ, Byun J, Youn YS, Choi JH, Woo SY, Kang JL. Upregulation of Mer receptor tyrosine kinase signaling attenuated lipopolysaccharide-induced lung inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013 Feb;344(2):447-58. doi: 10.1124/jpet.112.199778. Epub 2012 Nov 29.
- Christova Y, Adrain C, Bambrough P, Ibrahim A, Freeman M. Mammalian iRhoms have distinct physiological functions including an essential role in TACE regulation. *EMBO Rep.* 2013 Oct;14(10):884-90.
- Crowe PD, VanArsdale TL, Walter BN, Ware CF, Hession C, Ehrenfels B, Browning JL, Din WS, Goodwin RG, Smith CA. A lymphotoxin-beta-specific receptor. *Science.* 1994 Apr 29;264(5159):707-10.
- De Togni P, Goellner J, Ruddle NH, Streeter PR, Fick A, Mariathasan S, Smith SC, Carlson R, Shornick LP, Strauss-Schoenberger J, et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science.* 1994 Apr 29;264(5159):703-7.
- Ding X, Yang LY, Huang GW, Wang W, Lu WQ. ADAM17 mRNA expression and pathological features of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2004 Sep 15;10(18):2735-9.
- Dopp JM, Sarafian TA, Spinella FM, Kahn MA, Shau H, de Vellis J. Expression of the p75 TNF receptor is linked to TNF-induced NFkappaB translocation and oxyradical neutralization in glial cells. *Neurochem Res.* 2002 Nov;27(11):1535-42.

- Dostert C, Grusdat M, Letellier E, Brenner D. The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. *Physiol Rev.* 2019 Jan 1;99(1):115-160.
- Düsterhöft, S., K. Hobel, M. Oldefest, J. Lokau, G. H. Waetzig, A. Chalaris, C. Garbers, J. Scheller, S. Rose-John, I. Lorenzen and J. Grötzinger (2014). "A disintegrin and metalloprotease 17 dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor." *J Biol Chem* 289(23): 16336-16348.
- Düsterhöft S, Künzel U, Freeman M. Rhomboid proteases in human disease: Mechanisms and future prospects. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017 Nov;1864(11 Pt B):2200-2209.
- Düsterhöft S, Babendreyer A, Giese AA, Flasshove C, Ludwig A. Status update on iRhom and ADAM17: It's still complicated. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019 Oct;1866(10):1567-1583.
- Eck MJ, Ultsch M, Rinderknecht E, de Vos AM, Sprang SR. The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) at 1.9-Å resolution. *J Biol Chem.* 1992 Feb 5;267(4):2119-22.
- Eschenbrenner E, Jouannet S, Clay D, Chaker J, Boucheix C, Brou C, Tomlinson MG, Charrin S, Rubinstein E. TspanC8 tetraspanins differentially regulate ADAM10 endocytosis and half-life. *Life Sci Alliance.* 2019 Dec 2;3(1):e201900444.
- Faustman D, Davis M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Jun;9(6):482-93.
- Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JP, Kallen KJ, Wollmer A, Grötzinger J, Rose-John S. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol.* 1997 Feb;15(2):142-5.
- Floss DM, Mrotzek S, Klöcker T, Schröder J, Grötzinger J, Rose-John S, Scheller J. Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor. *J Biol Chem.* 2013 Jul 5;288(27):19386-400.
- Force WR, Walter BN, Hession C, Tizard R, Kozak CA, Browning JL, Ware CF. Mouse lymphotoxin-beta receptor. Molecular genetics, ligand binding, and expression. *J Immunol.* 1995 Dec 1;155(11):5280-8.
- Franke, M.: Identifikation des Interleukin-23 Rezeptors und FcγR als neue Substrate der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 und die Rolle des scaffolding Proteins SAP97 in der Proteolyse des Interleukin-6 Rezeptors, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf 2016
- Freeman M. Rhomboids, signalling and cell biology. *Biochem Soc Trans.* 2016 Jun 15;44(3):945-50.

- Fu YX, Chaplin DD. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:399-433.
- Fütterer A, Mink K, Luz A, Kosco-Vilbois MH, Pfeffer K. The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity.* 1998 Jul;9(1):59-70. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80588-9.
- Ge L, Vujanovic NL. Soluble TNF Regulates TACE via AP-2 α Transcription Factor in Mouse Dendritic Cells. *J Immunol.* 2017 Jan 1;198(1):417-427.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977 Jul;36(1):59-74.
- Grell M, Becke FM, Wajant H, Männel DN, Scheurich P. Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur J Immunol.* 1998 Jan;28(1):257-63.
- Grieve AG, Xu H, Künzel U, Bambrough P, Sieber B, Freeman M. Phosphorylation of iRhom2 at the plasma membrane controls mammalian TACE-dependent inflammatory and growth factor signalling. *Elife.* 2017 Apr 22;6:e23968.
- Häussinger, Dieter. *Liver Regeneration*, Berlin, New York: De Gruyter, 2011.
- Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 2005 May;115(1):1-20.
- Hsu H, Solovyev I, Colombero A, Elliott R, Kelley M, Boyle WJ. ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5. *J Biol Chem.* 1997 May 23;272(21):13471-4.
- Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor- α in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation.* 1999 Mar 23;99(11):1492-8.
- Kabashima K, Banks TA, Ansel KM, Lu TT, Ware CF, Cyster JG. Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity.* 2005 Apr;22(4):439-50.
- Ketteler R, Glaser S, Sandra O, Martens UM, Klingmüller U. Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther.* 2002 Apr;9(8):477-87.
- Killock DJ, Ivetić A. The cytoplasmic domains of TNF α -converting enzyme (TACE/ADAM17) and L-selectin are regulated differently by p38 MAPK and PKC to promote ectodomain shedding. *Biochem J.* 2010 May 13;428(2):293-304.

- Koni PA, Sacca R, Lawton P, Browning JL, Ruddle NH, Flavell RA. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity*. 1997 Apr;6(4):491-500.
- Kopp SJ, Storti CS, Muller WJ. Herpes simplex virus-2 glycoprotein interaction with HVEM influences virus-specific recall cellular responses at the mucosa. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:284104.
- Kubo S, Fritz JM, Raquer-McKay HM, Kataria R, Vujkovic-Cvijin I, Al-Shaibi A, Yao Y, Zheng L, Zou J, Waldman AD, Jing X, Farley TK, Park AY, Oler AJ, Charles AK, Makhoulouf M, AbouMoussa EH, Hasnah R, Saraiva LR, Ganesan S, Al-Subaiey AA, Matthews H, Flano E, Lee HH, Freeman AF, Sefer AP, Sayar E, Çakır E, Karakoc-Aydiner E, Baris S, Belkaid Y, Ozen A, Lo B, Lenardo MJ. Congenital iRHOM2 deficiency causes ADAM17 dysfunction and environmentally directed immunodysregulatory disease. *Nat Immunol*. 2022 Jan;23(1):75-85.
- Künzel U, Grieve AG, Meng Y, Sieber B, Cowley SA, Freeman M. FRMD8 promotes inflammatory and growth factor signalling by stabilising the iRhom/ADAM17 sheddase complex. *Elife*. 2018 Jun 13;7:e35012.
- Lemberg MK, Freeman M. Functional and evolutionary implications of enhanced genomic analysis of rhomboid intramembrane proteases. *Genome Res*. 2007 Nov;17(11):1634-46.
- Lee S, Heinrich EL, Lu J, Lee W, Choi AH, Luu C, Chung V, Fakih M, Kim J. Epidermal Growth Factor Receptor Signaling to the Mitogen Activated Protein Kinase Pathway Bypasses Ras in Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas*. 2016 Feb;45(2):286-92.
- Li YQ, Hii CS, Costabile M, Goh D, Der CJ, Ferrante A. Regulation of lymphotoxin production by the p21ras-raf-MEK-ERK cascade in PHA/PMA-stimulated Jurkat cells. *J Immunol*. 1999 Mar 15;162(6):3316-20.
- Li X, Maretzky T, Perez-Aguilar JM, Monette S, Weskamp G, Le Gall S, Beutler B, Weinstein H, Blobel CP. Structural modeling defines transmembrane residues in ADAM17 that are crucial for Rhbdf2-ADAM17-dependent proteolysis. *J Cell Sci*. 2017 Mar 1;130(5):868-878.
- Liu Z, Chen O, Wall JBJ, Zheng M, Zhou Y, Wang L, Vaseghi HR, Qian L, Liu J. Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Sci Rep*. 2017 May 19;7(1):2193.
- Lo JC, Wang Y, Tumanov AV, Bamji M, Yao Z, Reardon CA, Getz GS, Fu YX. Lymphotoxin beta receptor-dependent control of lipid homeostasis. *Science*. 2007 Apr 13;316(5822):285-8.
- Long C, Hosseinkhani MR, Wang Y, Sriramarao P, Walcheck B. ADAM17 activation in circulating neutrophils following bacterial challenge impairs their recruitment. *J Leukoc Biol*. 2012 Sep;92(3):667-72.

- Lu F, Zhao H, Dai Y, Wang Y, Lee CH, Freeman M. Cryo-EM reveals that iRhom2 restrains ADAM17 protease activity to control the release of growth factor and inflammatory signals. *Mol Cell*. 2024 Jun 6;84(11):2152-2165.e5.
- Luo WW, Li S, Li C, Zheng ZQ, Cao P, Tong Z, Lian H, Wang SY, Shu HB, Wang YY. iRhom2 is essential for innate immunity to RNA virus by antagonizing ER- and mitochondria-associated degradation of VISA. *PLoS Pathog*. 2017 Nov 20;13(11):e1006693.
- Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*. (2014) (9. Aufl.). Berlin ; Heidelberg: Springer.
- Maney SK, McIlwain DR, Polz R, Pandyra AA, Sundaram B, Wolff D, Ohishi K, Maretzky T, Brooke MA, Evers A, Vasudevan AA, Aghaeepour N, Scheller J, Münk C, Häussinger D, Mak TW, Nolan GP, Kelsell DP, Blobel CP, Lang KS, Lang PA. Deletions in the cytoplasmic domain of iRhom1 and iRhom2 promote shedding of the TNF receptor by the protease ADAM17. *Sci Signal*. 2015 Nov 3;8(401):ra109.
- Maretzky T, McIlwain DR, Issuree PD, Li X, Malapeira J, Amin S, Lang PA, Mak TW, Blobel CP. iRhom2 controls the substrate selectivity of stimulated ADAM17-dependent ectodomain shedding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 9;110(28):11433-8. doi: 10.1073/pnas.1302553110. Epub 2013 Jun 25. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Aug 24;118(34):e2112652118.
- Martins PN, Theruvath TP, Neuhaus P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int*. 2008 Jan;28(1):3-11.
- McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, Mansfield E, Gadina M, Karenko L, Pettersson T, McCarthy J, Frucht DM, Aringer M, Torosyan Y, Teppo AM, Wilson M, Karaarslan HM, Wan Y, Todd I, Wood G, Schlimgen R, Kumarajeewa TR, Cooper SM, Vella JP, Amos CI, Mulley J, Quane KA, Molloy MG, Ranki A, Powell RJ, Hitman GA, O'Shea JJ, Kastner DL. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell*. 1999 Apr 2;97(1):133-44.
- de Meijer VE, Sverdlov DY, Popov Y, Le HD, Meisel JA, Nosé V, Schuppan D, Puder M. Broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibition curbs inflammation and liver injury but aggravates experimental liver fibrosis in mice. *PLoS One*. 2010 Jun 25;5(6):e11256.
- Nicolaou A, Zhao Z, Northoff BH, Sass K, Herbst A, Kohlmaier A, Chalaris A, Wolfrum C, Weber C, Steffens S, Rose-John S, Teupser D, Holdt LM. Adam17 Deficiency Promotes Atherosclerosis by Enhanced TNFR2 Signaling in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017 Feb;37(2):247-257.
- Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Oct;1(4):a000034.

- Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol.* 2011 Jul 19;12(8):695-708.
- Palacios R, Henson G, Steinmetz M, McKearn JP. Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. *Nature.* 1984 May 10-16;309(5964):126-31.
- Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Waal Malefyt R, Moore KW. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol.* 2002 Jun 1;168(11):5699-708.
- Pasparakis M, Kousteni S, Peschon J, Kollias G. Tumor necrosis factor and the p55TNF receptor are required for optimal development of the marginal sinus and for migration of follicular dendritic cell precursors into splenic follicles. *Cell Immunol.* 2000 Apr 10;201(1):33-41.
- Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology.* 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S54-62.
- Rao L, Giannico D, Leone P, Solimando AG, Maiorano E, Caporusso C, Duda L, Tamma R, Mallamaci R, Susca N, Buonavoglia A, Da Vià MC, Ribatti D, De Re V, Vacca A, Racanelli V. HB-EGF-EGFR Signaling in Bone Marrow Endothelial Cells Mediates Angiogenesis Associated with Multiple Myeloma. *Cancers (Basel).* 2020 Jan 10;12(1):173.
- Reiss K, Bhakdi S. The plasma membrane: Penultimate regulator of ADAM sheddase function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017 Nov;1864(11 Pt B):2082-2087.
- Remouchamps C, Boutaffala L, Ganef C, Dejardin E. Biology and signal transduction pathways of the Lymphotoxin- $\alpha\beta$ /LT β R system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 Oct-Dec;22(5-6):301-10.
- Sacca R, Cuff CA, Lesslauer W, Ruddle NH. Differential activities of secreted lymphotoxin-alpha3 and membrane lymphotoxin-alpha1beta2 in lymphotoxin-induced inflammation: critical role of TNF receptor 1 signaling. *J Immunol.* 1998 Jan 1;160(1):485-91.
- Scheller J, Chalaris A, Garbers C, Rose-John S. ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol.* 2011 Aug;32(8):380-7.
- Schlöndorff J, Becherer JD, Blobel CP. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J.* 2000 Apr 1;347 Pt 1(Pt 1):131-8.
- Schwenk HU, Schneider U. Cell cycle dependency of a T-cell marker on lymphoblasts. *Blut.* 1975 Nov;31(5):299-306.

- Sorg UR, Behnke K, Degrandi D, Reich M, Keitel V, Herebian D, Deenen R, Beyer M, Schultze JL, Köhrer K, Gabbert HE, Mayatepek E, Häussinger D, Pfeffer K. Cooperative role of lymphotoxin β receptor and tumor necrosis factor receptor p55 in murine liver regeneration. *J Hepatol*. 2016 May;64(5):1108-1117.
- Sturtevant MA, Roark M, Bier E. The *Drosophila* rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway. *Genes Dev*. 1993 Jun;7(6):961-73.
- Sudhamsu J, Yin J, Chiang EY, Starovasnik MA, Grogan JL, Hymowitz SG. Dimerization of LT β R by LT α 1 β 2 is necessary and sufficient for signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 3;110(49):19896-901.
- Suthaus J, Tillmann A, Lorenzen I, Bulanova E, Rose-John S, Scheller J. Forced homo- and heterodimerization of all gp130-type receptor complexes leads to constitutive ligand-independent signaling and cytokine-independent growth. *Mol Biol Cell*. 2010 Aug 1;21(15):2797-807.
- Tang B, Li X, Maretzky T, Perez-Aguilar JM, McIlwain D, Xie Y, Zheng Y, Mak TW, Weinstein H, Blobel CP. Substrate-selective protein ectodomain shedding by ADAM17 and iRhom2 depends on their juxtamembrane and transmembrane domains. *FASEB J*. 2020 Apr;34(4):4956-4969.
- Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Oct;5(10):836-47.
- Taylor SR, Markesbery MG, Harding PA. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) and proteolytic processing by a disintegrin and metalloproteinases (ADAM): a regulator of several pathways. *Semin Cell Dev Biol*. 2014 Apr;28:22-30.
- Tucher J, Linke D, Koudelka T, Cassidy L, Tredup C, Wichert R, Pietrzik C, Becker-Pauly C, Tholey A. LC-MS based cleavage site profiling of the proteases ADAM10 and ADAM17 using proteome-derived peptide libraries. *J Proteome Res*. 2014 Apr 4;13(4):2205-14.
- Tumanov AV, Grivennikov SI, Shakhov AN, Rybtsov SA, Koroleva EP, Takeda J, Nedospasov SA, Kuprash DV. Dissecting the role of lymphotoxin in lymphoid organs by conditional targeting. *Immunol Rev*. 2003 Oct;195:106-16.
- Tumanov AV, Koroleva EP, Christiansen PA, Khan MA, Ruddy MJ, Burnette B, Papa S, Franzoso G, Nedospasov SA, Fu YX, Anders RA. T cell-derived lymphotoxin regulates liver regeneration. *Gastroenterology*. 2009 Feb;136(2):694-704.e4.
- Upadhyay V, Fu YX. Lymphotoxin signalling in immune homeostasis and the control of microorganisms. *Nat Rev Immunol*. 2013 Apr;13(4):270-9.
- Vanamee ÉS, Faustman DL. Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling. *Sci Signal*. 2018 Jan 2;11(511):eaao4910.

- Varfolomeev E, Vucic D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine*. 2018 Jan;101:26-32.
- Vidal-Puig A, Unger RH. Special issue on lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Mar;1801(3):207-8.
- Ware CF, Crowe PD, Vanarsdale TL, Andrews JL, Grayson MH, Jerzy R, Smith CA, Goodwin RG. Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells. *J Immunol*. 1991 Dec 15;147(12):4229-38.
- Ware CF. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:787-819. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115719.
- Warren A, Le Couteur DG, Fraser R, Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P. T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*. 2006 Nov;44(5):1182-90.
- Wisniewska M, Goettig P, Maskos K, Belouski E, Winters D, Hecht R, Black R, Bode W. Structural determinants of the ADAM inhibition by TIMP-3: crystal structure of the TACE-N-TIMP-3 complex. *J Mol Biol*. 2008 Sep 19;381(5):1307-19.
- Wong E, Maretzky T, Peleg Y, Blobel CP, Sagi I. The Functional Maturation of A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 9, 10, and 17 Requires Processing at a Newly Identified Proprotein Convertase (PC) Cleavage Site. *J Biol Chem*. 2015 May 8;290(19):12135-46.
- Xu M, Ge C, Qin Y, Lou D, Li Q, Feng J, Wu Y, Hu L, Wang B, Tan J. Functional loss of inactive rhomboid-like protein 2 mitigates obesity by suppressing pro-inflammatory macrophage activation-triggered adipose inflammation. *Mol Metab*. 2020 Apr;34:112-123.
- Yamada Y, Webber EM, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: requirement for type 1 but not type 2 receptor. *Hepatology*. 1998 Oct;28(4):959-70.
- Young J, Yu X, Wolslegel K, Nguyen A, Kung C, Chiang E, Kolumam G, Wei N, Wong WL, DeForge L, Townsend MJ, Grogan JL. Lymphotoxin-alpha-beta heterotrimers are cleaved by metalloproteinases and contribute to synovitis in rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2010 Jul;51(1):78-86.
- Zhang, W., Liu, H. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12, 9–18 (2002).
- Zunke F, Rose-John S. The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017 Nov;1864(11 Pt B):2059-2070.

UniProtKB – P09225 (murines Lymphotoxin alpha) mit HA-Tag

Signalpeptid	1 – 33
Extrazellulärdomäne	34 – 202
HA-Tag	203 – 211

MTLLGRLHLLRVLGTTPPVFLLGLLLALPLGAQGLSGVRFSAARTAHPLPQKHLTHGILKP 60
AAHLVGYPKQNSLLWRASTDRAFLRHGFSLSNNSLLIPTSGLYFVYSQVVFSGESCSPR 120
AIPTPIYLAHEVQLFSSQYPFHVPLLSAQKSVYPGLQGPWVRSMYQGAVFLLSKGDQLST 180
HTDGISHLHFSPSSVFFGAFAL**YPYDVPDYA** 211

UniProtKB – P41155 (murines Lymphotoxin beta) mit myc-Tag

Intrazellulärdomäne	1 – 27
Transmembrandomäne	28 – 48
<u>Stalk-Region</u>	49 – 154
Extrazellulärdomäne	155 – 296
myc-Tag	297 – 321

MGTRGLQGLGGRPOGRGCLLLAVAGATSLVTL~~LL~~LAVPITVLAVLALVPQDQGRRVEKIIG 60
SGAQAQKRLDDSKPSCILPSPSSLSETPDRLHPQRSNASRNLASTSQGPVAQSSREASA 120
WMTILSPAADSTPDGPVQQLPKGEPETDLNPELPAAHLIGAWMSGQGLSWEASQEEAF~~LR~~ 180
SGAQFSPTHGLALPQDGVYYLYCHVGYRGRTPPAGRSRARS~~LT~~LSALYRAGGAYGRGSP 240
ELLLEGAETVTPVVDPIGYGSLWYTSVGFGLAQ~~LR~~SGERVYVNI~~SH~~PDMVDYRRGKTFF 300
GAVMVGEF**EQKLISEEDLAAA** 321

LTB-2A-LTA (murines Lymphotoxin alpha und beta, getrennt durch ein 2A-Peptid)

murines Lymphotoxin beta	1 – 196
myc-Tag	197 – 318
<u>2A-Peptid</u>	319 – 348
murines Lymphotoxin alpha	349 – 551
HA-Tag	552 – 563

MGTRGLQGLGGRPQGRGCLLLAVAGATSLVTL LLLAVPITVLAVLALVPQDQGRRVEKIIG 60
SGAQAQKRLDDSKPSCILPSPSSLSETPDPR LHPQRSNASRNLASTSQGPVAQSSREASA 120
WMTILSPAADSTPDPGVQQLPKGEPETDLNPE LPA AHLIGAWMSGQGLSWEASQEEAFLR 180
SGAQFSPHGLALPQDGVYYLYCHVGYRGRTPP AGRSRARSILTRSALYRAGGAYGRGSP 240
ELLLEGAETVTPVVDPIGYGSLWYTSVGFGLA QLRSGERVYVNI SHPDMVDYRRGKTFF 300
GAVMVGEF EQKLISEEDL KLRAKRAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGPASMTLLGRLHLL 360
RVLGTPPVFLLGLLLALPLGAQGLSGVRFSAAR TAHPLPQKHLTHGILKPAHLVGYPSK 420
QNSLLWRASTDRAFLRHGFSLSNNSLLIPTSG LYFVYSQVVFSGESCPRAIPTPIYLAH 480
EVQLFSSQYPFHVPLLSAQKSVYPGLQGPWVR SMYQGAVFLLSKGDQLSTHTDGI SHLHF 540
SPSSVFFGAFALTS YPYDVPDYA 563

MGTRGLQGLGGRPQGRGCLLLAVAGATSLVTLVAVLALVLPQDOGRRVEKIIG

SGAQAQKRLDDSKPSCILPSPSSLSETPDPRRLHPQRSNASRNLASTSQGPVAQSSREASA

WMTILSPAADSTPDAGVQQLPKGEPETDLNPELPA AHLIGAWMSGQGLSWEASQEEAF LR

SGAQFSPTHGLALPQDGVVYLYCHVGYRGRTPPAGRSRARS LTLRSALYRAGGAYGRGSP

ELLLEGAETVTPVVDPIGYGSLWYTSVGFGLAQLRSGERVYVNI SHPDMVDYRRGKTF F

GAVMVGEFEQKLI SEEDLAAA

Delta 1 (T87-L153)
 Delta 2 (D50-Q66)
 Delta 3 (Q66-P79)

Abb. 27: Lokalisation der Deletionen in murinem LTβ. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von murinem Lymphotoxin β. Die Stalk-Region ist grün hinterlegt. Die farbigen Balken markieren die jeweils deletierten Sequenzen, wobei Δ1 am Ende der Stalk-Region liegt, Δ2 am Anfang und Δ3 in der Mitte.

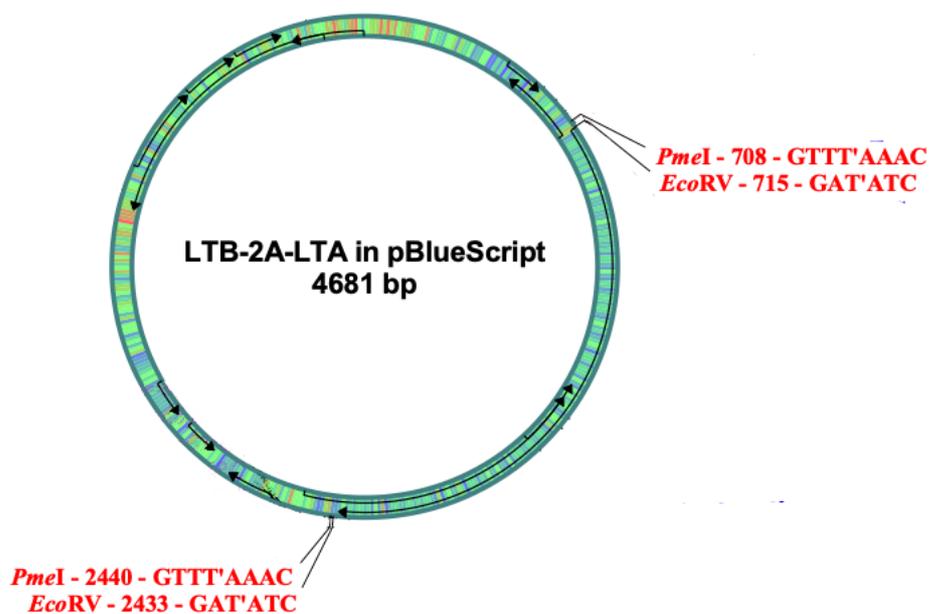


Abb. 28: Plasmidkarte von LTB-2A-LTA in pBlueScript

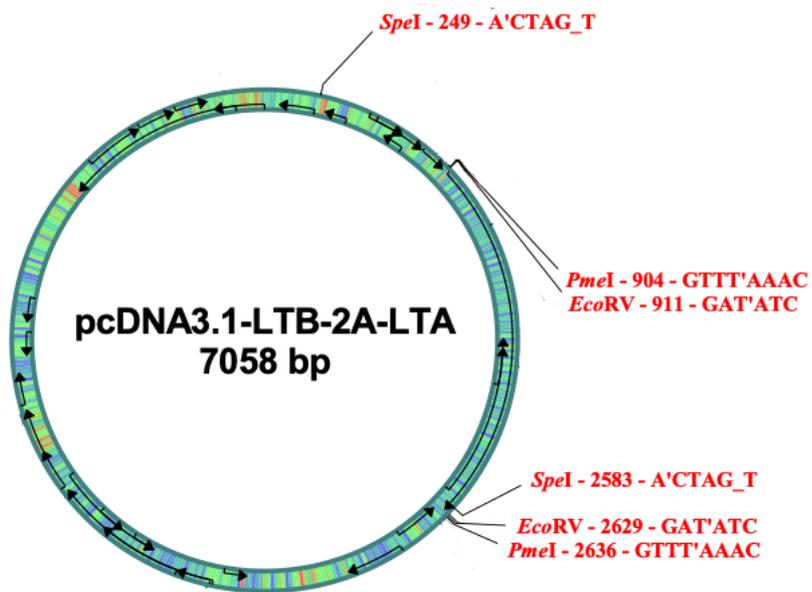


Abb. 29: Plasmidkarte von pcDNA3.1-LTB-2A-LTA

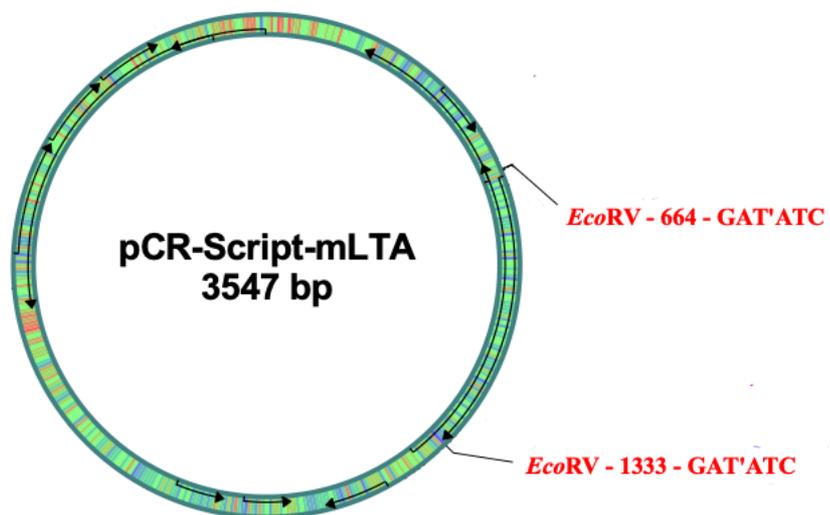


Abb. 30: Plasmidkarte von pCR-Script-mLTA

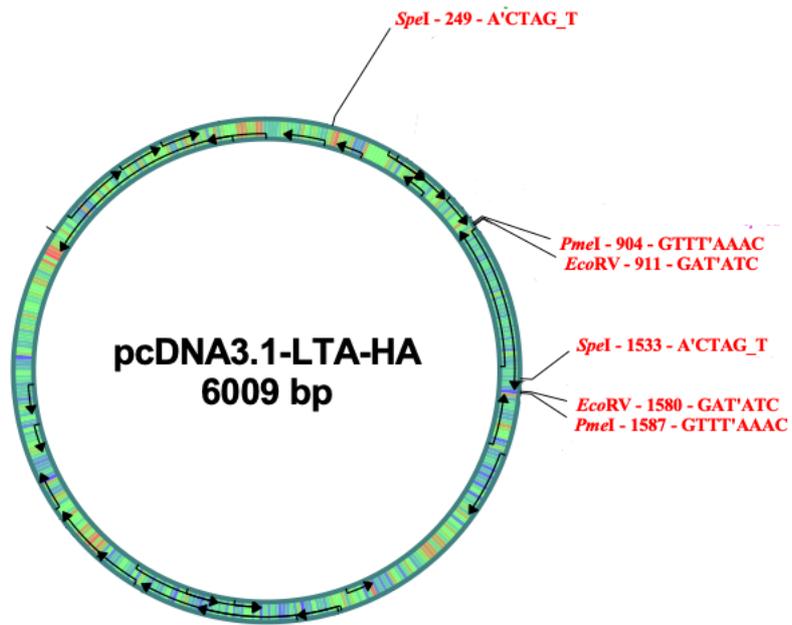


Abb. 31: Plasmidkarte von pcDNA3.1-LTA-HA

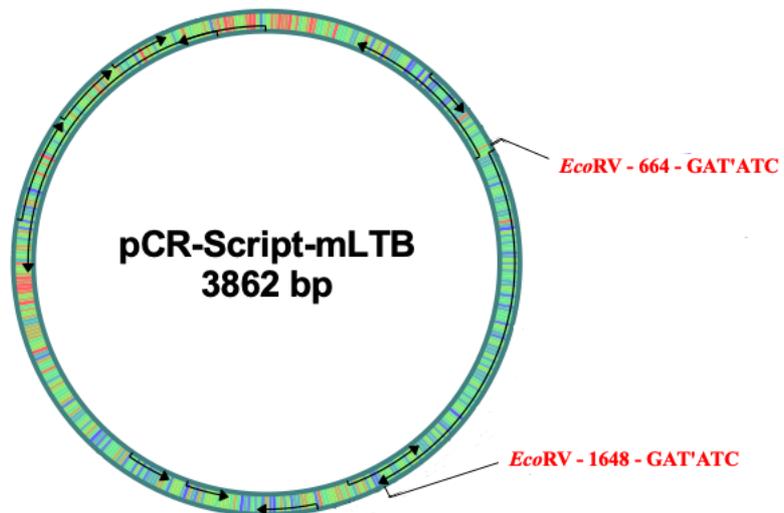


Abb. 32: Plasmidkarte von pCR-Script-mLTB

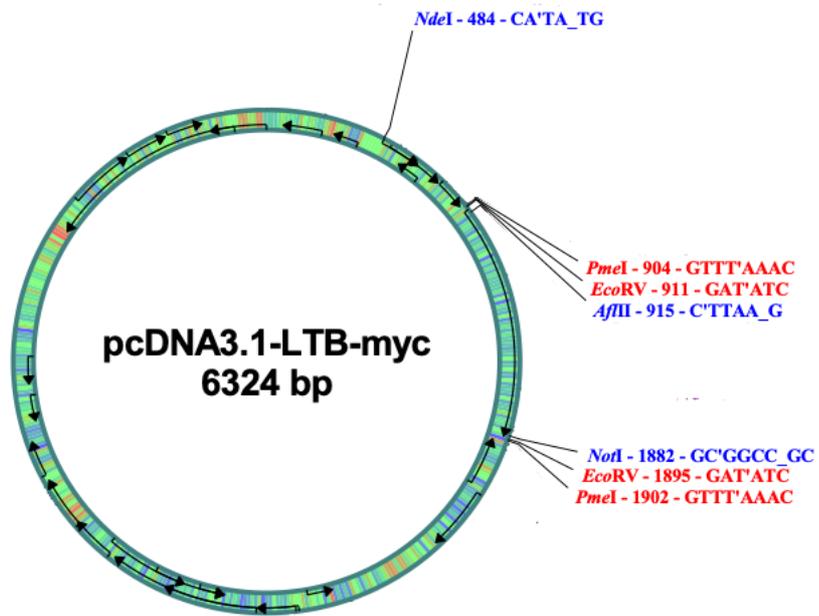


Abb. 33: Plasmidkarte von pcDNA3.1-LTB-myc

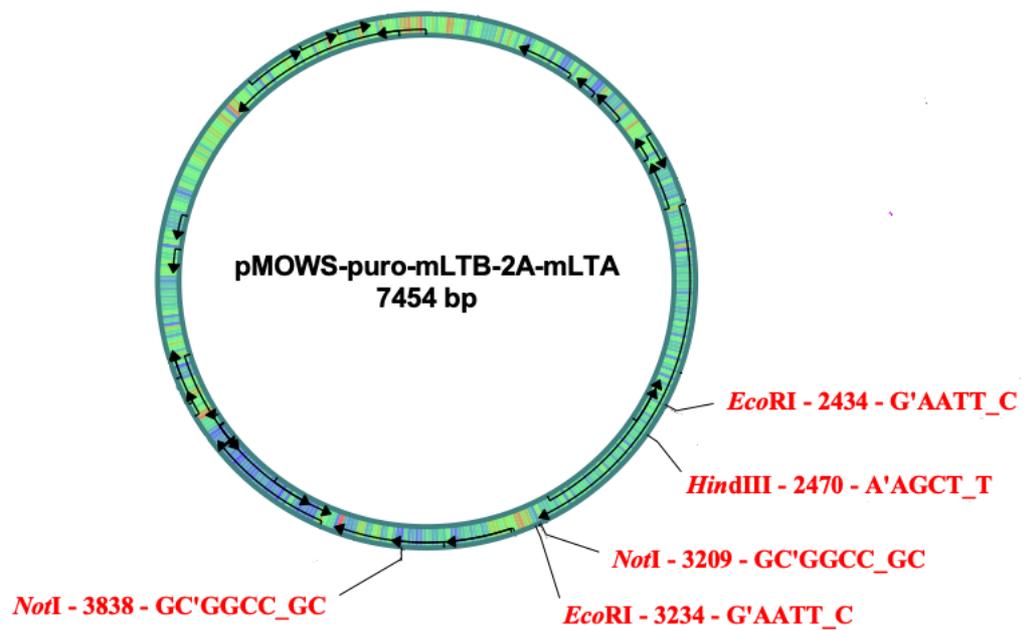


Abb. 34: Plasmidkarte von pMOWS-puro-mLTB-2A-mLTA

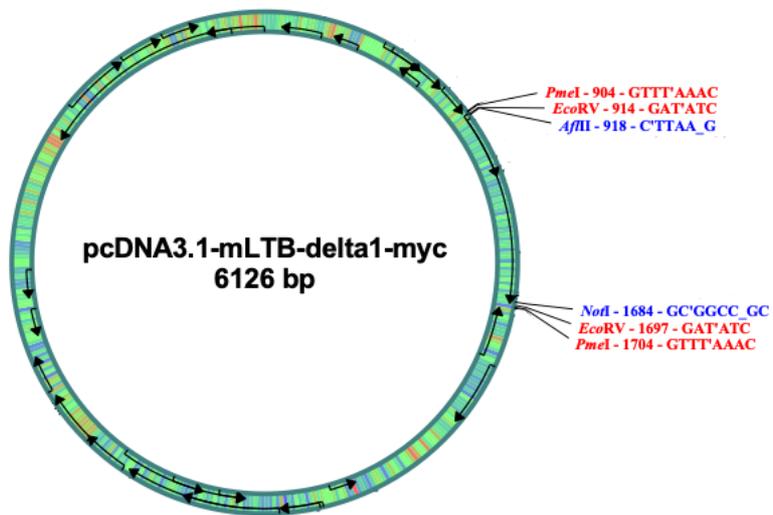


Abb. 35: Plasmidkarte von pcDNA3.1-mLTB-delta1-myc

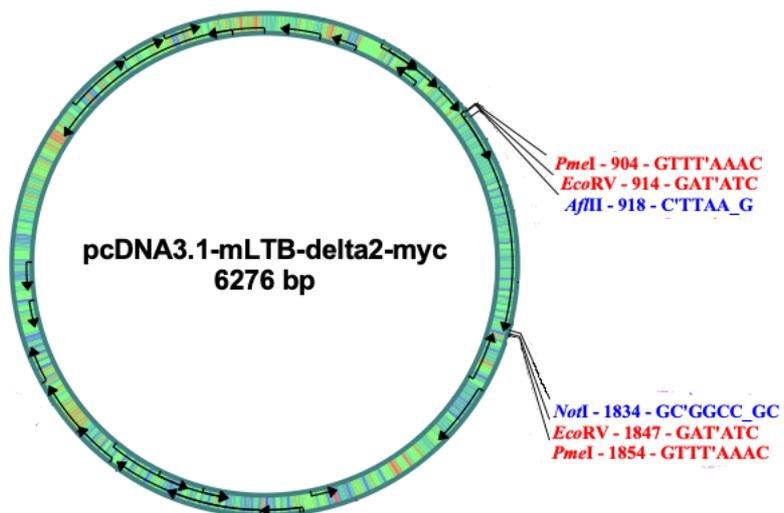


Abb. 36: Plasmidkarte von pcDNA3.1-mLTB-delta2-myc

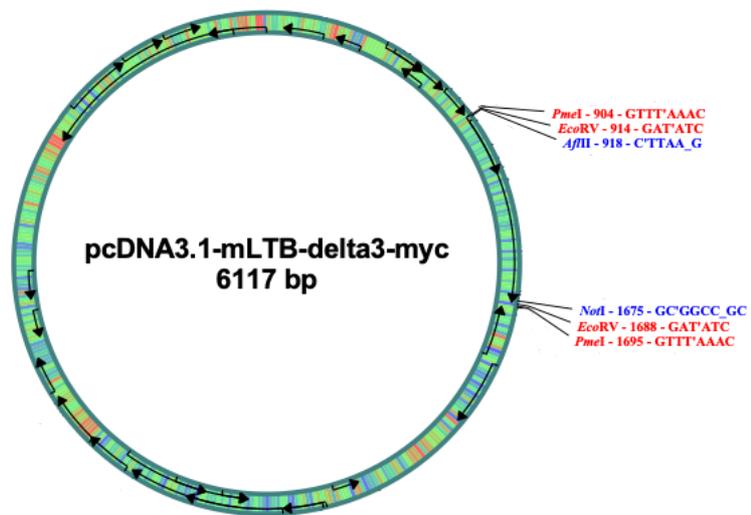


Abb. 37: Plasmidkarte von pcDNA3.1-mLTB-delta3-myc

8. Danksagung

Als erstes gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller, der mir die Gelegenheit gegeben hat, meine Dissertation am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II durchzuführen. Besonders danke ich ihm für die gute Betreuung und für sein bedachtes und evidenzbasiertes Handeln in den frühen Tagen der CoVid19-Pandemie, während derer diese Arbeit entstand. Ohne seine besonnene Leitung des Instituts hätte die Laborarbeit während der Pandemie nicht fortgeführt werden können und diese Arbeit hätte nicht in dieser Form entstehen können.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Colin MacKenzie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Dr. Kristina Vogel danke ich für die gute Betreuung und die Anleitung bei der Konzipierung und Planung meiner Experimente. Ferner gilt mein Dank Frau PD Dr. Doreen Floss für ihre Unterstützung bei den Klonierungen und Herr Dr. Jens Moll bei der Unterstützung bei der Erzeugung der Deletionsmutanten.

Meinen Freunden Dr. Antonia Elsässer, Dr. Christiane Seibel, Dr. Puyan Rafii-Seibel, Daniel Peil und B.A. Simon Schulz danke ich für die langjährige Freundschaft sowie für viele fachliche und fachfremde Gespräche, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Darüber hinaus möchte ich dem gesamten Team des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Hier gilt mein Dank insbesondere Frau Petra Opreé-Jeremic sowie Frau M. Sc. Julia Ettich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei Problemen jeder Art.

Abschließend gilt mein Dank meiner Frau Arshia Berry-Jonas, die ich während meiner Zeit im Labor kennengelernt habe und die seitdem in jeder Lebenslage an meiner Seite steht. Danke für Deine Unterstützung!