

DIE ENTSTEHUNG DES HUMANEN LÖSLICHEN INTERLEUKIN-6 REZEPTORS

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

vorgelegt von
Steffen Riethmüller

Kiel, 2016

Referent: Prof. Dr. Stefan Rose-John
Korreferent: Prof. Dr. Thomas Roeder
Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2016
Zum Druck genehmigt: 24.10.2016

gez. Prof. Dr. Natascha Oppelt, Dekanin

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
AMINOSÄUREN (AS)	XII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Biologische Bedeutung von Interleukin-6.....	1
1.2 Der Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R)	2
1.2.1 Struktureller Aufbau	2
1.3 Signaltransduktion über gp130.....	4
1.4 IL-6 <i>Trans-signaling</i> über lösliche Formen des IL-6R	7
1.4.1 Limitierte Proteolyse des IL-6R durch ADAM10 und ADAM17	9
1.4.2 Generierung des sIL-6R durch alternatives Spleißen der IL-6R mRNA	12
1.4.3 IL-6R auf Mikrovesikeln	12
1.5 Blockade des IL-6- <i>Signaling</i> als therapeutische Strategie	13
1.6 Glykosylierung von Proteinen.....	15
1.6.1 Glykosylierung des humanen IL-6R.....	16
1.7 Ziel dieser Arbeit.....	17
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Material	18
2.1.1 Antibiotika	18
2.1.2 Antikörper.....	18
2.1.3 Chemikalien.....	19
2.1.4 Enzyme	19
2.1.5 Größenmarker	20

2.1.6	Kits.....	20
2.1.7	Oligonukleotide	21
2.1.8	Plasmide.....	22
2.1.9	Puffer und Lösungen.....	25
2.1.10	Rekombinante Proteine.....	29
2.1.11	Zellkulturmedien.....	29
2.1.12	Zelllinien.....	30
2.2	Methoden.....	32
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	32
2.2.2	Protein-biochemische Methoden	37
2.2.3	Zellkultur	44
2.3	Expression und Reinigung der alternativ gespleißten Form des IL-6R (ds-sIL-6R)	48
2.3.1	Statistische Analyse	49
3	ERGEBNISSE.....	50
3.1	Der IL-6R enthält ein Triple-Serin (3S)-Motiv in unmittelbarer Nähe der ADAM17-Schnittstelle.....	50
3.2	Generierung von Expressionsplasmiden zur Untersuchung des Einflusses des (3S)-Motivs des IL-6R	52
3.3	Die Deletion des 3S-Motivs führt zum Verlust der Proteolyse des IL-6R durch ADAM17.....	55
3.4	Die Mutation des 3S-Motivs führt nicht zur Blockade der ADAM10- und ADAM17-vermittelten Proteolyse des IL-6R	59
3.5	Die Deletion des 3S-Motivs hat keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression und Signaltransduktion des IL-6R.....	61
3.6	Die Deletion von ADAM10 und ADAM17 unterstreicht deren wichtige Rolle bei der Proteolyse des IL-6R <i>in vitro</i>	63
3.7	Expression und Reinigung der alternativ gespleißten Form des löslichen IL-6R.	65
3.8	Etablierung eines ELISA zur Quantifizierung der alternativ gespleißten Form des IL-6R.....	67

3.9	Identifizierung einer löslichen Form des IL-6R mit einem durch eine Protease generierten C-Terminus und einer neuen O-Glykanstelle mittels Massenspektrometrie.....	69
3.10	ADAM17 und ADAM10 schneiden den IL-6R zwischen P355 und V356 <i>in vitro</i>	73
3.11	Bestimmung von fünf N-Glykanstellen vom löslichen IL-6R <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> mittels Massenspektrometrie	76
3.12	N- und O-Glykane sind für den intrazellulären Transport und die Signaltransduktion des IL-6R entbehrlich.....	79
3.13	Das N-und O-Glykanpaar in unmittelbarer Nähe der identifizierten Schnittstelle hat nur einen geringen Einfluss auf die Proteolyse des IL-6R	82
3.14	Das N-Glykan an Position N93 in der Domäne D1 des IL-6R fungiert als Regulationsstelle der ADAM17-vermittelten Proteolyse <i>in vitro</i>	85
3.15	Ein IL-6R ohne N-Glykane wird nicht von ADAM17 prozessiert	87
4	DISKUSSION.....	89
4.1	Das 3S-Motiv im IL-6R-Stalk-Bereich	89
4.2	Entstehung des sIL-6R	91
4.3	Einfluss der Glykane auf das Shedding des IL-6R.....	94
4.4	Ausblick.....	95
4.4.1	Entstehung des sIL-6R.....	95
5	ZUSAMMENFASSUNG	98
6	SUMMARY	99
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	100
8	ANHANG	120
8.1	Angehängte Abbildungen.....	120

8.2	Lebenslauf	126
8.3	Publikationen.....	127
8.4	Tagungsbeiträge	127
8.5	Eidesstattliche Erklärung.....	128
8.6	Danksagung	129

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung des humanen IL-6R.	3
Abbildung 2: Aminosäuresequenz des humanen IL-6R.....	3
Abbildung 3: Vereinfachte schematische Darstellung von IL-6-induzierter Signaltransduktion- und Feedback-Inhibition.	6
Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung von IL-6 <i>classic signaling</i> und IL-6 <i>trans-signaling</i>	9
Abbildung 5: Mechanismen der Entstehung des sIL-6R.....	13
Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung therapeutischer Inhibitoren von IL-6-Signalwegen.	15
Abbildung 7: Prinzip der SOE-PCR.....	33
Abbildung 8: Pipettierschema für den Zellviabilitätsassay.	47
Abbildung 9: Serielle Verdünnungsreihe der Zytokine für den Zellviabilitätsassay.	47
Abbildung 10: Der Stalk-Bereich des IL-6R beinhaltet ein 3S-Motiv in unmittelbarer Nähe der von Müllberg et al. 1994 veröffentlichten ADAM17-Schnittstelle.	51
Abbildung 11: Generierung von pcDNA3.1-Expressionsplasmiden für Varianten des humanen IL-6R zur Untersuchung des Einflusses des 3S-Motivs.....	52
Abbildung 12: Generierung von pMOWS-Expressionsplasmiden der Varianten des humanen IL-6R zur Untersuchung des Einflusses des 3S-Motivs des IL-6R.....	54
Abbildung 13: Oberflächenexpression der 3S-Deletions-Varianten des IL-6R.....	55
Abbildung 14: Untersuchung des Einflusses der Deletion des 3S-Motivs auf die ADAM10- und ADAM17-vermittelte Proteolyse des IL-6R.	58
Abbildung 15: Oberflächenexpression der 3S-Substitutions-Varianten des IL-6R.	59
Abbildung 16: Untersuchung des Einflusses der Substitution des 3S-Motivs auf ADAM10 und ADAM17-vermittelte Proteolyse des IL-6R.	60
Abbildung 17: Oberflächenexpression des IL-6R auf stabil transduzierten Ba/F3-gp130-IL-6R- und Ba/F3-gp130-IL-6RAS359_S361-Zellen.	61
Abbildung 18: Biologische Aktivität des IL-6R auf stabil transduzierten Ba/F3-gp130-IL-6R- und Ba/F3-gp130-IL-6RAS359_S361-Zellen.	62
Abbildung 19: Verifizierung der Deletion von ADAM10 und ADAM17 in HEK293-Zellen.	64
Abbildung 20: Shedding des IL-6R in ADAM17- und ADAM10-Knockoutzellen.	65
Abbildung 21: Multiples Aligment der Aminosäuresequenzen des membranständigen IL-6R, des sIL-6R und des ds-sIL-6R.....	66
Abbildung 22: SDS-PAGE und Western Blot des hergestellten und gereinigten ds-sIL-6R.....	67
Abbildung 23: Quantifizierung des gesamten sIL-6R und des ds-sIL-6R mittels ELISA.	68
Abbildung 24: Präzipitation aller Formen des sIL-6R aus humanem Serum.....	69

Abbildung 25: Identifizierung des ds-sIL-6R und einer bisher nicht beschriebenen gescheddeten Form des sIL-6R in humanem Serum.	71
Abbildung 26: Identifizierung von verschiedenen O-Glykanstrukturen auf dem durch Proteolyse entstandenen sIL-6R im humanen Serum mittels Massenspektrometrie.	72
Abbildung 27: Detailliertes Modell des katalytischen Zentrums von ADAM17.	73
Abbildung 28: ADAM17 schneidet den IL-6R zwischen P355 und P356 <i>in vitro</i>	75
Abbildung 29: ADAM10 schneidet den IL-6R ebenfalls zwischen P355 und P356 <i>in vitro</i>	76
Abbildung 30: Nachweis von Glykosylierungen des IL-6R und des sIL-6R.	77
Abbildung 31: Nachweis von N-Glykosylierungsstellen des IL-6R <i>in vitro</i> mittels MS.	78
Abbildung 32: Zelloberflächenexpression und biologische Aktivität verschiedener Glykanmutanten des IL-6R.	80
Abbildung 33: Biologische Aktivität verschiedener Glykanmutanten des IL-6R.	81
Abbildung 34: ADAM17 <i>in vitro Cleavage Assay</i> mit Glykopeptiden des IL-6R-Stalk-Bereichs.	84
Abbildung 35: PMA-vermitteltes Shedding der IL-6R-Mutanten, bei denen eine oder mehrere Glykosylierungsstellen entfernt wurden.	86
Abbildung 36: PMA-vermitteltes Shedding einer IL-6R-Mutante, die keine N-Glykosylierungsstellen besitzt.	88
Abbildung 37: Alignment zwischen der Aminosäuresequenz der Isoform 1 und der Isoform 2 (ds-sIL-6R) des humanen IL-6R.	120
Abbildung 38: Identifizierung von verschiedenen O-Glykanstrukturen des durch ADAM17 prozessierten sIL-6R mittels Massenspektrometrie <i>in vitro</i>	121
Abbildung 39: Identifizierung von verschiedenen O-Glykanstrukturen des durch ADAM10 prozessierten sIL-6R mittels Massenspektrometrie <i>in vitro</i>	122
Abbildung 40: Verifizierung der N-Glykosylierungsstellen des aus humanem Serum isolierten IL-6R.	123
Abbildung 41: Identifizierung der ADAM17-Schnittstelle eines Peptids des IL-6R-Stalk-Bereichs.	124
Abbildung 42: Plasmidkarten von pcDNA3.1-hIL-6R und von pMOWS-(puro)-hIL-6R.	125

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Antibiotika.	18
Tabelle 2: Verwendete primäre Antikörper.....	18
Tabelle 3: Verwendete sekundäre Antikörper.....	19
Tabelle 4: Verwendete Kits.....	20
Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide.	21
Tabelle 6: Verwendete Plasmide.....	22
Tabelle 7: Hergestellte Plasmide.....	22
Tabelle 8: Verwendete Puffer für die DNA-Agarosegelelektrophorese.	26
Tabelle 9: Verwendete Puffer für die durchflusszytometrischen Messungen.....	26
Tabelle 10: Verwendete Puffer und Lösungen für den ELISA.	26
Tabelle 11: Verwendete Puffer und Lösungen für die Immunpräzipitation.....	27
Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE.	27
Tabelle 13: Verwendete Puffer für den Western Blot.	28
Tabelle 14: Verwendete Puffer für die Zelllyse.	28
Tabelle 15: Verwendete rekombinante Proteine.	29
Tabelle 16: Verwendete Zellkulturmedien.....	29
Tabelle 17: Verwendete Zelllinien.....	30

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
AS	Aminosäuren
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CBM	<i>Cytokine Binding Module</i>
CD126	<i>Cluster of Differentiation 126</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CG	Cathepsin G
ConA	Concanavalin A
CRP	C-reaktives Protein
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPPI	Dipeptidylpeptidase I
ds-sIL-6R	alternativ gespleißter sIL-6R
EDT	<i>electron transfer dissociation</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked Immuno Sorbent Assay</i>
<i>f. c.</i>	<i>final concentration</i>
FCS	fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
GalNac	N-Acetylgalactosamin
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GI	GI254023X (ADAM10 Inhibitor)
gp130	Glykoprotein 130
gp80	Glykoprotein 80
GW	GW280264X (ADAM10- und ADAM17 Inhibitor)
h	human bzw. Stunde
HCD	<i>higher-energy collisional dissociation</i>
ICD	intrazellulärer Bereich
Ig	Immunglobulin
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor

Iono	Ionomycin
JAK	Janus-Kinasen
Kb	Kilobasen
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MS	Massenspektrometrie
MEFs	murine embryonale Fibroblasten
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mM	Millimolar
MPD	Membran-proximale Domäne
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
nd	<i>not detectable</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC7	<i>proprotein-convertase 7</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
pg	Pikogramm
PI3K	<i>Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase</i>
PIAS3	<i>Protein Inhibitor of Activated STAT3</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>reserve phase</i>
rpm	Rotationen pro Minute
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sec	Sekunde
sgp130	lösliche Form von gp130
SHP2	<i>Src homology-2 domain-containing phosphatase</i>
sIL-6R	lösliche Form des IL-6R

SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOCS3	<i>Suppressor Of Cytokine Signalling 3</i>
SOE-PCR	<i>Splicing by Overlapping Extensions PCR</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
<i>TIMP3</i>	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases 3</i>
TM	Transmembranbereich
TNFR2	TNF-Rezeptor 2
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
Tyk2	Tyrosin Kinase 2
U	<i>Units</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
ZIP14	<i>zinc importer 14</i>

AMINOSÄUREN (AS)

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

1 EINLEITUNG

1.1 Biologische Bedeutung von Interleukin-6

Das pleiotrope Zytokin Interleukin-6 (IL-6) zählt zur Familie der Vier-Helix-Bündel-Proteine, besteht aus 184 Aminosäuren (Hirano et al. 1986; Wolf et al. 2014) und wird von Immunzellen wie beispielsweise Makrophagen, Monozyten, B- und T-Zellen sezerniert (Kishimoto et al. 1995). Neben den Immunzellen können auch Fibroblasten, Endothelzellen, mesenchymale Zellen, Adipozyten und viele andere Zelltypen IL-6 sezernieren (Kishimoto et al. 1995; Tanaka et al. 2014).

IL-6 besitzt eine große Bandbreite an biologischen Funktionen. In infektiösen Läsionen wird es von Immunzellen sezerniert, sendet somit ein Warnsignal an die Umgebung und den gesamten Körper und aktiviert dessen Abwehrmechanismen (Tanaka et al. 2014). Somit ist die IL-6 Serumkonzentration in vielen, wenn nicht sogar allen Fällen, bei infektiösen oder entzündlichen Erkrankungen erhöht (Schaper & Rose-John 2015). In gesunden Individuen lassen sich IL-6 Konzentrationen von 2-6 pg/ml detektieren. Dieser Wert kann in extremen Entzündungssituationen auf mehrere µg/ml ansteigen (Jones et al. 2011; Rose-John 2012).

IL-6 verstärkt die spezifische Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu Th 17 Zellen und erfüllt somit eine wichtige Rolle in der Koordinierung von angeborenem und adaptivem Immunsystem (Scheller et al. 2011; Tanaka et al. 2014). Des Weiteren spielt es eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Vorläuferzellen zu Makrophagen (Nicola et al. 1983; Tanaka et al. 2000; Zhang et al. 2001), Megakaryozyten (Ishibashi et al. 1989), Neutrophilen (Walker et al. 2008) und CD8⁺ T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen (Okada et al. 1988).

Allerdings ist IL-6 auch an vielen Prozessen außerhalb des Immunsystems beteiligt (Kishimoto 2010; Schaper & Rose-John 2015). Es ist beispielsweise in die Regulation des Eisen- und Zinkspiegels im Blut involviert (Nemeth et al. 2004). Des Weiteren erhöht IL-6 die Expression des *Zinc Importer 14* (ZIP14) auf Hepatozyten und induziert somit Hypozinkämie (Liuzzi et al. 2005).

Auf der anderen Seite besitzt IL-6 auch regenerative und protektive Funktionen (Schaper & Rose-John 2015). Es ist beispielsweise der stärkste Aktivator der hepatischen Akut-Phase-Reaktion. Hierbei wird IL-6 nach einer lokalen bakteriellen Infektion von ansässigen Immunzellen ausgeschüttet und erreicht über den Blutstrom die Leber. Dort angekommen induziert es die Synthese und Sezernierung einer Gruppe von Proteinen wie das C-reaktive Protein (CRP), Serumamyloid A, Haptoglobin und *Alpha-1-Acid Glycoprotein* durch Hepatozyten. Es wird angenommen, dass diese

Proteine den Körper vor einer übermäßigen entzündlichen Reaktion schützen (Baumann & Gauldie 1994). Es ist ebenfalls bekannt, dass IL-6 eine wichtige Aufgabe in der Leberregeneration spielt (Cressman et al. 1996). Des Weiteren zeigten IL-6 defiziente Mäuse Anzeichen von Leberentzündungen (Matthews et al. 2010). Mäuse in denen der Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R) ausschließlich in Hepatozyten deletiert wurde, entwickelten Leberentzündungen, welche durch die Behandlung mit Tumornekrosefaktor- α (TNF α)-Blockern eingedämmt werden konnten, was auf ein Zusammenspiel von IL-6 und TNF α hindeutet. Die Mäuse zeigten ebenfalls eine Reduktion der Insulinsensitivität und Glukosetoleranz (Wunderlich et al. 2010).

Viele Studien haben gezeigt, dass eine erhöhte IL-6-Produktion in verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis (Hirano et al. 1988; Rodriguez-Rodriguez et al. 2011; Oelzner et al. 2012; Wang et al. 2013; Ortiz et al. 2015; Wei et al. 2015), Morbus Crohn (Ito 2003; Catarzi et al. 2011) und Castleman-Krankheit (Yoshizaki et al. 1989; Nishimoto et al. 2005; Song et al. 2010) involviert ist.

Des Weiteren ist IL-6 als ein wichtiger Wachstumsfaktor für verschiedene Krebsarten bekannt (Kyo et al. 2000; Becker et al. 2005; Kim et al. 2011; Taniguchi & Karin 2014; Zheng et al. 2014). Von Tumor-infiltrierenden Makrophagen sezerniert, aktiviert IL-6 nach Komplexbildung mit seinem Rezeptor den intrazellulären Transkriptionsfaktor *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT-3) (siehe Abschnitt 1.3), welcher die Proliferation der Krebszellen anregt und damit zum Tumorwachstum beiträgt (Yan et al. 2013; Fan et al. 2015; Jones et al. 2015). IL-6 ist ebenfalls in der Tumorentstehung und Tumorentwicklung involviert (Rutsch et al. 2010; Chua et al. 2013; Tsukamoto et al. 2013).

1.2 Der Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R)

1.2.1 Struktureller Aufbau

Der IL-6R, auch als *Cluster of Differentiation 126* (CD126) oder Glykoprotein 80 (gp80) bezeichnet, ist ein 80 kDa großes Glykoprotein und gehört zur Familie der Typ-I Transmembranproteine (Scheller et al. 2011). Seine mRNA kodiert für ein Protein mit einer Länge von 468 Aminosäuren, welches sich aus einem Signalpeptid (19 AS), einer Extrazellulären Region (339AS), einem Transmembranbereich (28 AS) und einer kurzen intrazellulären Domäne (82 AS) (siehe Abbildung 1) zusammensetzt (Yamasaki et al. 1988). Die modular aufgebaute extrazelluläre Region besteht aus drei Domänen (D1, D2 und D3) und einem flexiblen *Stalk*-Bereich (Bazan 1990). Die N-terminale, Immunglobulin-ähnliche Domäne D1 wird nicht für die Bindung von humanem IL-6 an

den humanen IL-6R benötigt (Yawata et al. 1993) und scheint keine Rolle bei der Ligandenerkennung und Signalinitiierung zu spielen (Taga et al. 1989; Yawata et al. 1993). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass sie den Rezeptor während des intrazellulären Transports im Verlauf der Proteinseznernierung (Vollmer et al. 1999) stabilisiert.

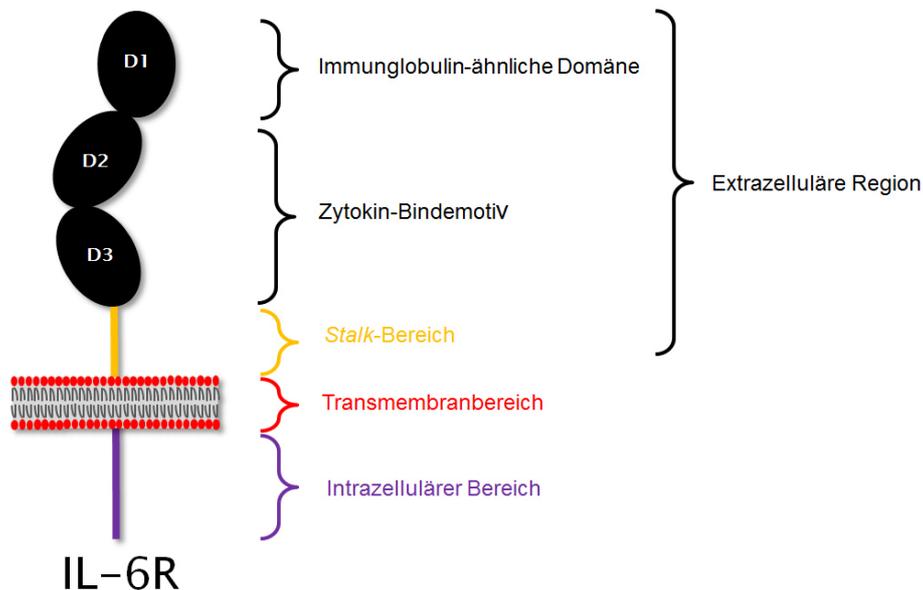


Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung des humanen IL-6R.

Die extrazelluläre Region, der *Stalk*-Bereich, der Transmembranbereich und der intrazelluläre Bereich sind farblich gekennzeichnet.

MLAVGCALLA	ALLAAPGAAL	APRRCPAQEV	ARGVLTSLP	GDSVTLTCPGV	50
EPEDNATVHW	VLRKPAAGSH	PSRWAGMGR	LLRSVQLH	DSGNYSYRAG	100
RPAGTVHLLV	DVPPEEPQLS	CFRKSPLSNV	VCEWGPRST	PSLTTKAVLLV	150
RKFQNSPAED	FQEPQCYSQE	SQKFSCQLAV	PEGDSSFYI	VSMCVASSVGS	200
KFSKTQTFQG	CGILQPDPPA	NITVTAVARN	PRWLSVTWQ	DPHSWNSSFYR	250
LRFELRYRAE	RSKTFTTWMV	KDLQHHCVIH	DAWSGLRHV	VQLRAQEFGQ	300
GEWSEWSPEA	MGTPWTESRS	PPAENEVSTP	MQALTTNKD	DDNILFRDSA	350
ATSLPVQDSS	SVPLPTFLVA	GGSLAFGTL	CIAIVLRFK	KTWKLRALKEG	400
KTSMHPPYSL	GQLVPERPRP	TPVLVPLISP	PVSPSSLGS	DNTSSHNRPDA	450
RDPRSPYDIS	NTDYFFPR				

Signalpeptid

Extrazelluläre Region inklusive *Stalk*-Bereich

Transmembranbereich

Intrazellulärer Bereich

Abbildung 2: Aminosäuresequenz des humanen IL-6R.

Die korrespondierenden Aminosäuresequenzen für Signalpeptid, extrazelluläre Region, *Stalk*-Bereich, Transmembranbereich und intrazellulärer Bereich sind farblich gekennzeichnet. Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind gelb hinterlegt.

Die zwei modifizierten Fibronectin-Typ III-Domänen D2 und D3 bilden das *Cytokine Binding Module* (CBM). Typisch für Mitglieder der Klasse-I-Zytokinrezeptorfamilie besitzt die D2-Domäne eine aus vier Cysteinen bestehende konservierte Region und die C-terminale Domäne D3 das konservierte Sequenzmotiv WSXWS (Bazan 1990; Sprecher et al. 1998). Dieses WSXWS Sequenzmotiv spielt eine wichtige Rolle bei der Ligandenbindung, Rezeptorfaltung und der Signaltransduktion (Szabo et al. 2015). Auf das CBM folgt ein flexibler, 52 Aminosäuren langer *Stalk*-Bereich, der als Abstandhalter zwischen der Plasmamembran und den Domänen D1- D3 dient, um eine Komplexbildung von IL-6/IL-6R/gp130 sicherzustellen (Baran et al. 2013). Das Ektodomänen-Shedding des IL-6R durch die Metalloproteasen *A disintegrin and metalloproteinase* (ADAM) ADAM10 und ADAM17 (siehe Abschnitt 1.4.1) erfolgt innerhalb des *Stalk*-Bereiches (Baran et al. 2013).

Untersuchungen von Müllberg et al. 1994 lassen darauf schließen, dass sich die durch ADAM17 generierte Schnittstelle in der *Stalk*-Region des IL-6R zwischen Gln357 und Asp358 in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran befindet. Der nach PMA-Stimulation proteolytisch gespaltene IL-6R wurde hierbei aufgereinigt, mit einer Carboxypeptidase behandelt und die abgespaltenen Aminosäuren identifiziert und quantifiziert. Die Schnittstelle wurde auf Basis der quantitativen Analyse der abgespaltenen Aminosäuren bestimmt (Müllberg et al. 1994).

Der Transmembranbereich und der intrazelluläre Bereich werden nicht für die Signaltransduktion benötigt (Yawata et al. 1993). Allerdings besitzt der intrazelluläre Bereich zwei Motive, die für die basolaterale Sortierung in polarisierten Zellen essentiell sind (Martens et al. 2000).

1.3 Signaltransduktion über gp130

Nach der Bindung von IL-6 an den IL-6R kommt es zur Homodimerisierung von Glykoprotein 130 (gp130), was die Signaltransduktion auslöst. Das 130 kDa große gp130 ist ein Typ I Membranprotein, welches sich aus sechs extrazellulären Bereichen, einem Transmembranbereich und einem intrazellulären Bereich zusammensetzt (siehe Abbildung 3). Auf die N-terminale, Ig-ähnliche Domäne D1 der extrazellulären Region folgen zwei Zytokinbindedomänen (D2 und D3) und drei Fibronectin-ähnliche Domänen (D4 bis D6), welche wichtig für die Signalweiterleitung zu der 277 Aminosäuren großen intrazellulären Domäne sind (Hibi et al. 1990; Scheller et al. 2011).

Nach der Dimerisierung der gp130-Moleküle kommt es zur Bildung eines tetrameren Komplexes (IL-6₁/IL-6R₁/gp130₂) (Scheller et al. 2011). Bei hohen IL-6 Konzentrationen wurde die Bildung eines funktionalen Hexamers (IL-6₂/IL-6R₂/gp130₂) beschrieben (Ward et al. 1994; Boulanger et al. 2003; Scheller et al. 2011).

Nach der Dimerisierung von gp130 kommt es zur Aktivierung von Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase (siehe Abbildung 3). Sie gehören zur Familie der Janus-Kinasen (JAK) und sind nicht-kovalent an gp130 gebunden, welches selbst keine Kinaseaktivität besitzt (Schaper & Rose-John 2015). Das Familienmitglied JAK1 ist für die IL-6-Signaltransduktion essentiell (Rodig et al. 1998). Die Familienmitglieder JAK2, JAK3 und Tyrosin Kinase 2 (Tyk2) können auch durch IL-6 aktiviert werden (Wang & Fuller 1994; Mangan et al. 2004). Allerdings sind zumindest JAK2 und Tyk2 für das IL-6-*signaling* verzichtbar (Minegishi et al. 2006; Schaper & Rose-John 2015).

Diese Tyrosinkinase werden autophosphoryliert und phosphorylieren anschließend Tyrosin-Reste in dem unstrukturierten zytoplasmischen Bereich von gp130 (Guschin et al. 1995; Heinrich et al. 2003). JAK-Proteine sind in der Krebsforschung als interessante therapeutische *Targets* identifiziert worden, und in Patienten wurden viele Krebs-assoziierte Mutationen gefunden (Gabler et al. 2013).

Die Aktivierung von JAK1 führt zur Phosphorylierung von STAT-Proteinen (Zhong et al. 1994), hauptsächlich handelt es sich hierbei um STAT3, zu einem gewissen Maß auch STAT1 (Schaper & Rose-John 2015), die Homo- oder Heterodimere bilden und in den Zellkern translozieren. Im Zellkern binden die STAT3-Dimere an spezifische STAT3-Bindestellen in den Promotoren von IL-6-Zielgenen (siehe Abbildung 3). Eines von den vielen identifizierten *Targets* von phosphoryliertem STAT3 sind Gene für Akut-Phase Proteine in der Leber (May et al. 2003), wie zum Beispiel das C-reaktive Protein (Wegenka et al. 1993). Neben dem STAT3-Signalweg werden weitere Signalkaskaden durch die Rezeptoraktivierung induziert. Hierzu zählen die MAPK-Kaskade (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) und die PI3K-Kaskade (*Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase*) (Symes et al. 1997; Schaper et al. 1998; Kim & Baumann 1999; Eulendorf et al. 2012), die mit Hilfe des Adapterproteins *Src homology-2 domain-containing phosphatase* (SHP2) aktiviert werden.

Die Aktivierung von STAT3 in normalen Zellen ist transient und streng kontrolliert. Ein weiteres Zielgen von phosphorylierten STAT-Proteinen ist das Protein SOCS3 (Suppressor Of Cytokine Signalling), das ein sehr effizienter und schnell agierender *Feedback-Inhibitor* von IL-6-ausgelöster Signaltransduktion ist (Siewert et al. 1999; Dittrich et al. 2012). SOCS3 bindet an das Phosphotyrosin-Motiv 759 von gp130 und inhibiert somit die IL-6-Signaltransduktion (Nicholson et al. 2000; Schmitz et al. 2000) (siehe Abbildung 3).

Neben den SOCS-Proteinen gibt es weitere Regulationsmechanismen, die teilweise parallel ablaufen, um eine dauerhafte STAT-Aktivierung zu verhindern. Hierzu zählt auch das oben erwähnte Adapterprotein SHP2, was zusätzlich als ein konstitutiver Inhibitor SHP2 fungiert, welcher das Phosphotyrosin-Motiv 759 im gp130 bindet und die intrazelluläre Domäne dephosphoryliert (siehe Abbildung 3). Der STAT-Inhibitor PIAS3 (Protein Inhibitor of Activated STAT3) bindet an phosphoryliertes STAT3 und verhindert somit die Bindung an STAT-3-Zielgene (Chung et al. 1997; Levy et al. 2002; Okumura et al. 2010).

Greifen die oben beschriebenen Regulationsmechanismen der STAT-Aktivierung nicht, so kann das extreme Folgen für den Organismus haben. So wird in humanen Tumoren häufig eine Überexpression oder konstitutive Expression von STAT3 beobachtet (Lo et al. 2005; Abou-Ghazal et al. 2008; Debnath et al. 2012), für die das *IL-6-signaling* mitverantwortlich zu sein scheint (Grivennikov et al. 2009; Liu et al. 2010; Lesina et al. 2011; Li et al. 2015). Mundhöhlen-, Eierstock- und Magenkrebspatienten, die pSTAT3 überexprimieren, wird eine geringe Lebenserwartung prognostiziert (Macha et al. 2011; Yang et al. 2013; He et al. 2015).

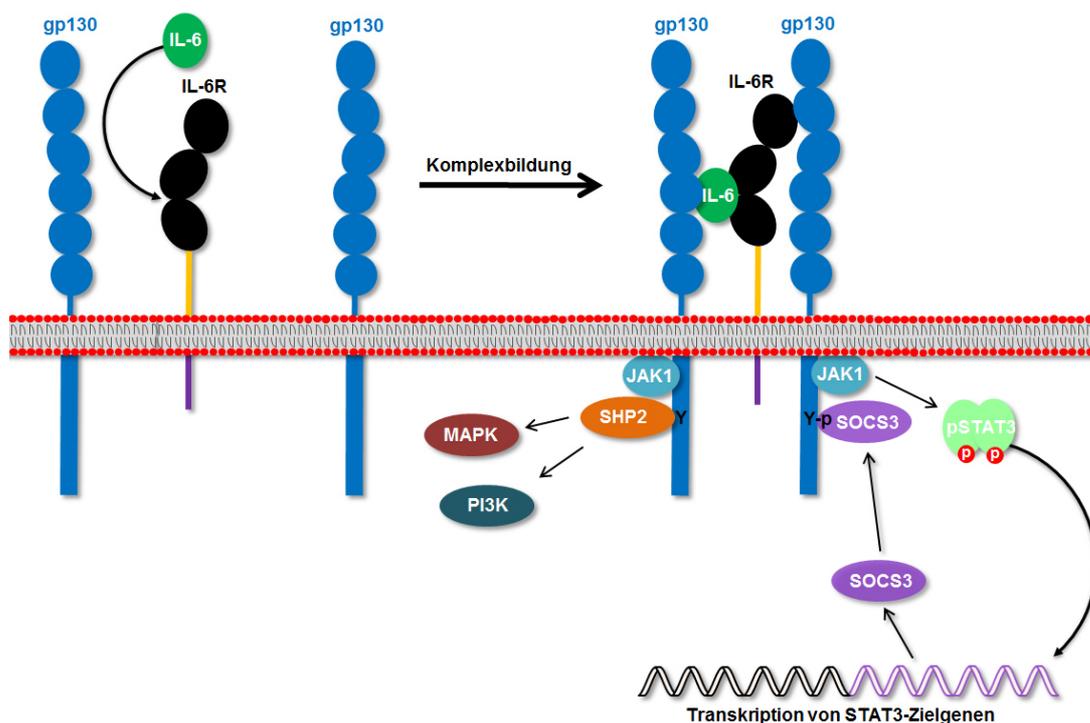


Abbildung 3: Vereinfachte schematische Darstellung von IL-6-induzierter Signaltransduktion- und Feedback-Inhibition.

Nach Bindung von IL-6 an den membranständigen IL-6R kommt es zur Dimerisierung von zwei gp130-Molekülen. Die Komplexbildung führt zur Aktivierung von konstitutiv interagierenden JAK1-Proteinen, welche die zytoplasmatische Domäne von gp130 phosphorylieren. Die vier distalen Tyrosinreste (aufgrund der Vereinfachung der Darstellung nicht abgebildet) bilden die Rekrutierungsstellen für STAT-Proteine, die unter anderem die Transkription des *Feedback-Inhibitors* SOCS3 induzieren. Der fünfte Tyrosinrest dient als Bindungsstelle für SOCS3 und SHP2. SHP2 induziert nach Rezeptoraktivierung die MAPK-Kaskade und die PI3K-Kaskade. Abbildung modifiziert nach (Schaper & Rose-John 2015) und (Chalaris et al. 2011).

1.4 IL-6 *Trans-signaling* über lösliche Formen des IL-6R

Die in Abschnitt 1.3 beschriebene Signaltransduktion über den membranständigen IL-6R wird als *classic signaling* bezeichnet (siehe Abbildung 4) (Rose-John & Heinrich 1994; Peters et al. 1998; Jones et al. 2011). Da der IL-6R nur auf Hepatozyten, Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen, B-Zellen und einigen T-Zell-Subpopulationen exprimiert wird (Oberg et al. 2006; Rose-John et al. 2006; Briso et al. 2008; Jones et al. 2010), sind nur diese Zelltypen in der Lage, *classic signaling* zu betreiben. Es konnte gezeigt werden, dass das *classic signaling* hauptsächlich regenerative und anti-entzündliche Eigenschaften besitzt (siehe Abbildung 4). Hierzu gehören beispielsweise die Regenerierung von Epithelzellen nach Verletzung des Darms (Bollrath et al. 2009; Grivennikov et al. 2009), die Fieber-Induktion, die Sekretion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber (Heinrich et al. 1990) und die Stimulation von B-Zellen zur Herstellung von Antikörpern (Chalaris et al. 2011). Des Weiteren kontrolliert das *classic signaling* den Glukose-Metabolismus und den Verlust von Appetit und Ermüdungserscheinungen (Hunter & Jones 2015).

Neben der Signaltransduktion über den membranständigen IL-6R ist auch eine Signalweiterleitung über die lösliche Form des IL-6R (sIL-6R) möglich, welche als *trans-signaling* bezeichnet wird (Rose-John & Neurath 2004; McLoughlin et al. 2005). Da gp130 ubiquitär exprimiert wird (Taga & Kishimoto 1995; Assier et al. 2010), sind alle Zelltypen in der Lage, in Gegenwart des sIL-6R über *trans-signaling* auf IL-6 zu reagieren. Dabei binden der sIL-6R und der membranständige IL-6R ihren Liganden IL-6 mit vergleichbarer Affinität (Yasukawa et al. 1992; Müller-Newen et al. 1996). Der agonistische Komplex aus sIL-6R und IL-6 ist also auch in der Lage, Zellen zu aktivieren, die keinen membranständigen Rezeptor besitzen und normalerweise nicht responsiv für IL-6 alleine sind (Chalaris et al. 2007; Vardam et al. 2007; Lissilaa et al. 2010). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass embryonale Stammzellen (Rose-John 2002; Humphrey et al. 2004), verschiedene neuronale Zellen (Marz et al. 1999; Campbell et al. 2014), Endothelzellen (Romano et al. 1997) und Keratinozyten (Wang et al. 2004) nur auf *trans-signaling* reagieren (Chalaris et al. 2011). Im Gegensatz zu anderen löslichen Rezeptoren, die in der Regel als Inhibitor ihres Liganden wirken (antagonistische Wirkung), erhöht *trans-signaling* also die IL-6 Aktivität (agonistische Wirkung) (Yawata et al. 1993; Heaney & Golde 1996).

IL-6-*trans-signaling* ist für die Regulierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems verantwortlich und aktiviert hauptsächlich pro-inflammatorische Signalwege (Rose-John et al. 2007). Dies geschieht beispielsweise durch die Inhibierung von T-Zell-Apoptose im Bindegewebe, der Förderung der Proliferation von Darmepithelzellen und der Erhaltung von aktivierten T-Zellen im entzündeten Gewebe (Jones et al. 2010; Chalaris et al. 2011).

Das Konzentrationsverhältnis aus sIL-6R und löslichen gp130 (sgp130) bildet ein Puffersystem, welches unerwünschte *IL-6-trans-signaling* Aktivitäten in nicht pathologischen Situationen verhindert (Rose-John 2012; Hunter & Jones 2015). Im Plasma von gesunden Lebewesen sind IL-6 Konzentrationen kaum detektierbar und liegen zwischen 2-6 pg/ml (Scambia et al. 1994). Die Plasmakonzentrationen des sIL-6R liegen zwischen 25 ng/ml 75 ng/ml (Honda et al. 1992; Garbers et al. 2014). Lösliche Formen von gp130, welche durch alternatives Spleißen entstehen, zirkulieren mit einer Konzentration von 100-400 ng/ml im Blut von gesunden Individuen (Narazaki et al. 1993; Scheller et al. 2005; Hunter & Jones 2015). Sgp130 bindet und neutralisiert den Komplex aus IL-6/sIL-6R und gilt deshalb als natürlicher Inhibitor von *IL-6-trans-signaling in vivo* (Narazaki et al. 1993; Weiergraber et al. 1995; Müller-Newen et al. 1998). In gesunden Menschen sind die Konzentrationen an sIL-6R und sgp130 ungefähr 1000-mal höher als die IL-6 Konzentrationen (Rose-John 2012) und die systemische IL-6-Signaltransduktion wird durch das beschriebene Puffersystem inhibiert.

Während Entzündungsprozessen können die Plasmakonzentrationen an IL-6 stark ansteigen (Nowell et al. 2003) und bei einer Sepsis sogar mehrere µg/ml erreichen (Waage et al. 1989). Dagegen steigen Konzentrationen an sIL-6R und sgp130 in Entzündungssituationen um nicht mehr als das 2,5-Fache an (Doganci et al. 2005; Schuett et al. 2012). In diesem Fall zirkuliert deutlich mehr IL-6 als sIL-6R und sgp130 im Blut (Rose-John 2012) und *IL-6-classic signaling* wird nicht inhibiert. Im entzündeten Gewebe kann es zu einem lokalen Anstieg an sIL-6R kommen (Nowell et al. 2003) und *IL-6-trans-signaling* wird ebenfalls nicht inhibiert.

Dereguliertes *IL-6-trans-signaling* ist stark an der Entstehung und Erhaltung von verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen beteiligt (Rose-John et al. 2007; Chalaris et al. 2011). Hierzu gehören beispielsweise Morbus Crohn (Chalaris et al. 2012), Rheumatoide Arthritis (Nowell et al. 2006; Oelzner et al. 2012), Asthma (Cho et al. 2015), durch Entzündungsprozesse induzierter Darmkrebs (Becker et al. 2004) und Morbus Castleman (Stone et al. 2013).

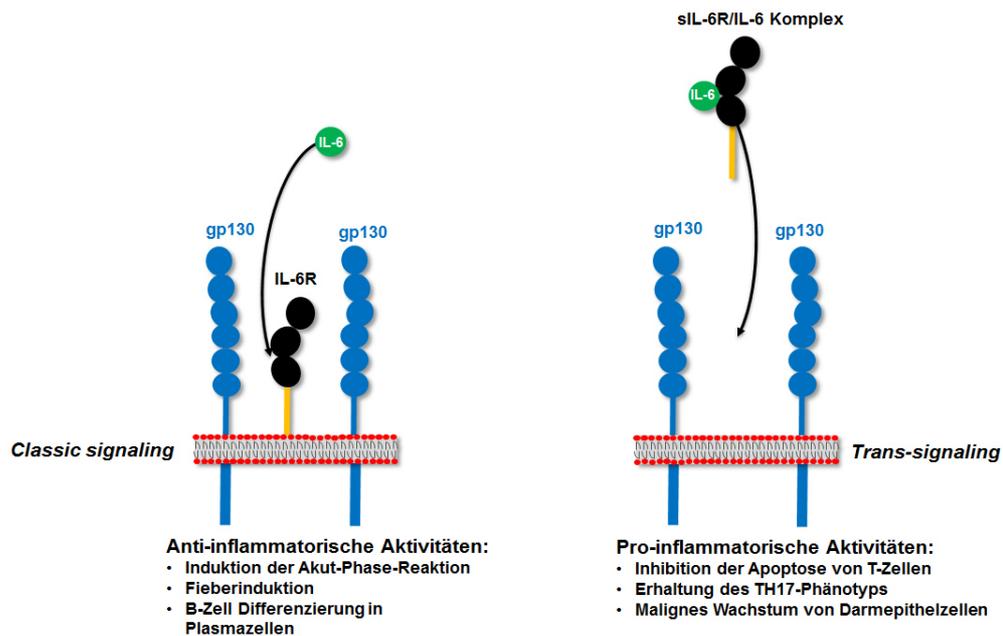


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung von IL-6-classic signaling und IL-6-trans-signaling.

Anti-inflammatorische Aktivitäten, wie die Induktion von Fieber und der Akut-Phase-Reaktion werden durch Signalwege über den membranständigen IL-6R gesteuert (*classic signaling*). Dagegen regeln Signalwege über den Komplex von sIL-6R/IL-6 (*trans-signaling*) pro-inflammatorische Aktivitäten. Abbildung modifiziert nach (Chalaris et al. 2011).

Zur Untersuchung von *trans-signaling* wird oft Gebrauch von dem Designerprotein Hyper-IL-6 gemacht. Hierbei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R, wobei Rezeptor und Zytokin über einen flexiblen Peptidanker miteinander verbunden sind. Dieses biologisch aktive Designerprotein stimuliert Zellen, die gp130 exprimieren, bei 100 bis 1000-fach geringerer Konzentration als die Kombination aus nicht verbundenem IL-6 und IL-6R (Fischer et al. 1997).

Neben den vielen pro-inflammatorischen Effekten von *trans-signaling* konnten ebenfalls einige regenerative Effekte identifiziert werden. So induzierte die Behandlung von Mäusen und Ratten mit Hyper-IL-6 Leber- und Nierenregeneration (Nechemia-Arbely et al. 2008; Nechemia-Arbely et al. 2011).

1.4.1 Limitierte Proteolyse des IL-6R durch ADAM10 und ADAM17

Da pro-inflammatorische Aktivitäten von IL-6 hauptsächlich über *trans-signaling* gesteuert werden (siehe Abschnitt 1.4.), ist es von großem Interesse herauszufinden, wie die löslichen Formen des IL-6R *in vivo* entstehen. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass mindestens eine Isoform des löslichen IL-6R durch die proteolytische Abspaltung des membrangebundenen IL-6R entsteht (siehe Abbildung 5 (Müllberg et al. 1992)). Bei diesem Prozess, der als Ektodomänen-Shedding bezeichnet wird, wird die Ektodomäne des Rezeptors in der Nähe der Plasmamembran durch eine Protease

abgespalten und in löslicher Form in die Umgebung abgegeben (Müllberg et al. 1993; Chalaris et al. 2011). Das Ektodomänen-Shedding des IL-6R stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus dar, da es Zelltypen responsiv für IL-6 macht, die normalerweise nicht auf IL-6 alleine reagieren (siehe Abschnitt 1.4.)

Von den Proteasen, die den IL-6R spalten können, sind die Mitglieder der ADAM-Familie (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) bislang am besten untersucht (siehe Abbildung 5 (Althoff et al. 2000; Matthews et al. 2003)). ADAM-Proteasen sind Typ-I Transmembranproteine, welche aus einer Prodomäne, einer katalytischen Domäne, einer EGF-ähnlichen Domäne, einer membranproximalen Domäne (MPD), einem Transmembranbereich und einer zytoplasmatischen Domäne bestehen (Black & White 1998). Die Deletion von Genen, die für ADAM10 und ADAM17 kodieren, führt zur embryonalen Letalität, was die Wichtigkeit dieser beiden Proteasen unterstreicht (Peschon et al. 1998; Chalaris et al. 2011).

ADAM17 prozessiert den IL-6R nach Stimulation in pathophysiologischen Situationen, zum Beispiel nach Ausschüttung bakterieller Toxine (Walev et al. 1996), und gilt als ein Regulationsmechanismus für die Initiierung des *trans-signaling* (Chalaris et al. 2010; Chalaris et al. 2011; Yan et al. 2015). Untersuchungen in einem murinen Entzündungsmodell lassen darauf schließen, dass der IL-6R durch ADAM17 auf apoptotischen Neutrophilen prozessiert wird (Chalaris et al. 2007). Somit gilt Apoptose als ein natürlicher Stimulus von ADAM17-vermitteltem Shedding des IL-6R (Chalaris et al. 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass ADAM17 pro- und anti-inflammatorische Prozesse steuert und in die Tumorgenese involviert ist (Chalaris et al. 2010; Scheller et al. 2011).

Die MEROPS Peptidasen-Datenbank liefert Informationen über Schnittstellenprofile von Proteasen, indem sie Daten von proteolytisch gespaltenen *in vivo* Substraten und synthetischen Peptiden vereint. Hiernach schneidet ADAM17 seine Substrate hauptsächlich zwischen den Aminosäuren Alanin und Valin (Rawlings et al. 2014). Untersuchungen von Tucher et al. konnten diese Präferenz bestätigen. Hierbei wurden Peptide *in vitro* durch rekombinantes ADAM17 bzw. ADAM10 proteolytisch gespalten und mittels Massenspektrometrie analysiert (Tucher et al. 2014). Bis heute ist ADAM17 die einzige Protease des IL-6R, für die eine Schnittstelle bestimmt worden ist. Wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, schneidet ADAM17 zwischen Q357 und D358 (Müllberg et al. 1994). Allerdings sind laut Schnittstellenprofil von ADAM17 Glutamin an der P1-Position und Asparaginsäure an der P1'-Position eher unüblich (Tucher et al. 2014). Zudem ist der IL-6R das einzige ADAM17-Substrat mit solch einer Schnittstelle, das in der MEROPS-Datenbank gelistet ist (Rawlings et al. 2014). Untersuchungen, bei denen die rekombinante katalytische Domäne von ADAM17 zur Proteolyse von Glykopeptiden des Stalk-Bereichs des IL-6R eingesetzt wurde, zeig-

ten, dass ADAM17 den IL-6R zwischen P355 und V356 schneidet (Goth et al. 2015). ADAM10 scheint für das konstitutive Shedding verantwortlich zu sein (Matthews et al. 2003) und schneidet, laut der MEROPS-Datenbank, vorzugsweise zwischen Alanin und Prolin (Rawlings et al. 2014). Hingegen bevorzugt ADAM10 laut des Schnittstellensprofils von Tucher et al. Prolin, Tyrosin und Arginin an P1-Position und Leucin sowie die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin an P1'-Position (Tucher et al. 2014).

Bis heute ist keine ADAM10-Schnittstelle für den IL-6R in der MEROPS-Datenbank aufgeführt (Rawlings et al. 2014). Allerdings ist ADAM10 in der Lage, eine Variante des IL-6R, bei der die Aminosäuren von S353 bis V362 im Stalk-Bereich deletiert sind, zu schneiden (Baran et al. 2013). Dagegen ist ADAM17 nicht in der Lage diese Deletionsvariante des IL-6R zu prozessieren, was darauf schließen lässt, dass beide Proteasen unterschiedliche Schnittstellen nutzen können (Baran et al. 2013) oder ADAM10 multiple Schnittstellen verwendet. Neben der Schnittstelle, die als Hauptdeterminante der Substrat/Protease-Spezifität gilt, können ebenfalls sekundäre Bindungsstellen im IL-6R, die räumlich weit von der Schnittstelle entfernt sind (so genannte *Exosites*), Einfluss auf die IL-6R Proteolyse nehmen (Althoff et al. 2001; Garbers et al. 2011; Dusterhoft et al. 2014).

Neben den ADAM-Proteasen wurde auch für andere Enzyme, wie beispielsweise die Serin-Protease Cathepsin G (CG) oder von Bakterien sezernierte lösliche Proteasen, gezeigt, dass sie den IL-6R proteolytisch spalten können (Vollmer et al. 1996; Bank et al. 1999; Lokau et al. 2016). Laut der MEROPS-Datenbank bevorzugt CG die Aminosäuren von Leucin, Phenylalanin und Histidin an Position P1, was im starken Gegensatz zu den Schnittstellenprofilen von ADAM10 und ADAM17 bezüglich dieser Position steht (Rawlings et al. 2014). Für CG ist Serin vor Alanin der favorisierte Aminosäurerest an Position P1' (Rawlings et al. 2014). Hingegen ist bei ADAM10 und ADAM17 Serin an Position P1' nicht favorisiert (Rawlings et al. 2014), was zeigt, dass CG eine deutlich andere Schnittstellenpräferenzen besitzt als ADAM10 und ADAM17. Auch eine CG-spezifische Schnittstelle für den IL-6R ist nicht in der MEROPS-Datenbank gelistet (Rawlings et al. 2014).

Das Shedding des IL-6R durch ADAM17 lässt sich durch den Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) induzieren (Müllberg et al. 1993). PMA ist ein Aktivator der Proteinkinase C. Ionomycin (Iono), das zu einem Calciumeinstrom führt, ist ein schneller und effizienter ADAM10-Aktivator (Jones et al. 1998; Baran et al. 2013). Die ADAM10-Aktivität kann mit dem spezifischen Inhibitor GI254023X (GI) gehemmt werden (Ludwig et al. 2005). Mit der Verbindung GW280264X (GW) lassen sich sowohl ADAM10 als auch ADAM17 spezifisch inhibieren.

Die physiologische Wichtigkeit der Entstehung des löslichen IL-6R wird durch die Entdeckung eines *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) in Exon 9 des IL-6R Gens deutlich. Dieser SNP führt zum Austausch der Aminosäure D358 zu A358 und zu einer erhöhten Shedding-Aktivität. Dies sorgt für eine Verdopplung der Konzentration an sIL-6R in humanem Serum (Galicía et al. 2004; Garbers et al. 2014). Menschen, die homozygot für den SNP sind, sind aufgrund der erhöhten sIL-6R-Konzentration besser vor koronarer Herzerkrankung geschützt (Collaboration et al. 2012). Des Weiteren weisen sie eine reduzierte, durch IL-6 induzierte CRP-Produktion auf (Collaboration et al. 2012; Interleukin-6 Receptor Mendelian Randomisation Analysis 2012), weil das oben beschriebene Puffersystem durch die Zunahme an sIL-6R mehr freies IL-6 neutralisieren kann. Zudem wird die Erhöhung der sIL-6R-Konzentration mit Adipositas, Typ-2 Diabetes und diabetisch bedingter Nierenerkrankung assoziiert (Esteve et al. 2006; Song et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass ADAM10 und ADAM17 *in vitro* bzw. in gesunden Probanden, die homozygot für den SNP sind, für die Erhöhung der sIL-6R-Konzentration verantwortlich sind (Garbers et al. 2014).

1.4.2 Generierung des sIL-6R durch alternatives Spleißen der IL-6R mRNA

Ein zweiter Mechanismus, der zur Generation des sIL-6R führt, ist das alternative Spleißen der *IL-6R* mRNA. Dies führt zur Verschiebung des translationalen Leserahmens und einem vorzeitigen Stopkodon. Damit kommt es zu einer Deletion der Transmembran- und zytosolischen Domäne (siehe Abbildung 5). Diese gespleißte Variante wird als Isoform 2 bezeichnet und besitzt einen C-Terminus (GSRRRGSCGL, siehe Abbildung 37 im Anhang), der nicht in der Aminosäuresequenz der Isoform 1 des IL-6R zu finden ist (Lust et al. 1992; Müller-Newen et al. 1996). Diese Veränderung scheint jedoch keinen Einfluss auf die biologische Aktivität der Isoform 2 zu haben (Horiuchi et al. 1994). Es wird davon ausgegangen, dass 10% des gesamten sIL-6R durch alternatives Spleißen entstehen (Lust et al. 1992) und die restlichen 90% durch Ektodomän-Shedding generiert werden (Müllberg et al. 1993). In der Maus konnte bisher keine alternativ gespleißte mRNA des IL-6R gefunden werden (Schumacher et al. 2015).

1.4.3 IL-6R auf Mikrovesikeln

Der IL-6R kann ebenfalls auf Mikrovesikeln im Blut zirkulieren (siehe Abbildung 5) (Schumacher et al. 2015). Bei Mikrovesikeln handelt es sich um Ausstülpungen der Plasmamembran, die einen Durchmesser von bis 1 µm erreichen können (Cocucci et al. 2009). Der vollständige IL-6R konnte mit Hilfe eines Antikörpers, der den intrazellulären Bereich des IL-6R erkennt, auf isolierten Mikrovesikeln aus humanem Serum mittels Western Blot detektiert werden (Schumacher et al.

2015). Mikrovesikel können mit Hilfe einer Ultrazentrifugation bei 100.000 g sedimentiert werden. Vergleiche der sIL-6R Konzentrationen von Serum vor und nach Ultrazentrifugation erlaubten die Abschätzung, dass sich 16 bis 36% des sIL-6R im Serum auf Mikrovesikeln befinden. Allerdings wurden hier nur Seren von drei gesunden Probanden untersucht (Schumacher et al. 2015).

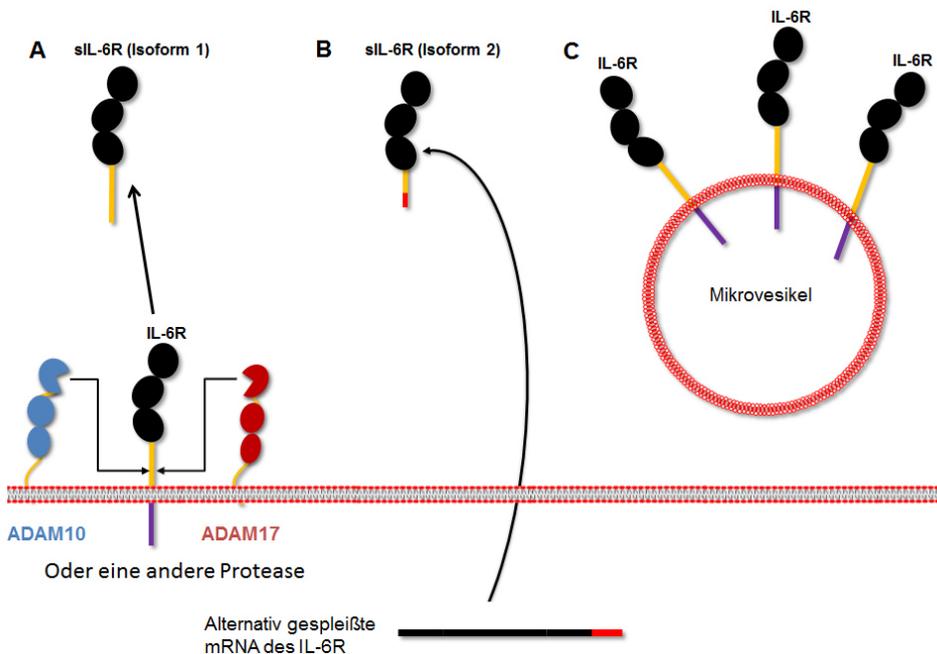


Abbildung 5: Mechanismen der Entstehung des sIL-6R.

(A) Der sIL6R kann durch Ektodomän-Shedding des membranständigen Rezeptors durch verschiedene Proteasen, vermutlich hauptsächlich ADAM10 und ADAM17, entstehen. (B) Alternatives Spleißen führt ebenfalls zu einer löslichen Form des IL-6R, der aufgrund einer Verschiebung des Leserahmens einen neuen C-Terminus besitzt. (C) Der IL-6R zirkuliert in membranständiger Form auf Mikrovesikeln im humanen Blut.

1.5 Blockade des IL-6-Signaling als therapeutische Strategie

Verschiedene Medikamente, die IL-6-Signalwege blockieren, befinden sich derzeit in der klinischen Entwicklung oder sind bereits auf dem Markt (Calabrese & Rose-John 2014). Dazu gehören IL-6-Inhibitoren und IL-6R-Inhibitoren (siehe Abbildung 6), die *classic signaling* und *trans-signaling* blockieren (Chalaris et al. 2011; Hunter & Jones 2015). IL-6 Inhibitoren, wie der monoklonale Antikörper Sirukumab (Xu et al. 2011), binden spezifisch an IL-6 und verhindern damit die Komplexbildung mit dem IL-6R. Andere IL-6-Inhibitoren, wie beispielsweise der Antikörper EBI-029, verhindern die Komplexbildung mit gp130. IL-6-Inhibitoren sind in verschiedenen klinischen Indikationen unterschiedlich effizient (Tanaka & Martin Mola 2014). Viele Krankheiten, bei denen eine Behandlung mit IL-6-Inhibitoren nützlich ist, sind mit einer Dysregulation des angeborenen Immunsystems assoziiert. Allerdings gibt es einen hohen Anteil an Patienten mit rheumatoider Arthritis, bei denen diese Behandlung mit einer Blockade des IL-6-Signalwegs nicht anschlägt (Hunter & Jones 2015).

IL-6R-Inhibitoren, wie zum Beispiel der monoklonale Antikörper Tocilizumab (siehe Abbildung 6), der für die Behandlung von rheumatoider Arthritis und Morbus Crohn zugelassen ist, verhindern die Bindung von IL-6 und IL-6R (Tanaka et al. 2014).

Des Weiteren gibt es Inhibitoren, wie beispielsweise der von der FDA zugelassene Janus-Kinasen-Inhibitor Ruxolitinib (siehe Abbildung 6), die intrazelluläre Signalwege blockieren. Diese Blockade hat nicht nur Einfluss auf die IL-6-Signaltransduktion, sondern auch auf andere Signalwege. Ruxolitinib wird für die Behandlung von Knochenmarksfibrose eingesetzt (Mascarenhas & Hoffman 2012) und kann oral eingenommen werden, was die Darreichung im Vergleich zu Antikörpern, die mittels Injektion verabreicht werden müssen, enorm erleichtert (Verstovsek et al. 2014).

Eine selektive Inhibition des IL-6-*trans-signaling*s hat gegenüber einer globalen Blockade von IL-6 den Vorteil, dass wichtige regenerative Effekte über Signalwege des *classic signaling* intakt bleiben (Jostock et al. 2001; Barkhausen et al. 2011; Chalaris et al. 2011; Jones et al. 2011). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Patienten mit rheumatoider Arthritis die mindestens 3 Jahre mit Tocilizumab behandelt wurden, vermehrte ernstzunehmende Infektionen entwickelten (Yamamoto et al. 2015).

Um *trans-signaling* spezifisch zu inhibieren wurde das Fusionsprotein sgp130Fc entwickelt, welches aus dem gesamten extrazellulären Bereich von gp130 besteht, der über die Fc-Region eines humanen IgG1 dimerisiert wurde (siehe Abbildung 6). Bei hohen IL-6-Konzentrationen, die normalerweise in Entzündungssituationen vorherrschen, blockiert sgp130Fc ausschließlich IL-6-*trans-signaling* (Garbers et al. 2011). Diese Blockade ist mindestens 10-Fach effizienter als die Blockade durch natürliches monomeres gp130 (Jostock et al. 2001; Chalaris et al. 2011).

In verschiedenen Tiermodellen der rheumatoiden Arthritis (Nowell et al. 2003; Richards et al. 2006), Sepsis (Barkhausen et al. 2011; Greenhill et al. 2011), Eierstockkrebs (Lo et al. 2011) und Bauchspeicheldrüsenkrebs (Lesina et al. 2011) konnte gezeigt werden, dass eine Blockade von IL-6-*trans-signaling* ausreicht, um das Fortschreiten der Krankheiten zu inhibieren. Neben seinem therapeutischen Potential stellt sgp130Fc ein ideales Werkzeug dar, um die physiologische Rolle des sIL-6R besser zu verstehen (Chalaris et al. 2011).

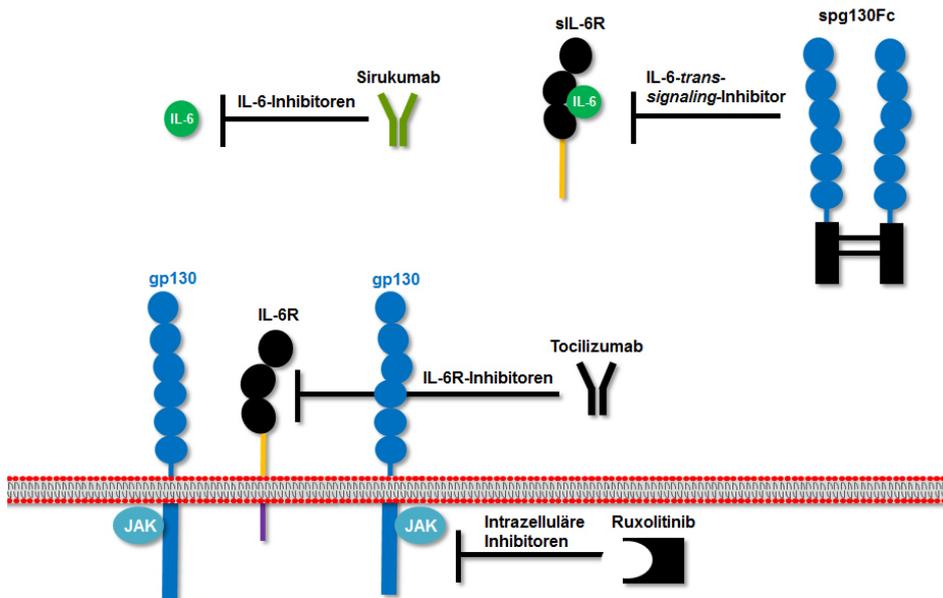


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung therapeutischer Inhibitoren von IL-6-Signalwegen.

Verschiedene spezifische IL-6-Inhibitoren, wie zum Beispiel der monoklonale Antikörper Sirukumab, verhindern die Komplexbildung mit dem IL-6R oder gp130. Sie inhibieren das *classic signaling* im selben Maße wie das *trans-signaling*. Dies gilt ebenfalls für IL-6R-Inhibitoren, wie zum Beispiel den monoklonalen Antikörper Tocilizumab. Das Fusionsprotein sgp130Fc blockiert bei hohen IL-6-Konzentrationen nur das IL-6-*trans-signaling*. Inhibitoren von intrazellulären Signalwegen, wie zum Beispiel der Janus-Kinase-Blocker Ruxolitinib, inhibieren neben IL-6-Signalwegen auch andere Signalwege und sind somit unspezifischer. Abbildung modifiziert nach (Hunter & Jones 2015).

1.6 Glykosylierung von Proteinen

Die Glykosylierung ist eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen während der Biosynthese von Proteinen (Lu et al. 2012). Glykane sind hydrophil und meist negativ geladen. Sie sind oft auf extrazellulären Proteinen zu finden und maskieren teilweise darunterliegende Antigene oder Rezeptoren. Des Weiteren regulieren sie die Stabilität und Expression von Zelloberflächenrezeptoren (Brockhausen et al. 2009). Sialinsäuren bilden oftmals die terminale Komponente von extrazellulären Glykoproteinen, maskieren biologische Erkennungsstellen oder Antikörperepitope (Schauer 2009) und schützen aufgrund ihrer Ladung vor proteolytischem Abbau (Aquino et al. 1980; van Veen et al. 2004; Muthusamy et al. 2015).

Es wird zwischen N- und O-Glykosylierung unterschieden. N-Glykane werden kovalent über eine N-glykosidische Bindung im endoplasmatischen Retikulum an die Seitenkette von Asparagin angefügt. Dabei können nur die Asparagine mit einem N-Glykan versehen werden, auf die nach einer beliebigen Aminosäure ein Threonin oder ein Serin in der Aminosäuresequenz folgt (Geetha-Habib et al. 1990; Christlet et al. 1999). Schätzungsweise sind etwa 2 Drittel dieser N-Glykanstellen (Asn-X-Ser/Thr) mit einem Zucker versehen (Stanley et al. 2009). Es sind fünf verschiedene N-

Glykan-Reste beschrieben worden, wobei die Bindung mit einem N-Acetylglucosamin die am häufigsten vorkommende ist (Freeze et al. 2009). Die Hauptfunktion von N-Glykanen ist die Sicherstellung der korrekten Proteinfaltung, bevor das Protein das ER-Lumen verlässt (Freeze et al. 2009). Falsch gefaltete Proteine werden ubiquitiniert und vom Proteasom abgebaut. Des Weiteren beeinflussen N-Glykane die Konformation, Löslichkeit und Erkennung von Glykoproteinen (Freeze et al. 2009).

Die O-Glykosylierung ist eine häufige posttranslationale Modifikation von Serin- oder Threoninresten von Proteinen (Brockhausen et al. 2009). Im Gegensatz zu den N-Glykanen gibt es für O-Glykane keine Erkennungssequenz. O-Glykane sind kovalent über eine O-glykosidische Bindung mit einem N-Acetylgalactosamin (GalNac)-Motiv verbunden. Das GalNac ist gegebenenfalls mit weiteren Zuckern, wie beispielsweise Galaktose, verbunden.

1.6.1 Glykosylierung des humanen IL-6R

Glykane können einen Großteil des Molekulargewichts eines Proteins ausmachen (Varki & Sharon 2009). Die unmodifizierte Vorstufe des IL-6R besitzt im SDS-Gel ein apparentes Molekulargewicht von 50 kDa. Da der modifizierte IL-6R bei circa 80 kDa migriert (Hirata et al. 1989), sind 30 kDa auf posttranslationale Modifikationen durch Glykane zurückzuführen.

Bislang wurden vier N-Glykane im extrazellulären Bereich des IL-6R identifiziert. Hierbei handelt es sich um die N-Glykosylierungsstellen N55 (Müllberg et al. 1993; Cole et al. 1999), N93 (Cole et al. 1999), N221 (Cole et al. 1999) und N350 (Müllberg et al. 1994). An der potentiellen N-Glykosylierungsstelle N245 (siehe Abbildung 2) wurde bisher kein N-Glykan identifiziert. Der Einfluss der N-Glykane auf die Oberflächenexpression und die Signalweiterleitung des IL-6R wurden ebenfalls bisher nicht untersucht. Für gp130 konnte allerdings bereits gezeigt werden, dass die N-Glykane essentiell für die Stabilität von gp130 sind, aber keinen Einfluss auf die Signalweiterleitung haben (Wätzig et al. 2010). Bis heute sind keine O-Glykane im IL-6R Protein identifiziert worden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass der IL-6R bisher unbestimmte O-Glykane trägt, da viele andere Rezeptoren O-glykosyliert sind (Brockhausen et al. 2009).

1.7 Ziel dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifikation und detaillierte Charakterisierung des sIL-6R. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf der Identifikation der bis heute unbekannt Protease, die für die Entstehung des sIL-6R *in vivo* zuständig ist. Hierfür soll der sIL-6R aus humanem Serum präzipitiert und der C-Terminus mittels massenspektrometrischer Untersuchungen identifiziert werden, um damit Indizien für die gesuchte Protease, die für die Entstehung des IL-6R hauptverantwortlich ist, zu gewinnen.

In vitro-Untersuchungen konnten zeigen, dass die Protease ADAM17 hauptsächlich für das induzierte Shedding des IL-6R verantwortlich ist. Die von Müllberg et al. 1994 *in vitro* bestimmte ADAM17-Schnittstelle, die sich in dem Stalk-Bereich des IL-6R zwischen Q357 und D358 befindet, soll in dieser Arbeit mittels massenspektrometrischer Untersuchungen verifiziert werden. Des Weiteren soll eine Methode zur Quantifizierung der Isoform 2 des IL-6R entwickelt werden, um festzustellen, wieviel des gesamten sIL-6R in humanem Serum alternativ gespleißt ist. Es konnte gezeigt werden, dass pro-inflammatorische Prozesse hauptsächlich über IL-6 *trans-signaling*, das von sIL-6R abhängt, gesteuert werden (Rose-John et al. 2007). Deshalb ist die Entstehung des sIL-6R von großem Interesse in der Entzündungsforschung.

Obwohl bereits N-Glykosylierungen des IL-6R *in vitro* beschrieben wurden, ist die funktionelle Rolle der Glykane bis heute ungeklärt. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit die Glykosylierung des IL-6R im humanen Serum nachgewiesen und der Einfluss der Glykosylierung auf Oberflächenexpression, Signalweiterleitung und Proteolyse des IL-6R untersucht werden.

Bis heute ist außerdem nicht untersucht worden, wie die Metalloprotease ADAM17 ihr Substrat erkennt. Vor kurzem wurde eine palindromische Aminosäuresequenz (R-S-S-S-R) in dem Stalk-Bereich von TNF α in unmittelbarer Nähe der ADAM17-Schnittstelle identifiziert, die essentiell für die durch ADAM17-vermittelte Proteolyse zu sein scheint (Etzerodt et al. 2014). Interessanterweise befindet sich in dem Stalk-Bereich von CD163, was ebenfalls zu den ADAM17-Substraten zählt, eine ähnliche palindromische Sequenz (R-S-S-R) (Etzerodt et al. 2010; Etzerodt et al. 2014). In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob ein Tripel-Serin-Motiv, welches sich in dem membranproximalen Stalk-Bereich des IL-6R befindet, einen Einfluss auf die ADAM17- und ADAM10-vermittelte Proteolyse hat.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Tabelle 1: Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Hersteller	Stockkonzentration
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	100 µg/ml
G418	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	50 mg/ml
Penicillin & Streptomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	100 U/ml & 100 µg/ml
Puromycin Dihydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	1 mg/ml

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2: Verwendete primäre Antikörper.

Antikörper	Beschreibung
Anti-hIL-6R (4-11)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus; bindet an der Domäne D1 des hIL-6R; die Herstellung ist in (Chalaris et al. 2007) beschrieben; Konzentration: 1 mg/ml; eingesetzte Verdünnungen: 1:1000 (ELISA und Western-Blot), 1:100 (Durchflusszytometrie)
Anti-hIL-6R (BAF227)	Biotinylierter polyklonaler Antikörper aus der Ziege (BAF227, R&D Systems, Minneapolis, USA); ist nach Immunisierung mit löslichem rekombinantem hIL-6R (L20–D358) gewonnen worden; Konzentration: 50 µg/ml eingesetzte Verdünnung: 1:1000 (ELISA)
Anti-ds-sIL-6R (ds6R)	Über eine Protein-G Säule gereinigtes Antiserum aus dem Kaninchen (hergestellt von Pineda Antikörper-Service, Berlin); ist nach Immunisierung mit dem Peptid G356-L365 des alternativ gespleißten hIL-6R (ds-sIL-6R) gewonnen worden; bindet an das Epitop G356-L365 der Isoform 2 des hIL-6R (ds-sIL-6R); eingesetzte Verdünnungen: 1:1000 (ELISA), 1:5000 (Western Blot)
Anti-β-Aktin	Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (Cell Signaling Technology, Frankfurt/M.); detektiert endogene Level von β-Aktin (45 kDa); Konzentration: 100 µg/ml; eingesetzte Verdünnung: 1:1000 (Western Blot)
Anti-STAT3	Monoklonaler Antikörper aus der Maus (124H6, Cell Signaling Technology, Frankfurt/M.); detektiert endogene Level von STAT3 (80 kDa); eingesetzte Verdünnung: 1:1000 (Western Blot)

Anti-pSTAT3	Monoklonaler Antikörper aus der Maus (Tyr705, Cell Signaling Technology, Frankfurt/M.); detektiert endogene Level an STAT3 nur, wenn das Tyrosin 705 phosphoryliert ist; Konzentration: 100 µg/ml; eingesetzte Verdünnung: 1:1000 (Western Blot)
-------------	--

2.1.2.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 3: Verwendete sekundäre Antikörper.

Antikörper (Spezifität)	Beschreibung
Anti-Maus (IgG)	<i>ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L)</i> (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt); eingesetzte Verdünnung: 1:1000 (Western Blot)
Anti-Maus (IgG)	Ziege IgG anti-Maus IgG (Fc)-APC, MinX Hu,Bo,Rb (Dianova GmbH, Hamburg) ; eingesetzte Verdünnung: 1:100 (Durchflusszytometrie)
Anti-Kaninchen (IgG)	<i>ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)</i> (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt); eingesetzte Verdünnung: 1:1000 (Western Blot)

2.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden bei Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Cell Signaling Technology (Frankfurt/M.), Merck KGaA (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) bezogen.

2.1.4 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme (Restriktionsenzyme, Polymerasen u.a.) stammten von Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH (Darmstadt).

2.1.5 Größenmarker

Die Größenbestimmung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot erfolgte mit Hilfe des *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (10-250 kDa). Für die Größenbestimmung von großen DNA-Fragmenten wurde der *1 kb DNA Ladder* (250-10000 bp) verwendet. Für kleinere DNA-Fragmente wurde der *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (100-1000 bp) verwendet. Alle Größenmarker wurden von Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH (Darmstadt) bezogen.

2.1.6 Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits.

Kit	Name und Hersteller
Bestimmung der Proteinkonzentration	<i>BCA Protein Assay</i> (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt)
DNA Extraktion und Reinigung aus Agarosegelen	<i>GeneJET Gel Extraction Kit</i> (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt)
Deglykosylierung von Proteinen	<i>Protein Deglycosylation Mix</i> (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt)
Mini-Präparation von Plasmid-DNA	<i>GeneJET Plasmid Miniprep Kit</i> (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt)
Midi-Präparation von Plasmid-DNA	<i>NucleoBond Xtra Midi</i> (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
Zell-Viabilitätsassay	<i>CellTiter-Blue Cell Viability Assay</i> (Promega GmbH, Mannheim)

2.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide.

Name	Nukleotidsequenz (5'- 3')
Iso2-fwd	GCTTGGAGCGGCCTGCGGCACGTGGCAG
Iso2.1-rev	CTTCCACGTCTTCTTGAACCGGGCAGGGAGGTGGC
Iso 2.2-rev	TCGAGCGGCCGCTTCAGAGCCCCGAGCTTCCACGTCTTCTT
N55A-fwd	AAACTTAAGC TTGCATGCCA CGCGTCTCGA
N55A-rev	AGTGAACAGTGGCGGCGTCTTCCGGCTCTA
N55A-fwd	TAGAGCCGGA AGACGCCGCC ACTGTTCACT
N55A-rev	GGGGCTCTTCCGGAAGCAGGAGAGCTGGGG
N93A-fwd	GCATGAATACGCTCCAGAGTCGTGGAGCTG
N93A-rev	CAGCTCCACG ACTCTGGAGCGTATTCATGC
N221-rev	GGCAGTGACTGTGATGGCGGCAGGCGGATC
N221-fwd	GATCCGCCTG CCGCCATCAC AGTCACTGCC
N245A-fwd	CCCCAGCTCT CTTGCTTCCG GAAGAGCCCC
N245A-rev	TGTAGAAAGATGACGCCCAGGAGTGGGGGT
N245A-fwd	ACCCCCACTC CTGGGCGTCATCTTTCTACA
N245A-rev	CGAAGCTGCACCACGTGCCTCAGGCCGCTC
N350A-fwd	CACTGGGAGGCTTGTCGCCGCTGCAGAATC
N350A-rev	GATTCTGCAGCGGCGACAAG CCTCCAGTG
P1-fwd	GAGCGGCCTGAGGCACGTGGTGCAGCTTCG
P4-rev	CGAGCGGCCGCTTATCTGGGGAAGAAGTAG
pMOWS-fwd	AGCCCTTTGTACACCCTAAGC
pMOWS-rev	AGCAATAGCATGATACAAAGG
SNP-rev	CATGGCATGCTTTTTGTAGC
SNP-fwd	GAGGGGAAGGTTCCCTTTGAG
SSS=>AAA-fwd	GTGCAAGATGCAGCAGCAGTACCACTGCCACATTCCTG
SSS=>AAA-rev	CAGTGGTACTGCTGCTGCATCTTGCACTGGGAGGCTTGT
SSS=>EKK-fwd	GTGCAAGATGAAAAGAAGGTACCACTGCCACATTCCTG
SSS=>EKK-rev	CAGTGGTACCTTCTTTTCATCTTGCACTGGGAGGCTTGT
T57A-fwd	CACCCAGTGAACGGCGGCATTGTCTTCCGG
T57A-rev	CCGGAAGACAATGCCGCCGTTCACTGGGTG
T352S-fwd	GATTCTGCAAATGCGAGCAGCCTCCCAGTG
T352S-rev	GACTGGGAGGCTGCTCGCATTTGCAGAATC
T352A-fwd	GATTCTGCAAATGCGGCGAGCCTCCCAGTG
T352A-rev	CACTGGGAGGCTCGCCGCATTTGCAGAATC
Δ3S-fwd	GTGCAAGATGTACCACTGCCACATTCCTG
Δ3S-rev	CAGTGGTACATCTTGCACTGGGAGGCTTGT

2.1.8 Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind Tabelle 6 zu entnehmen. Selbst hergestellte Plasmide sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Aminosäuresequenz des hIL-6R kann Abbildung 2 entnommen werden. Die Aminosäuresequenz der Isoform 2 des hIL-6R ist in Abbildung 37 dargestellt.

Tabelle 6: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung und Quelle
pcDNA3.1-hIL-6R	Expressionsvektor, dessen Insert für den Wildtyp des humanen IL-6R kodiert. Wurde von Dr. Athena Chalaris –Rissmann (Institut für Biochemie Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) zur Verfügung gestellt. Die Plasmidkarte ist in Abbildung 42A im Anhang dargestellt.
pcDNA3.1-hIL-6R Δ S353-V362	Expressionsvektor, dessen Insert für eine Variante des humanen IL-6R kodiert. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die Aminosäuren von Serin an Position 353 bis Valin an Position 362 aus dem IL-6R entfernt sind. Wurde von Dr. Christoph Garbers (Institut für Biochemie Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) zur Verfügung gestellt.
pCEPpu-hIL-6R-His	Expressionsvektor zur stabilen Transfektion von HEK293-EBNA Zellen, dessen Insert für die Isoform 1 des humanen IL-6R (ds-sIL-6R) kodiert und mit einem N-terminalen His-tag versehen ist. Wurde von Dr. Inken Lorenzen (Institut für Biochemie Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) zur Verfügung gestellt.
pMOWS	Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugetierzellen. Das Plasmid enthält Resistenzgene für die Selektion mittels Ampicillin und Puromycin (Ketteler et al. 2002). Wurde von Dr. Christoph Garbers (Institut für Biochemie Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 7: Hergestellte Plasmide.

Plasmid	Beschreibung
pcDNA3.1-hIL-6R Δ S359-S361	Expressionsvektor, dessen Insert für eine Variante des humanen IL-6R kodiert. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäuren Serin an Position 359 bis Serin an Position 361 aus dem IL-6R entfernt wurde.
pcDNA3.1-hIL-6R_ AAA	Expressionsvektor, dessen Insert für eine Variante des humanen IL-6R kodiert. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäuren Serin an Position 359 bis Serin an Position 361 des IL-6R durch drei Alanine ersetzt wurde.

pcDNA3.1-hIL-6R_EKK	Expressionsvektor, dessen Insert für eine Variante des humanen IL-6R kodiert. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäuren Serin an Position 359 bis Serin an Position 361 des IL-6R durch die Aminosäuren EKK ersetzt wurde.
pcDNA3.1-hIL-6R_N55A	Expressionsvektor, dessen Insert für den humanen IL-6R kodiert. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäure Asparagin an Position 55 des IL-6R durch ein Alanin ersetzt wurde.
pcDNA3.1-hIL-6R_N93A	Expressionsvektor, dessen Insert für den humanen IL-6R kodiert. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäure Asparagin an Position 93 des IL-6R durch ein Alanin ersetzt wurde.
pcDNA3.1-hIL-6R_N221A	Expressionsvektor, dessen Insert für den humanen IL-6R kodiert. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäure Asparagin an Position 221 des IL-6R durch ein Alanin ersetzt wurde.
pcDNA3.1-hIL-6R_N245A	Expressionsvektor, dessen Insert für den humanen IL-6R kodiert. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäure Asparagin an Position 245 des IL-6R durch ein Alanin ersetzt wurde.
pcDNA3.1-hIL-6R_N350A	Expressionsvektor, dessen Insert für den humanen IL-6R kodiert. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäure Asparagin an Position 350 des IL-6R durch ein Alanin ersetzt wurde.
pcDNA3.1-hIL-6R_N93A; N245A	Expressionsvektor, dessen Insert für den humanen IL-6R kodiert. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierenden Sequenzen für die Asparagine an Position 93 und 245 des IL-6R durch jeweils ein Alanin ersetzt wurden.
pcDNA3.1-hIL-6R_N55A; N93A;N245A	Expressionsvektor, dessen Insert für den humanen IL-6R kodiert. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierenden Sequenzen für die Asparagine an Position 55, 93 und 245 des IL-6R durch jeweils ein Alanin ersetzt wurden.
pcDNA3.1-hIL-6R_N55A; N93A;N245A;N350A	Expressionsvektor, dessen Insert für den humanen IL-6R kodiert. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierenden Sequenzen für die Asparagine an Position 55, 93, 245 und 350 des IL-6R durch jeweils ein Alanin ersetzt wurden.
pcDNA3.1-hIL-6R_N55A; N93A;N221A;N245A;N350A	Expressionsvektor, dessen Insert für den humanen IL-6R kodiert. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierenden Sequenzen für die Asparagine an Position 55, 93, 221, 245 und 350 des IL-6R durch jeweils ein Alanin ersetzt wurden.

pcDNA3.1-hIL-6R_T57A	Expressionsvektor, dessen Insert für den humanen IL-6R kodiert. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäure Threonin an Position 57 des IL-6R durch ein Alanin ersetzt wurde.
pcDNA3.1-hIL-6R_T352A	Expressionsvektor, dessen Insert für den humanen IL-6R kodiert. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäure Threonin an Position 352 des IL-6R durch ein Alanin ersetzt wurde.
pcDNA3.1-hIL-6R_T352S	Expressionsvektor, dessen Insert für den humanen IL-6R kodiert. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäure Threonin an Position 352 des IL-6R durch ein Serin ersetzt wurde.
pMOWS-hIL-6R	Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugetierzellen. Das Plasmid enthält Resistenzgene für die Selektion mittels Ampicillin und Puromycin (Ketteler et al. 2002). Das Insert kodiert für den Wildtyp des humanen IL-6R. Die Plasmidkarte ist in Abbildung 42B im Anhang dargestellt.
pcDNA3.1-hIL-6R_Iso2-His	Expressionsvektor, dessen Insert für die Isoform 2 des humanen IL-6R kodiert und mit einem N-terminalen His-tag versehen ist.
pMOWS-hIL-6R Δ S359-S361	Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugetierzellen. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäuren Serin an Position 359 bis Serin an Position 361 aus dem IL-6R entfernt wurde.
pMOWS-hIL-6R_N55A	Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugetierzellen. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäure Asparagin an Position 55 des IL-6R durch ein Alanin ersetzt wurde.
pMOWS-hIL-6R_N93A	Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugetierzellen. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäure Asparagin an Position 93 des IL-6R durch ein Alanin ersetzt wurde.
pMOWS-hIL-6R_N221A	Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugetierzellen. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäure Asparagin an Position 221 des IL-6R durch ein Alanin ersetzt wurde.
pMOWS-hIL-6R_N245A	Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugetierzellen. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäure Asparagin an Position 245 des IL-6R durch ein Alanin ersetzt wurde.
pMOWS-hIL-6R_N350A	Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugetierzellen. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäure Asparagin an Position 350 des IL-6R durch ein Alanin ersetzt wurde.

pMOWS-hIL-6R_N93A; N245A	Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugertierzellen. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die Asparagine an Position 93 und 245 des IL-6R durch jeweils ein Alanin ersetzt wurden.
pMOWS-hIL-6R_N55A; N93A;N245A	Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugertierzellen. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierenden Sequenzen für die Asparagine an Position 93, 55 und 245 des IL-6R durch jeweils ein Alanin ersetzt wurden.
pMOWS-hIL-6R_N55A; N93A;N245A;N350A	Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugertierzellen. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierenden Sequenzen für die Asparagine an Position 55, 93, 245 und 350 des IL-6R durch jeweils ein Alanin ersetzt wurden.
pMOWS-hIL-6R_N55A;N93A; N221A;N245A;N350A	Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugertierzellen. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierenden Sequenzen für die Asparagine an Position 55, 93, 221, 245 und 350 des IL-6R durch jeweils ein Alanin ersetzt wurden.
pMOWS-hIL-6R_T57A	Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugertierzellen. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäure Threonin an Position 57 des IL-6R durch ein Alanin ersetzt wurde.
pMOWS-hIL-6R_T352A	Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugertierzellen. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäure Threonin an Position 352 des IL-6R durch ein Alanin ersetzt wurde.
pMOWS-hIL-6R_T352S	Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugertierzellen. Das Insert wurde mittels Mutagenese-PCR so verändert, dass die kodierende Sequenz für die Aminosäure Threonin an Position 352 des IL-6R durch ein Serin ersetzt wurde.

2.1.9 Puffer und Lösungen

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

2.1.9.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Tabelle 8: Verwendete Puffer für die DNA-Agarosegelelektrophorese.

Puffer	Konzentration	Zusammensetzung
DNA-Ladepuffer	0,1% (w/v) 20% (v/v) 0,1% (w/v)	Bromphenolblau Glycerol in TBE-Puffer Xylencyanol
TBE-Puffer (0,5x)	44,5 mM 10,0 mM 44,5 mM	Borsäure EDTA (pH 8,0) Tris-HCl

2.1.9.2 Durchflusszytometrische Messungen (FACS)

Tabelle 9: Verwendete Puffer für die durchflusszytometrischen Messungen

Puffer	Konzentration	Zusammensetzung
FACS-Puffer	0,5% (w/v)	BSA in PBS

2.1.9.3 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Tabelle 10: Verwendete Puffer und Lösungen für den ELISA.

Puffer und Lösungen	Konzentration	Zusammensetzung
ELISA-Blockpuffer	1% (w/v) 5% (w/v)	BSA Saccharose in PBS
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	150 mM 8 mM 1,7 mM	NaCl Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4) NaH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
Stopplösung	1,8 M	H ₂ SO ₄
Streptavidinlösung (Strep-HRP, Roche <i>Diagnostics</i> GmbH, Mannheim,) Stockkonzentration: 1000 U/ml	0,2 U/ml	Streptavidin-gekoppelte <i>horse radish peroxidase</i> (POD) in PBS mit 1% BSA
Waschpuffer (PBS-T)	0,05% (w/w)	Tween-20 in PBS

2.1.9.4 Immunpräzipitation

Tabelle 11: Verwendete Puffer und Lösungen für die Immunpräzipitation.

Puffer und Lösungen	Konzentration	Zusammensetzung
NHS-Aktivierungslösung	1 mM	HCl
IP-Blockpuffer	0,5 M 0,5 M	Ethanolamin NaCl, pH 8,3
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	150 mM 8 mM 1,7 mM	NaCl Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4) NaH ₂ PO ₄ (pH 7,4)

2.1.9.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE.

Puffer und Lösungen	Konzentration	Zusammensetzung
Laemmli-Puffer (5x) reduziert	10% (w/v) 5% (w/v) 50% (w/v) 0,13% (w/v) 312 mM	SDS β-mercaptoethanol Glycerol Bromphenolblau Tris-HCl (pH 6,8)
Laemmli-Puffer (5x) nicht reduziert	10% (w/v) 50% (w/v) 0,13% (w/v) 312 mM	SDS Glycerol Bromphenolblau Tris-HCl (pH 6,8)
Sammelgel (10ml)	5,79 ml 2,50 ml 0,5 M 0,10 ml 10% (w/v) 1,67 ml 30% (w/v) 0,010 ml 0,1 ml 10% (w/v)	ddH ₂ O Tris-HCL (pH 6,8) SDS Acrylamid TEMED APS
SDS Laufpuffer (10x)	25 mM 192 mM 0,1% (w/v)	Tris-HCl (pH 8,3) Glycin SDS

Trenngel (20 ml)	9,1 ml 5,7 ml 1,5 M 0,225 ml 10% (w/v) 7,5 ml 30% (w/v) 0,045 ml 0,45 ml 10% (w/v)	ddH ₂ O Tris-HCl (pH 8,8) SDS Acrylamid TEMED APS
Coomassie Stock Lösung	0,1% (w/v) 2% (w/v) 10% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G250 Phosphorsäure Ammoniumsulfat
Fixierlösung	40% (v/v) 10% (v/v)	Ethanol Essigsäure
Entfärbelösung	1% (v/v)	Essigsäure

2.1.9.6 Western Blot

Tabelle 13: Verwendete Puffer für den Western Blot.

Blockpuffer	5% (w/v)	Milchpulver in TBS-T
<i>Tris Buffered Saline</i> (TBS)	10 mM 150 mM	Tris-HCl (pH 8,0) NaCl
TBS-T	0,05% (v/v)	Tween-20 in TBS
Transferpuffer (1x)	25 mM 192 mM 20% (v/v)	Tris-HCl (pH 8,3) Glycin Methanol
Strippingpuffer	62,5 mM 2% (v/v) 0,1% (v/v)	Tris-HCl (pH 6,8) SDS β-Mercaptoethanol

2.1.9.7 Zellyse

Tabelle 14: Verwendete Puffer für die Zellyse.

Lysispuffer (0,5 l)	50 mM 150 mM 2 mM 1% 1% ad 0,5 L	Tris/ HCl NaCl EDTA NP-40 Triton X-100 ddH ₂ O, mit Zusatz von 10 Tabletten <i>Protease Inhibitor cocktail Comple-</i> <i>te, EDTA-free</i> (Roche <i>Diagnos-</i> <i>tics</i> GmbH, Mannheim)
---------------------	---	---

2.1.10 Rekombinante Proteine

Tabelle 15: Verwendete rekombinante Proteine.

Humanes Hyper IL-6:	Fusionsprotein aus humanem IL-6 und humanem IL-6R. Wurde am Institut für Biochemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel nach (Schroers et al. 2005) hergestellt.
Humanes IL-6:	Wurde am Institut für Biochemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel nach (van Dam et al. 1993) produziert.
Humaner sIL-6R : (Isoform 1)	Wurde am Institut für Biochemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf ähnliche Weise wie der humane ds-sIL-6R produziert.
Humaner ds-sIL-6R: (Isoform 2)	Alternativ gespleißte Form des humanen IL-6R. Das Protein wurde wie in Abschnitt 3.7 beschrieben hergestellt.

2.1.11 Zellkulturmedien

Tabelle 16: Verwendete Zellkulturmedien.

DMEM (-/-)	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), high Glucose (4,5 g/l), with Stable Glutamine</i>
DMEM (+/+)	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), high Glucose (4,5 g/l), with Stable Glutamine, versetzt mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin</i>
Einfriermedium	90% (v/v) fötales Kälberserum (FCS) und 10% (v/v) DMSO
Lysogeny-Broth (LB) Medium	1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Pepton und 0,5% (w/v) Hefeextrakt
Lysogeny-Broth (LB) Platte	1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Pepton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt und 2% (v/w) Agar

2.1.12 Zelllinien

Tabelle 17: Verwendete Zelllinien.

Ba/F3-gp130	Murine prä B-Zelllinie, welche stabil mit cDNA für humanes gp130 transduziert wurde und somit in Abhängigkeit von humanem IL-6 und löslichem IL-6Ra bzw. Hyper-IL-6 wachsen kann. Wurde von der Firma Conaris Research Institute AG Kiel bezogen.
Ba/F3-gp130-hIL-6R	Murine prä B-Zelllinie, welche stabil mit cDNA für humanes gp130 und den humanen IL-6R transduziert wurde und somit in Abhängigkeit von humanem IL-6 wachsen kann. Beschrieben in (Fischer et al. 1997) und (Vollmer et al. 1999).
Ba/F3-gp130-hIL-6R_N55A	Ba/F3-gp130-hIL-6R Zelllinie (Beschreibung siehe oben). Die Aminosäure Asparagin an Position 55 wurde mittels Mutagenese-PCR durch ein Alanin ersetzt.
Ba/F3-gp130-hIL-6R_N93A	Ba/F3-gp130-hIL-6R Zelllinie (Beschreibung siehe oben). Die Aminosäure Asparagin an Position 93 wurde mittels Mutagenese-PCR durch ein Alanin ersetzt.
Ba/F3-gp130-hIL-6R_N221A	Ba/F3-gp130-hIL-6R Zelllinie (Beschreibung siehe oben). Die Aminosäure Asparagin an Position 221 wurde mittels Mutagenese-PCR durch ein Alanin ersetzt.
Ba/F3-gp130-hIL-6R_N245A	Ba/F3-gp130-hIL-6R Zelllinie (Beschreibung siehe oben). Die Aminosäure Asparagin an Position 245 wurde mittels Mutagenese-PCR durch ein Alanin ersetzt.
Ba/F3-gp130-hIL-6R_N350A	Ba/F3-gp130-hIL-6R Zelllinie (Beschreibung siehe oben). Die Aminosäure Asparagin an Position 350 wurde mittels Mutagenese-PCR durch ein Alanin ersetzt.
Ba/F3-gp130-hIL-6R_N93A;N245A	Ba/F3-gp130-hIL-6R Zelllinie (Beschreibung siehe oben). Die Asparagine an Position 93 und 245 wurden mittels Mutagenese-PCR durch jeweils ein Alanin ersetzt.
Ba/F3-gp130-hIL-6R_N55A;N93A;N245A	Ba/F3-gp130-hIL-6R Zelllinie (Beschreibung siehe oben). Die Asparagine an Position 55, 93 und 245 wurden mittels Mutagenese-PCR durch jeweils ein Alanin ersetzt.
Ba/F3-gp130-hIL-6R_N55A;N93A;N245A;N350A	Ba/F3-gp130-hIL-6R Zelllinie (Beschreibung siehe oben). Die Asparagine an Position 55, 93, 245 und 350 wurden mittels Mutagenese-PCR durch jeweils ein Alanin ersetzt.
Ba/F3-gp130-hIL-6R_N55A;N93A;N221A;N245A;N350A	Ba/F3-gp130-hIL-6R Zelllinie (Beschreibung siehe oben). Die Asparagine an Position 55, 93, 221, 245 und 350 wurden mittels Mutagenese-PCR durch jeweils ein Alanin ersetzt.
Ba/F3-gp130-hIL-6R_T57A	Ba/F3-gp130-hIL-6R Zelllinie (Beschreibung siehe oben). Die Aminosäure Threonin an Position 57 wurde mittels Mutagenese-PCR durch ein Alanin ersetzt.

Ba/F3-gp130-hIL-6R_T352A	Ba/F3-gp130-hIL-6R Zelllinie (Beschreibung siehe oben). Die Aminosäure Threonin an Position 352 wurde mittels Mutagenese-PCR durch ein Alanin ersetzt.
Ba/F3-gp130-hIL-6R_T352S	Ba/F3-gp130-hIL-6R Zelllinie (Beschreibung siehe oben). Die Aminosäure Threonin an Position 352 wurde mittels Mutagenese-PCR durch ein Serin ersetzt.
HEK293-EBNA	Immortalisierte humane embryonale Zelllinie aus der Niere, die das EBNA-1 Gen des Epstein-Barr-Virus stabil über den CMV-Promoter exprimiert (Graham et al. 1977) und somit eine stabile Transfektion und hohe Proteinexpression ermöglicht. Wurde von Prof. Dr. Werner Müller (Institut für Genetik an der Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt.
HEK293	Immortalisierte humane embryonale Zelllinie aus der Niere. (ATCC-Nummer: CRL-1573)
HEK293 ADAM10 ^(-/-)	Immortalisierte humane embryonale Zelllinie aus der Niere, die defizient für die Metalloproteinase ADAM10 ist. Das ADAM10 Gen wurde, wie in (Dombrowsky 2015) beschrieben, mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems deletiert. Wurde von jun. Prof. Dr. Björn Rabe (Institut für Biochemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) zur Verfügung gestellt.
HEK293 ADAM17 ^(-/-)	Immortalisierte humane embryonale Zelllinie aus der Niere, die defizient für die Metalloproteinase ADAM17 ist. Das ADAM17 Gen wurde, wie in Dombrowsky 2015 beschrieben, mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems deletiert. Wurde von jun. Prof. Dr. Björn Rabe (Institut für Biochemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) zur Verfügung gestellt.
HEK293 ADAM10 ^(-/-) ; ADAM17 ^(-/-)	Immortalisierte humane embryonale Zelllinie aus der Niere, die defizient für die Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 ist. Das ADAM10 und ADAM17 Gen wurde, wie in Dombrowsky 2015 beschrieben, mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems deletiert. Wurde von jun. Prof. Dr. Björn Rabe (Institut für Biochemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) zur Verfügung gestellt.
Phoenix-Eco	Verpackungszelllinie (HEK293T), stabil mit cDNA transfiguriert, welche für Antigen, Polymerase und Hüllproteine für ecotrope murine Retroviren kodiert. Beschrieben in (Ketteler et al. 2002). Wurde von Garry P. Nolan von der Stanford University (Palo Alto, CA, USA) zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen eingesetzt. Für Klonierungen wurde die *Pfu* Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt) eingesetzt, weil diese eine Korrekturlese-Funktion (*proofreading*) besitzt.

Für alle durchgeführten PCRs wurde folgender Ansatz verwendet:

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

Für alle durchgeführten PCRs wurde üblicherweise das folgende Temperaturprogramm verwendet:

95 °C	2 min		
95 °C	1 min	}	30 Zyklen
60 °C	1 min		
72 °C	2 min		
72 °C	10 min		

Die Anlagerungstemperatur der Primer (dritte Zeile des Programms) wurde dem GC-Gehalt der verwendeten Primer angepasst. Die Elongationszeit (vierte Zeile des Programms) wurde in Abhängigkeit von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments gewählt.

2.2.1.2 SOE-PCR

Eine *Splicing by Overlapping Extensions* PCR (SOE-PCR) wurde durchgeführt, um zwei oder mehr einzelne PCR-Fragmente miteinander zu ligieren. Um eine Mutation in eine DNA-Sequenz einzufügen, werden vier Primer (P) benötigt. Die beiden äußeren Primer (P1 und P4, siehe Abbildung 7) begrenzen die zu amplifizierende DNA-Sequenz und enthalten die Schnittstellen für den anschließenden Restriktionsverdau der DNA (siehe Abschnitt 2.2.1.3.). Die beiden inneren Primer (P2 und P3, siehe Abbildung 7) enthalten die gewünschte Mutation. Im ersten Schritt wurden 2 PCRs mit jeweils einem äußeren Primer und je einem inneren Primer (ein Ansatz mit P1 und P2 sowie ein Ansatz mit P3 und P4, siehe Abbildung 7) durchgeführt. 1 µl der so entstandenen DNA-Fragmente wurde anschließend als Template für die abschließende dritte PCR mit den beiden äußeren Primern (1 und 4 siehe Abbildung 7) eingesetzt. Das entstandene Insert, welches die gewünschte Mutation enthielt, wurde mit Hilfe enzymatischer Spaltung (siehe Abschnitt 2.2.1.3) und darauf folgender Ligation (siehe Abschnitt 2.2.1.9) in ein Expressionsplasmid eingefügt.

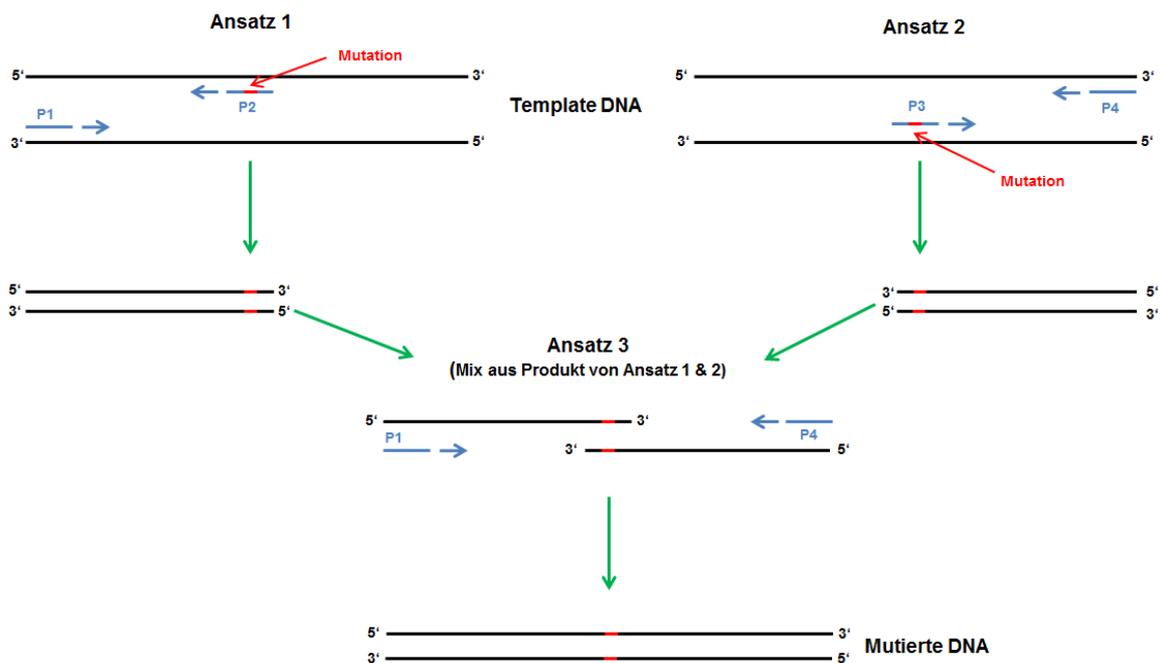


Abbildung 7: Prinzip der SOE-PCR.

2.2.1.3 Enzymatische Spaltung von DNA

Die Spaltung von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Für eine enzymatische Spaltung von 10 µg DNA wurden 10 U des entsprechenden Enzyms im jeweiligen Reaktionspuffer in einem Gesamtansatz von 50 µl über Nacht bei 37°C inkubiert. Wenn zwei unterschiedliche Enzyme in demselben Reaktionsansatz verwendet wurden, wurde der vom Hersteller empfohlene Reaktionspuffer eingesetzt, der für beide Restriktionsendonukleasen die höchste Effizienz zeigte. Wurden Enzyme verwendet, die höhere Inkubationstemperaturen benötigen, so wurde ein zweiter Inkubationsschritt mit der benötigten Temperatur durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DNA-Ladepuffer beendet und die so entstandenen DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.1.6) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

2.2.1.4 Erzeugung von glatten Enden an linearisierten Plasmiden

Um glatte Enden (*blunt ends*) nach dem Schneiden der DNA durch Restriktionsendonukleasen zu erzeugen, wurden 5'-überstehende einzelsträngige DNA-Sequenzen mit Hilfe des Klenow Fragments (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt) aufgefüllt und 3'-überstehende einzelsträngige DNA-Sequenzen abgebaut. Hierzu wurde der Restriktionsansatz mit 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 10 U Klenow Fragment bei 37°C für 30 min inkubiert. Die verwendeten Enzyme wurden bei 75°C für 10 min inaktiviert. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des Kits NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach den Herstellervorgaben gereinigt.

2.2.1.5 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Nach der enzymatischen Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen (siehe Abschnitt 2.2.1.3) wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 2 µl thermosensitiver Alkalischer Phosphatase (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt) dephosphoryliert. Die Reaktion wurde nach 1 h Inkubation bei 37°C durch Zugabe von DNA-Probenpuffer gestoppt.

2.2.1.6 DNA-Gelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurde eine DNA-Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden 2% (w/v) Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf) in 0,5-fachem TBE-Puffer aufgekocht und mit 0,002% (v/v) Ethidiumbromid versetzt und in einen Schlitten ausgegossen. Die DNA-Fragmente wurden mit 6x DNA-Ladepuffer (siehe Tabelle 8) versetzt, auf ein erkaltetes Agarosegel geladen und in einer horizontalen Elektro-

phoresekammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei einer konstanten Spannung von 120 V in 0,5-fachem TBE-Puffer der Größe nach aufgetrennt. Die Gele wurden mit Hilfe eines BioDocAnalyze-Systems (Biometra GmbH, Göttingen) dokumentiert.

2.2.1.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die durch DNA-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.1.6) aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 300 nm sichtbar gemacht. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten und die Isolierung der DNA erfolgte im Anschluss mit dem *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt) nach Herstellerprotokoll.

2.2.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur spektroskopischen Bestimmung von DNA-Konzentrationen in wässrigen Lösungen wurde der NanoDrop® ND-1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen,) verwendet. Der NanoDrop® ND-1000 ist in der Lage, DNA-Konzentrationen zwischen 2 und 3700 ng/µl zu detektieren. Die Reinheit der DNA wurde über das Absorptionsverhältnis A260/A280 festgestellt, das größer als 1,8 sein sollte.

2.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von *sticky end* DNA-Fragmenten wurde der enzymatisch geschnittene und dephosphorylierte Vektor im molaren Verhältnis 1:3 mit dem verdauten Insert ligiert. Hierzu wurden die DNA-Fragmente mit 1 U T4 DNA-Ligase und 2 µl 10x Ligasepuffer (beides von Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt) versetzt (20 µl Gesamtansatz) und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Ligation von *blunt end* DNA-Fragmenten wurden 2 U Ligase und zusätzlich 2 µl PEG4000 (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte zunächst bei Raumtemperatur für 1 h und dann über Nacht bei 4°C.

2.2.1.10 Transformation von chemisch kompetenten *Escherichia coli*

25 µl einer chemisch kompetenten *Escherichia coli* XL-1 Blue-Lösung (10⁵ Zellen) wurden mindestens für 20 min bei 4°C aufgetaut und anschließend mit 10 ng Plasmid-DNA oder 20 µl Ligationansatz versetzt. Die Bakterien wurden für 5 min auf Eis inkubiert, bevor der Hitzeschock (1 min, 42°C) erfolgte. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien für 3 min auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden sie mit 150 µl LB-Medium versetzt und für 1,5 h im Thermoschüttler (Eppendorf AG, Hamburg) inkubiert (37°C, 700 rpm). Die Bakteriensuspension wurde schließlich auf einer LB-Platte, die 100 µg/ml Ampicillin enthielt, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C in einem Inkubator WTC binder (WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen) inkubiert.

2.2.1.11 Plasmid-DNA Mini-Präparation

Für die Mini-Präparation von Plasmid-DNA wurden einzelne transformierte Bakterienkolonien (siehe Abschnitt 2.2.1.10) in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 2 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C und 850 rpm im Thermoschüttler (Eppendorf AG, Hamburg) wurden die Bakterienkulturen bei 12000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Bakteriensediment wurde für die Mini-Präparation verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *GeneJET Plasmid Miniprep Kits* (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt), nach Angaben des Herstellers, isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit der Hilfe von Isopropanol gefällt, durch Zentrifugation pelletiert (15000 g, 4°C, 10 min) und anschließend mit 1 ml Ethanol 70% (v/v) gewaschen. Nach der abschließenden Zentrifugation (15000 g, 5 min, 4°C) wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet und in 50 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.1.12 Plasmid-DNA Midi-Präparation

Für die Midi-Präparation von Plasmid-DNA wurden 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 160 rpm im Thermoschüttler (Eppendorf AG, Hamburg) inkubiert. Die Bakterienkultur wurde bei 10000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Bakteriensediment wurde für die Midi-Präparation verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *NucleoBond Xtra Midi Kits* (Macherey-Nagel GmbH & Co.Kg, Düren), nach Angaben des Herstellers, isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit der Hilfe von Isopropanol gefällt, durch Zentrifugation pelletiert (15000 g, 4°C, 10 min) und anschließend mit 1 ml Ethanol 70% (v/v) gewaschen. Nach der abschließenden Zentrifugation (15000 g, 5 min, 4°C) wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet und in 200 µl ddH₂O aufgenommen. Anschließend wurde die DNA-Konzentration, wie in Abschnitt 2.2.1.8 beschrieben, bestimmt.

2.2.1.13 Sequenzierung von DNA

Alle Inserts der selbst hergestellten Plasmide und Inserts wurden von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) sequenziert. Hierzu wurde der firmeneigene Primer pcDNA3.1-FP, der vor dem Insert bindet und mit dem man von 5' nach 3' sequenziert und der pcDNA3.1-RP Primer, der hinter dem Insert bindet und mit dem man von 3' nach 5' sequenziert, verwendet. Des Weiteren wurden ausgewählte eigene Primer (siehe Tabelle 5) verwendet.

2.2.2 Protein-biochemische Methoden

2.2.2.1 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression verschiedener Proteine auf Zellen wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Hierzu wurden die Ba/F3-gp130- oder HEK293-Zelllinien bei 300 g, 4°C und 5 min zentrifugiert und dreimal mit PBS gewaschen. Für jede untersuchte Zelllinie wurden zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße mit jeweils 1×10^6 Zellen in 100 µl FACS-Puffer (siehe Tabelle 9) versehen. Einer der beiden Ansätze blieb unbehandelt und zu dem anderen wurden 2 µl 4-11 Antikörper (siehe Tabelle 2) hinzugefügt. Die Zellen wurden nach leichtem Schütteln für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden alle Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und für 1 h mit 1 µl anti-Maus-APC-Sekundärantikörper (Dianova GmbH, Hamburg) in 100 µl FACS-Puffer auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal in FACS-Puffer gewaschen, anschließend in 500 µl FACS aufgenommen und mit einem FACS Canto von BD (Biosciences, Heidelberg) analysiert. Die so gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der *FCS Express V3 Software* (De Novo Software, Glendale, Kalifornien, USA) ausgewertet.

2.2.2.2 Lyse von Zellen

Die Zellen wurden mit 1 ml eiskaltem PBS ab gespült und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1000 g und 4°C für 2 min pelletiert. Das Pellet wurde in Lysispuffer (siehe Tabelle 14) resuspendiert (6-Well-Platte: 50 µl; 10cm-Schale: 300 µl) und für 1 h unter permanenter Bewegung bei 4°C inkubiert. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden bei 15000 g, 4°C, 15 min pelletiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Proteingehalt wurde mittels BCA Assay (siehe Abschnitt 2.2.2.3) bestimmt. Die Proteinlysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.3 Bestimmung des Proteingehalts (BCA Assay)

Zur Bestimmung des Proteingehalts von Zelllysaten (siehe 2.2.2.2) wurde der *BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt) verwendet. Hierbei wurden die Zelllysate im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt und in einer 96-Well-Platte nach Protokoll des Herstellers analysiert. BSA wurde hierbei in verschiedenen Konzentrationen zwischen 0 und 2000 µg/ml zur Erstellung einer Standardkurve verwendet. Jede Probe und Standardverdünnung wurden in Dreifachbestimmung analysiert. Nach einer Inkubationszeit von ca. 15 min erfolgte die Messung bei 562 nm in einem Tecan Spectra Rainbow Plattenreader (Tecan, Maennedorf, Schweiz).

2.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Hilfe des Mini-PROTEAN 3 Cell-Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) nach Größe aufgetrennt. Das Sammelgel (siehe Tabelle 12) besaß eine Höhe von 1 cm, die Trenngelhöhe (siehe Tabelle 12) betrug 6 cm. Die Geldicke betrug 1,5 mm. Die gewonnenen Proteinlysate (Herstellung siehe Abschnitt 2.2.2.2) wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 5x Laemmlipuffer versetzt und bei 95°C für 10 min aufgekocht. Danach wurden die Proben für 5 min auf Eis gestellt und danach kurz abzentrifugiert. Die Vorgehensweise bei Überständen ist in Abschnitt 2.2.2.9 beschrieben. Die Gele wurden mit Proteinmarker und Proben beladen und die Proben bei 100-150 Volt aufgetrennt, bis die Lauffront das Gel verlassen hat.

2.2.2.5 Kolloidale Coomassie-Färbung

Zur Färbung von Proteine, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.2.4) wurden, wurde eine kolloidale Coomassie-Färbung (modifiziert von (Neuhoff et al. 1988)) durchgeführt. Durch die Zugabe von Ammoniumsulfat und Phosphorsäure befindet sich das Coomassie in einem kolloidalen Zustand was im Vergleich zur konventionellen Coomassie-Färbung zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit von 200 ng auf 1 ng Protein pro Bande führt (Kang et al. 2002). Zudem sind 80% der Proteine innerhalb der ersten 3 Stunden angefärbt und die Hintergrundfärbung ist deutlich geringer.

Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur bei leichtem Schwenken auf einem Wipptisch WT16 (Biometra GmbH, Göttingen) durchgeführt. Das Gel wurde direkt nach Beendigung des Laufes in eine Plastikbox mit 50 ml Fixierlösung (siehe Tabelle 12) überführt und für mindestens 1 h inkubiert. Danach folgten zwei 10-minütige Waschschrte mit 100 ml H₂O. 40 ml der Coomassie-Färbelösung (siehe Tabelle 12) wurden mit 10 ml Methanol versetzt und das Gel über Nacht in

der Färbelösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gel in eine saubere Plastikbox mit 100 ml H₂O inkubiert und nach Entfernung der großen Coomassieflocken mit Entfärbelösung (siehe Tabelle 12) behandelt, bis die Hintergrundfärbung des Gels vollständig ausgewaschen war. Die Geldokumentation wurde mit einem Scanner *CanoScan LIDE 700F* (Canon Deutschland GmbH, Krefeld) durchgeführt.

2.2.2.6 Western Blot

Die Proteine wurden nach der Auftrennung über die SDS-PAGE im Tank-Blotting Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt) in einer Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell- Apparatur (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) transferiert. Dazu wurde die PVDF-Membran für 1 min in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer (siehe Tabelle 13) überführt. Das SDS-Gel wurde ebenfalls im Transferpuffer getränkt. Für den Transfer wurden insgesamt 4 Whatman-Papiere ebenfalls in dem Transferpuffer äquilibriert. 2 Stücke Whatman-Papier, Membran, Polyacrylamidgel und abschließend wieder 2 Stücke Whatman-Papier im Transfergerät wurden aufeinander gelegt und die Luftblasen zwischen Membran und Gel vollständig entfernt. Nachdem ein Kühlakku in der Blottingkammer platziert wurde, um zusätzliche Kühlung zu gewährleisten, wurden die Proteine elektrophoretisch bei einer konstanten Spannung von 95 V für 120 min bei 4°C im Kühlraum transferiert.

Anschließend wurde die Membran in ein 50 ml Falcon mit 5 ml Blockpuffer (siehe Tabelle 13) überführt. Nach einer Inkubation von mindestens 1 h wurde der Blockpuffer abgegossen und 5 ml frischer Blockpuffer hinzugegeben. Nach der Zugabe der entsprechenden Menge des gewünschten Primärantikörpers wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 2) wurde die Membran viermal mit 5 ml TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3) in Blockpuffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach 4 weiteren Waschschritten mit TBS-T wurde die Chemilumineszenz der Proteine mit Hilfe des *SuperSignal West Pico-* und *SuperSignal West Femto Kits* (GE Healthcare, München) und eines FluorChem Multigame III Q-Geräts (Alpha Innotech, Cell Biosciences, Inc., Santa Clara, CA, USA) detektiert. Die entstandenen Bilder wurden mit der Bildbearbeitungssoftware *Adobe Photoshop CS4 Extended* (Adobe Systems, San José, Kalifornien, USA) bearbeitet.

2.2.2.7 Stripping von Western Blot-Membranen

Um eine Detektion mit einem weiteren Primärantikörper zu ermöglichen, wurden die bereits gebundenen Antikörper durch die Inkubation mit 50 ml Stripping Puffer (siehe Tabelle 13) bei 65°C für 30 min von der PVDF-Membran entfernt. Die Membran wurde nach dem Strippen jeweils fünfmal mit 5 ml TBS-T gewaschen und dann, wie in Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben, behandelt.

2.2.2.8 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur unter Schwenken bei mittlerer Stufe auf einem Wipptisch WT16 (Biometra GmbH, Göttingen) durchgeführt. Zur quantitativen Bestimmung des sIL-6R aus Zellkulturüberständen sowie dem sIL-6R aus humanem Serum wurde ein Sandwich-ELISA verwendet. Hierfür wurde der 4-11 Antikörper (siehe Tabelle 2) 1:1000 in PBS verdünnt und über Nacht an eine 96-Well-Mikrotiterplatte *Maxisorb Nunc-Immuno Plate* (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt) gebunden (50 µl/Well). Nicht gebundener Antikörper wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit jeweils 200 µl PBS-T pro Well entfernt und jedes Well mit 200 µl ELISA-Blockpuffer (siehe Tabelle 10) versetzt und für mindestens 1,5 h inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurden die Standardreihe und die Probe in Dreifachbestimmung aufgetragen. Die Proben wurden in der Regel 1:50 oder 1:100 in 1% BSA in PBS verdünnt. Zur Quantifizierung wurde das rekombinante Protein des humanen sIL-6R (siehe Tabelle 15) in 1% BSA in PBS verdünnt und als Standard aufgetragen und ebenso wie die Proben für 2 h inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurden jedem Well 50 µl des 1:1000 verdünnten biotinylierten Detektionsantikörpers BAF227 (siehe Tabelle 2) zugegeben. Nach weiteren 2 h wurden die Wells wieder dreimal gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen und anschließend 100 µl Streptavidin-POD-Lösung (siehe Tabelle 2) in jedes Well gegeben. Nach 30 min Inkubation unter Lichtausschluss wurde jedes Well erneut dreimal mit jeweils 200 µl PBS-T gewaschen und 75 µl BM blue POD-Substrat (Roche *Diagnostics* GmbH, Mannheim) zugegeben. Die Reaktion wurde nach höchstens 20 min mit 75 µl 1,8 M H₂SO₄ abgestoppt. Die kolorimetrische Auswertung wurde an einem Tecan Spectra Rainbow Plattenreader (Tecan, Maennedorf, Schweiz) durchgeführt. Dabei wurde der Messfilter auf 450 nm und der Referenzfilter auf 540 nm eingestellt. Die Werte wurden in eine Excel Tabelle überführt und eine Regressionsgerade der Standardkurve ermittelt, die zur Berechnung der Konzentrationen an sIL-6R verwendet wurde.

2.2.2.9 Kopplung von 4-11 Antikörpern an NHS (N-Hydroxysuccinimidyl)-Sephrose-Beads

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Jeder Zentrifugationsschritt wurde bei 500 g für 30 sec durchgeführt. 800 µl NHS-Sephrose (GE Healthcare, München) wurden mit 400 µg 4-11 Antikörper gekoppelt. Dazu wurden 800 µl NHS-Beads in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und die *Beads* pelletiert. Die NHS-Beads wurden durch zweimaliges Waschen mit 1 ml 1 mM HCl aktiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden 400 µl 4-11 Antikörperlösung (1 µg/µl) in PBS zugegeben und über Nacht bei konstanter Rotation in einem Überkopffrotator *Rotator SB2* (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Großbritannien) inkubiert. Die entstandenen 4-11-Beads wurden durch erneute Zentrifugation pelletiert und der Überstand dekantiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml Blockpuffer (siehe Tabelle 11) wurden die 4-11-Beads für mindestens 30 min bei konstanter Rotation in einem Überkopffrotator *Rotator SB2* (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Großbritannien) inkubiert. Anschließend wurden die 4-11-Beads zweimal in PBS gewaschen und in 800 µl PBS mit 0,05% (w/v) Tween 20 aufgenommen.

2.2.2.10 Immunpräzipitation des humanen sIL-6R aus Zellkulturüberständen zur Vorbereitung der massenspektrometrischen Untersuchungen

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C und jeder Zentrifugationsschritt bei 500 g für 30 sec durchgeführt. Die Präzipitation des sIL-6R wurde mit Hilfe der 4-11-Beads (Herstellung siehe Abschnitt 2.2.2.9) durchgeführt. Dazu wurden pro 1 ml Überstand 25 µl 4-11-Beads eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei konstanter Rotation in einem Überkopffrotator *Rotator SB2* (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Großbritannien). Am Folgetag wurden die NHS-Beads durch Zentrifugation pelletiert und fünfmal in PBS gewaschen. Das PBS wurde nach erneutem Zentrifugieren komplett entfernt und die NHS-Beads mit reduzierendem 2,5x Laemmli-Puffer komplett bedeckt und für 10 min bei 95°C aufgekocht. Anschließend wurden die gekochten 4-11-Beads 5 min auf Eis inkubiert und anschließend mittels erneuter Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur massenspektrometrischen Untersuchung des humanen sIL-6R wurde die Probe mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.2.2.4) aufgetrennt und die Probe zusätzlich mittels Western-Blot (siehe Abschnitt 2.2.2.6) analysiert. Die korrespondierende Bande im SDS-Gel, welche im Western Blot ein Signal für den sIL-6R zeigte, wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit ddH₂O bedeckt und massenspektrometrisch untersucht (siehe Abschnitt 2.2.2.14).

2.2.2.11 Immunpräzipitation des humanen sIL-6R aus Serum zur Vorbereitung der massenspektrometrischen Untersuchungen

Das Serum wurde aus humanem Vollblut mit der Hilfe von S-Monovetten (Sarsted, Nümbrecht) gewonnen. Dazu wurden die Monovetten nach der Blutentnahme mindestens fünfmal geschwenkt und bei Raumtemperatur für 10 min bei 2000 g zentrifugiert. Das Serum wurde vorsichtig mit einer 5 ml Pipette abgenommen, in ein Falcon Tube überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Das Serum wurde nach dem Auftauen bei 5000 g, 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues 50 ml-Falcon überführt. Da die im Serum enthaltenen Antikörper die massenspektrometrischen Untersuchungen stören, wurden sie mit der Hilfe von Protein G- und A-Agarose (Merck/Millipore, Darmstadt) entfernt. Dazu wurden pro ml Serum jeweils 20 µl Protein G- und A-Agarose zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei konstanter Rotation in einem Überkopffrotator *Rotator SB2* (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Großbritannien). Am Folgetag wurden die Agarose-Beads durch Zentrifugation pelletiert und das Serum vorsichtig in ein neues 50 ml-Falcon überführt. Die Immunpräzipitation des sIL-6R wurde anschließend wie in Abschnitt 2.2.2.10 beschrieben durchgeführt. Zur massenspektrometrischen Untersuchung des humanen sIL-6R aus Serum wurde nicht-reduzierender 2,5x Laemmli-puffer zum Aufkochen der 4-11-Beads verwendet.

2.2.2.12 Präzipitation des sIL-6R aus Zellkultur-Überständen zur Analyse des Ektodomänen Sheddings

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C, und jeder Zentrifugationsschritt bei 500 g für 30 sec durchgeführt. Zur Präzipitation des sIL-6R wurden die Zellkulturüberstände aus Abschnitt 2.2.3.3 mit 100 µl Concanavalin-A (ConA)-Sepharose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei konstanter Rotation in einem Überkopffrotator *Rotator SB2* (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Großbritannien). Am Folgetag wurden die ConA-Beads durch Zentrifugation pelletiert und zweimal in PBS gewaschen. Das PBS wurde nach erneutem Zentrifugieren komplett entfernt und die ConA-Beads mit reduziertem 2,5x Laemmli-puffer komplett bedeckt und für 10 min bei 95°C aufgekocht. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß 5 min auf Eis inkubiert und die ConA-Beads anschließend mittels Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und direkt auf die SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.2.2.4) geladen oder für spätere Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.13 Deglykosylierung des IL-6R

Der sIL-6R wurde mittels Immunpräzipitation, wie in Abschnitt 2.2.2.10 beschrieben aus 10 ml Zellkulturüberstand präzipitiert. Des Weiteren wurde der *full length* IL-6R aus Zelllysaten (Herstellung siehe Abschnitt 2.2.2.2) präzipitiert. Hierzu wurden 1 ml Zelllysate, welches aus jeweils einer 10 cm Schale mit cDNA vom hIL-6R transfizierten HEK293 Zellen gewonnen wurde, mit 200 µl 4-11-*Beads* versetzt. Anschließend wurde der *full length* IL-6R wie die Zellkulturüberstand in Abschnitt 2.2.2.10 präzipitiert.

Anschließend wurden die 4-11-*Beads*, die zur Präzipitation des sIL-6R aus Zellkulturüberständen und des *full length* IL-6R aus Zelllysaten benutzt wurden, viermal mit 1 ml PBS gewaschen. Die 4-11 NHS-*Beads* wurden durch Zentrifugation (500 g, 30 sec, 4 °C) pelletiert und nach Abnahme des PBS mit 74 µl ddH₂O, 10 µl G7 Puffer (aus dem Kit *Protein Deglycosylation Mix* von New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), 1 µl 10% (v/v) NP 40 und 2,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt und zur Elution des IL-6R für 10 min bei 95°C auf einem Thermoschüttler (Eppendorf AG, Hamburg) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben für 5 min auf Eis abgekühlt, die 4-11-*Beads* pelletiert (500 g, 30 sec, 4°C) und das Eluat in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Eluat wurde gemischt und gleichmäßig auf 3 Ansätze verteilt. Der erste Ansatz blieb unbehandelt, Ansatz 2 wurde mit 2 µl PNGase F (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) und Ansatz 3 mit 3 µl *Deglycosylation Mix* (aus dem Kit *Protein Deglycosylation Mix* New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) versetzt. Die Ansätze wurden bei 37°C über Nacht inkubiert und mittels Western Blot (siehe 2.2.2.6) analysiert.

2.2.2.14 Massenspektrometrische Untersuchungen

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden von Prasath Somasundaram (Institut für Experimentelle Medizin, AG Systematische Proteomics und Bioanalytik, Leitung Prof. Dr. Andreas Tholey) an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Hierzu wurden die Proben aus Abschnitt 2.2.2.10 und 2.2.2.11 mittels ¹⁸O-*Labeling* und LC-ESI-MS analysiert. Der angewendete Proteomic Workflow ist in Abbildung 25 und Abschnitt 3.9 beschrieben.

2.2.2.15 *In vitro* Cleavage Assay mit Glykopeptiden aus dem Stalk-Bereich des IL-6R

Zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße wurden mit 50 µl Peptid (50 µM), was in 25 mM HEPES-Puffer (pH 9.0) gelöst war, befüllt. 0,5 µl der rekombinanten katalytischen Domäne von ADAM17 (Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach) wurde zu einem Ansatz hinzugefügt, der andere Ansatz blieb unbehandelt. Alle Proben wurden für 16 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 1150 µl 0,1% TFA zu jeder Probe gegeben und die Proben wurden über der *reverse phase* (RP) Chromatographiesäule Multo High Bio-200-C18 (Chromatographie Service GmbH, Langerweh), unter Verwendung einer linearen Elution mit einem binären Lösungsmittelsystem, getrennt. Lösungsmittel A bestand aus 0,1% TFA und Lösungsmittel B aus 100% Acetonitril. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Nach der Peakintegration wurden die Peakflächen der geschnittenen und ungeschnittenen Peptide bei 214 nm bestimmt. Die Peakfläche des unbehandelten Peptids wurde bei der Auswertung auf 100% gesetzt.

2.2.3 Zellkultur

2.2.3.1 Kultivierung von HEK293 Zellen und Phoenix-Eco Zellen

HEK293 Zellen und Phoenix-Eco Zellen wurden in DMEM (+/+) bei 37°C, 5% CO₂ und 100% relative Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (NuAire US Autoflow, NuAire Inc., Plymouth, USA) kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80% durch Abspülen mit einer Stabpipette abgelöst und im Verhältnis 1:10 oder 1:20 in eine neue 10 cm-Schale mit 10 ml DMEM (+/+) überführt.

2.2.3.2 Transfektion von HEK293 Zellen und Phoenix-Eco Zellen

Zur Transfektion von HEK293 Zellen wurden 2×10^6 HEK293 Zellen in einer 10 cm-Petrischale mit 10 ml DMEM (+/+) ausgesät. Nach ca. 24 h wurden die Zellen mittels Polyethylenimin (PEI) mit 5 µg des entsprechenden DNA Plasmids transfiziert. Hierzu wurden zuerst 400 µl DMEM (-/-) und die Plasmid-DNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach der Zugabe von 15 µl PEI wurde der Transfektionsansatz gemischt und für ca. 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen getropft und die Zellen wieder unter Standardbedingungen kultiviert. Die *Shedding*-Experimente erfolgten nach weiteren 48 h, wie beschrieben in Abschnitt 2.2.3.3.

Zur Transfektion von Phoenix-Eco Zellen wurden 8×10^5 Phoenix-Eco Zellen in eine 6 Well Platte in 2 ml DMEM (+/+) ausgesät. Nach ca. 24 h wurden die Zellen mittels TurboFect (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt) transfiziert. Hierzu wurden zuerst 200 µl DMEM (-/-) und die Plasmid-DNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach der Zugabe von 2 µl

TurboFect wurde der Transfektionsansatz gemischt. Nach einer Inkubation von ca. 20 min bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen geträpelt. Die Überstände der transfizierten Phoenix-Eco Zellen wurden zur retroviralen Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen benutzt (siehe Abschnitt 2.2.3.5).

2.2.3.3 Analyse des Ektodomänen-*Sheddings* von HEK293 Zellen

Zur Bestimmung der absoluten Menge des IL-6R und der erstellten Mutanten im Überstand nach Stimulation mit *Phorbol-12-myristate-13-acetate* (PMA) oder Ionomycin (Iono) wurden 8×10^5 mit hIL-6R transfizierte HEK Zellen (Transfektion siehe Abschnitt 2.2.3.2) pro 6-Well-Platten in 2 ml DMEM (+/+) ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium vollständig abgesaugt. Wenn die Inhibitoren GI und GW (Iris Biotech GmbH, Marktredwitz) verwendet worden sind, so wurden diese in 1 ml DMEM (-/-) 30 min vor der Stimulation zugegeben. Nach Zugabe des ADAM17-Aktivators PMA (100 μ M) wurden die Zellen für 2 h inkubiert. Zellen, die mit dem ADAM10-Aktivator IO (1 μ M) stimuliert wurden, wurden für 30 min inkubiert. Anschließend wurde der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (8000 g, 15 min, 4°C), um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

Der Überstand wurde anschließend in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für weitere Analysen bei -20°C gelagert. Die in der 6-Well Schale verbliebenen Zellen wurden mit 1 ml eiskaltem PBS abgelöst und zentrifugiert (1000 g, 5 min, 4°C), bevor aus ihnen Zelllysate angefertigt wurden (siehe Abschnitt 2.2.2.2). Die absolute Menge an sIL-6R in den Überständen wurde mittels ELISA quantifiziert (siehe Abschnitt 2.2.2.8). Die Analyse mittels Western Blot (siehe Abschnitt 2.2.2.6) wurde nach einer Präzipitation des sIL-6R (siehe Abschnitt 2.2.2.10) durchgeführt.

2.2.3.4 Kultivierung von Ba/F3-gp130 Zellen

Die Ba/F3-gp130 Zellen wurden in DMEM (+/+) kultiviert, welches mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 versetzt war. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (NuAire US Autoflow, NuAire Inc., Plymouth, USA) in einer unbeschichteten 10 cm-Schale kultiviert und circa alle 5 Tage im Verhältnis 1:10000 passagiert. Ba/F3-gp130 Zellen, die mit cDNA für den humanen IL-6R stabil retroviral transduziert waren, wurden mit 10 ng/ml IL-6 anstatt 10 ng/ml Hyper-IL-6 kultiviert.

2.2.3.5 Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen

Zur retroviralen Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen wurde der Überstand von Phoenix-Eco-Zellen, die mit pMOWS-Plasmiden transfiziert wurden (siehe Abschnitt 2.2.3.2), verwendet. Hierzu wurde der Überstand zentrifugiert (1500 g, 10 min, RT) und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Ba/F3-gp130-Zellen wurden pelletiert (1000 g, 5 min, RT), einmal in PBS gewaschen und die Zellkonzentration auf 2×10^6 eingestellt. 50 μ l der Ba/F3-gp130-Zellen wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 250 μ l vom Überstand von Phoenix-Eco Zellen hinzugegeben. Nach der Zugabe von 3 μ l Polybren (f. c. 8 μ g/ml) wurden die Ba/F3-gp130 Zellen zentrifugiert (500 g, 2 h, 22°C). Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 5 ml DMEM (+/+) mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 in einer 6 Well Platte unter Standardbedingungen für 48 h inkubiert. Zur Selektion wurden die transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen für mindestens 2 Wochen mit Puromycin 1,5 μ g/ml kultiviert. Anschließend wurden die stabil transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen mit 10 ng/ml humanen IL-6 kultiviert.

2.2.3.6 Analyse des Ektodomänen-Sheddings von Ba/F3-gp130 Zellen

Der Inhalt einer vollen 10 cm Schale mit der zu untersuchenden stabil transduzierten Ba/F3-gp130-Zelllinie (siehe Abschnitt 2.2.3.5) wurde in ein 15 ml Falcon überführt und die Zellen wurden mittels Zentrifugation pelletiert (400 g, 10 min, RT). Anschließend wurden die Zellen drei Mal in PBS gewaschen und in 3 ml DMEM (-/-) aufgenommen. Zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße wurden mit 2×10^6 Zellen einer Ba/F3-gp130-Zelllinie befüllt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation pelletiert (400 g, 10 min, RT). Anschließend wurde ein Ansatz jeder Zelllinie in 1 ml DMEM (-/-) mit dem ADAM17-Aktivator PMA (100 μ M) und der andere Ansatz in 1 ml DMEM (-/-) mit 0,1% DMSO aufgenommen und in eine Vertiefung einer 12-Well Schale überführt. Die Inkubation erfolgte für 2 h unter Standardbedingungen. Anschließend wurde der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (8000 g, 15 min, 4°C), um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde anschließend in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für weitere Analysen bei -20°C gelagert. Die absolute Menge an sIL-6R in den Überständen wurde mittels ELISA quantifiziert (siehe Abschnitt 2.2.2.8).

2.2.3.7 Zellviabilitätsassay mit stabil transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen

Retroviral transduzierte Ba/F3-gp130-Zellen wurden dreimal mit 10 ml sterilem PBS gewaschen, gezählt und in DMEM (+/+) in einer Konzentration von 1×10^5 /ml resuspendiert. In jedes Well wurden 50 μ l der Zellsuspension vorgelegt (siehe Pipettierschema in Abbildung 8), sodass sich in jedem Well 5000 Zellen befanden. Die verschiedenen Zytokinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer seriellen Verdünnungsreihe hergestellt (siehe Abbildung 9) und jeweils 50 μ l von jeder Ver-

dünnungsstufe in das entsprechende Well gegeben (siehe finale Konzentration pro Well im Pipettierschema in Abbildung 8). Alle Werte wurden durch Dreifachbestimmung ermittelt.

Die Proliferation der retroviral transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen wurde mit Hilfe des *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* (Promega GmbH, Mannheim) nach Protokoll des Herstellers ermittelt und auf einem Lambda Fluoro 320 Fluorometer (exfilter 530/25, em-filter 590/35) detektiert. Die nach 0 min gemessenen Werte wurden zur Normalisierung von den nach 60 min gemessenen Werten subtrahiert und als RLU (*relative light units*) angegeben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HylL-6 0 ng/ml	HylL-6 0 ng/ml	HylL-6 0 ng/ml	IL-6 0 ng/ml	IL-6 0 ng/ml	IL-6 0 ng/ml	HylL-6 0 ng/ml	HylL-6 0 ng/ml	HylL-6 0 ng/ml	IL-6 0 ng/ml	IL-6 0 ng/ml	IL-6 0 ng/ml
B	HylL-6 0,01 ng/ml	HylL-6 0,01 ng/ml	HylL-6 0,01 ng/ml	IL-6 0,01 ng/ml	IL-6 0,01 ng/ml	IL-6 0,01 ng/ml	HylL-6 0,01 ng/ml	HylL-6 0,01 ng/ml	HylL-6 0,01 ng/ml	IL-6 0,01 ng/ml	IL-6 0,01 ng/ml	IL-6 0,01 ng/ml
C	HylL-6 0,1 ng/ml	HylL-6 0,1 ng/ml	HylL-6 0,1 ng/ml	IL-6 0,1 ng/ml	IL-6 0,1 ng/ml	IL-6 0,1 ng/ml	HylL-6 0,1 ng/ml	HylL-6 0,1 ng/ml	HylL-6 0,1 ng/ml	IL-6 0,1 ng/ml	IL-6 0,1 ng/ml	IL-6 0,1 ng/ml
D	HylL-6 1 ng/ml	HylL-6 1 ng/ml	HylL-6 1 ng/ml	IL-6 1 ng/ml	IL-6 1 ng/ml	IL-6 1 ng/ml	HylL-6 1 ng/ml	HylL-6 1 ng/ml	HylL-6 1 ng/ml	IL-6 1 ng/ml	IL-6 1 ng/ml	IL-6 1 ng/ml
E	HylL-6 10 ng/ml	HylL-6 10 ng/ml	HylL-6 10 ng/ml	IL-6 10 ng/ml	IL-6 10 ng/ml	IL-6 10 ng/ml	HylL-6 10 ng/ml	HylL-6 10 ng/ml	HylL-6 10 ng/ml	IL-6 10 ng/ml	IL-6 10 ng/ml	IL-6 10 ng/ml
F	HylL-6 100 ng/ml	HylL-6 100 ng/ml	HylL-6 100 ng/ml	IL-6 100 ng/ml	IL-6 100 ng/ml	IL-6 100 ng/ml	HylL-6 100 ng/ml	HylL-6 100 ng/ml	HylL-6 100 ng/ml	IL-6 100 ng/ml	IL-6 100 ng/ml	IL-6 100 ng/ml
G	Zelllinie 1 						Zelllinie 2 					
H												

Abbildung 8: Pipettierschema für den Zellviabilitätsassay.

- 
- 1) 2 µl Stock + 998 µl DEMEM -> 200 ng/ml
 - 2) 100 µl 1 + 900 µl DEMEM -> 20 ng/ml
 - 3) 100 µl 2 + 900 µl DEMEM -> 2 ng/ml
 - 4) 100 µl 3 + 900 µl DEMEM -> 0,2 ng/ml
 - 5) 100 µl 4 + 900 µl DEMEM -> 0,02 ng/ml
 - 6) 1000 µl DEMEM -> 0 ng/ml

Abbildung 9: Serielle Verdünnungsreihe der Zytokine für den Zellviabilitätsassay.

2.2.3.8 Kultivierung von HEK293-EBNA Zellen

HEK293-EBNA Zellen wurden in DMEM (+/+) (Biochrom, Berlin) bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80% durch Abspülen mit einer Stabpipette abgelöst und im Verhältnis 1:10 oder 1:20 in eine neue 10 cm-Schale mit 10 ml Kulturmedium überführt.

2.2.3.9 Stabile Transfektion von HEK293-EBNA Zellen

Zur Transfektion von EBNA Zellen mit der cDNA, die für die Isoform 2 des humanen IL-6R (ds-sIL-6R) kodiert, wurden 2×10^6 EBNA Zellen in einer 10 cm-Petrischale mit 10 ml DMEM (+/+) (Biochrom, Berlin) ausgesät. Nach ca. 24 h wurden die Zellen mittels Polyethylenimin (PEI) mit 5 µg des Plasmids pcDNA3.1-hIL-6R_Iso2-His transfiziert. Hierzu wurden zuerst 400 µl DMEM (-/-) und die Plasmid-DNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach der Zugabe von 15 µl PEI wurde der Transfektionsansatz gemischt, für ca. 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen getropft. Die Zellen wurden für 48 h unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurde zur Selektion von stabil transfizierten Zellen dem DMEM (+/+) 0,25 mg/ml G418 und 1 µg/ml Puromycin zugegeben. Nach einer Selektionsdauer von circa 3 Wochen wurden die stabil transfizierten EBNA Zellen zur Proteinproduktion eingesetzt.

2.3 Expression und Reinigung der alternativ gespleißten Form des IL-6R (ds-sIL-6R)

Zur Quantifizierung des ds-IL-6R mittels ELISA wurde das rekombinante Protein für die Erstellung der Standardreihe benötigt. Zur Produktion des ds-sIL-6R (Isoform 2 des hIL-6R) wurden 4×10^6 stabil transfizierte EBNA Zellen (Herstellung siehe Abschnitt 2.2.3.9) in 20 ml DMEM (+/+) (Biochrom, Berlin) mit 0,25 mg/ml G418 und 1 µg/ml Puromycin in einer 175 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Als die Zellen eine Konfluenz von 100% erreicht hatten, wurde das Medium abgesaugt und durch Expressionsmedium, bestehend aus DMEM (Biochrom, Berlin) mit 0,25 mg/ml G418, 1 µg/ml Puromycin und 5% (v/v) *Ultra Low IgG FC* (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach), ersetzt. Das Expressionsmedium wurde zweimal pro Woche durch frisches Medium ersetzt und der abgenommene Zellkulturüberstand wurde mit einem Faltenfilter und anschließender Vakuumfiltration (Porengröße des Filters 22 µm) gereinigt. Nach Entgasung wurde der gereinigte Zellkulturüberstand mit einer Äkta Purifier (GE Healthcare, München) auf eine His-TrapTM FF Crude Säule (GE Healthcare, München) gegeben. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte stufenweise mit 50 mM Imidazol in PBS und 100 mM Imidazol in PBS. Anschließend wurden die Fraktionen mit gleicher Imidazolkonzentration, die im Chromatogramm eine hohe Absorption bei 280 nm aufwiesen, vereint und das darin enthaltene Protein mit einer Größenausschlusschromatographie über eine Superdex 200 Säule (GE Healthcare, München) gereinigt. Die Fraktionen, die im Größenausschlusschromatogramm eine hohe Absorption bei 280 nm aufwiesen, wurden vereint.

2.3.1 Statistische Analyse

Soweit nicht anders angegeben entsprechen die Werte dem Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) aus 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des ungepaarten Student's t Test (Microsoft Excel) durchgeführt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen (Kennzeichnung mit einem *).

3 ERGEBNISSE

Der Inhalt dieses Kapitels und der Diskussion stammt größtenteils aus den Veröffentlichungen (Riethmueller et al. 2016a) und (Riethmueller et al. 2016b). Wenn andere Personen außer mir bei der Generierung der Daten involviert waren, ist dies vermerkt.

3.1 Der IL-6R enthält ein Triple-Serin (3S)-Motiv in unmittelbarer Nähe der ADAM17-Schnittstelle

Wie in Abschnitt 1.7 beschrieben weisen die ADAM17 Substrate TNF α und CD163 ein Triple-Serin-(3S)-Motiv, das eine zentrale Rolle für ADAM17-vermittelte Proteolyse einnimmt, in ihren membranproximalen Stalk-Bereichen auf. Um festzustellen, ob eine ähnliche Sequenz im IL-6R zu finden ist, wurde ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des membranproximalen Stalk-Bereichs von TNF α , CD163 und dem IL-6R angefertigt (siehe Abbildung 10A). Daraus geht hervor, dass sich ein 3S-Motiv in dem membranproximalen Stalk-Bereich des IL-6R (S359-S361) befindet. Im Gegensatz zu TNF α und CD163 wird dieses nicht durch zwei Arginine flankiert, ist aber in einer vergleichbaren Nähe zur Plasmamembran positioniert (siehe Abbildung 10A). Das 3S-Motiv des IL-6R befindet sich in unmittelbarer Nähe der von Müllberg et al. 1994 beschriebenen ADAM17-Schnittstelle (Q357/D358), was den Positionen P2', P3' und P4' entspricht (siehe Abbildung 10B).

Um die ADAM17-vermittelte Proteolyse sowie die Interaktion von ADAM17 und dem IL-6R zu untersuchen, wurde ein Struktur-Modell der katalytischen Domäne von ADAM17 erstellt, an das ein Peptid aus sieben Aminosäuren gebunden ist, das dem Stalk-Bereich des IL-6R entnommen ist (QDSSSVP). Dieses enthält neben der ADAM17-Schnittstelle (Müllberg et al. 1994) auch das 3S-Motiv (siehe Abbildung 10C,D). Hierbei zeigte sich, dass Q357 und D358 in Kombination mit dem 3S-Motiv eine hydrophile Region innerhalb des IL-6R-Stalk-Bereichs bilden. Eine Deletion des 3S-Motivs würde wahrscheinlich die Interaktion des IL-6R mit der hydrophilen Umgebung der katalytischen Domäne von ADAM17 und folglich die Proteolyse des IL-6R reduzieren (siehe Abbildung 10E).

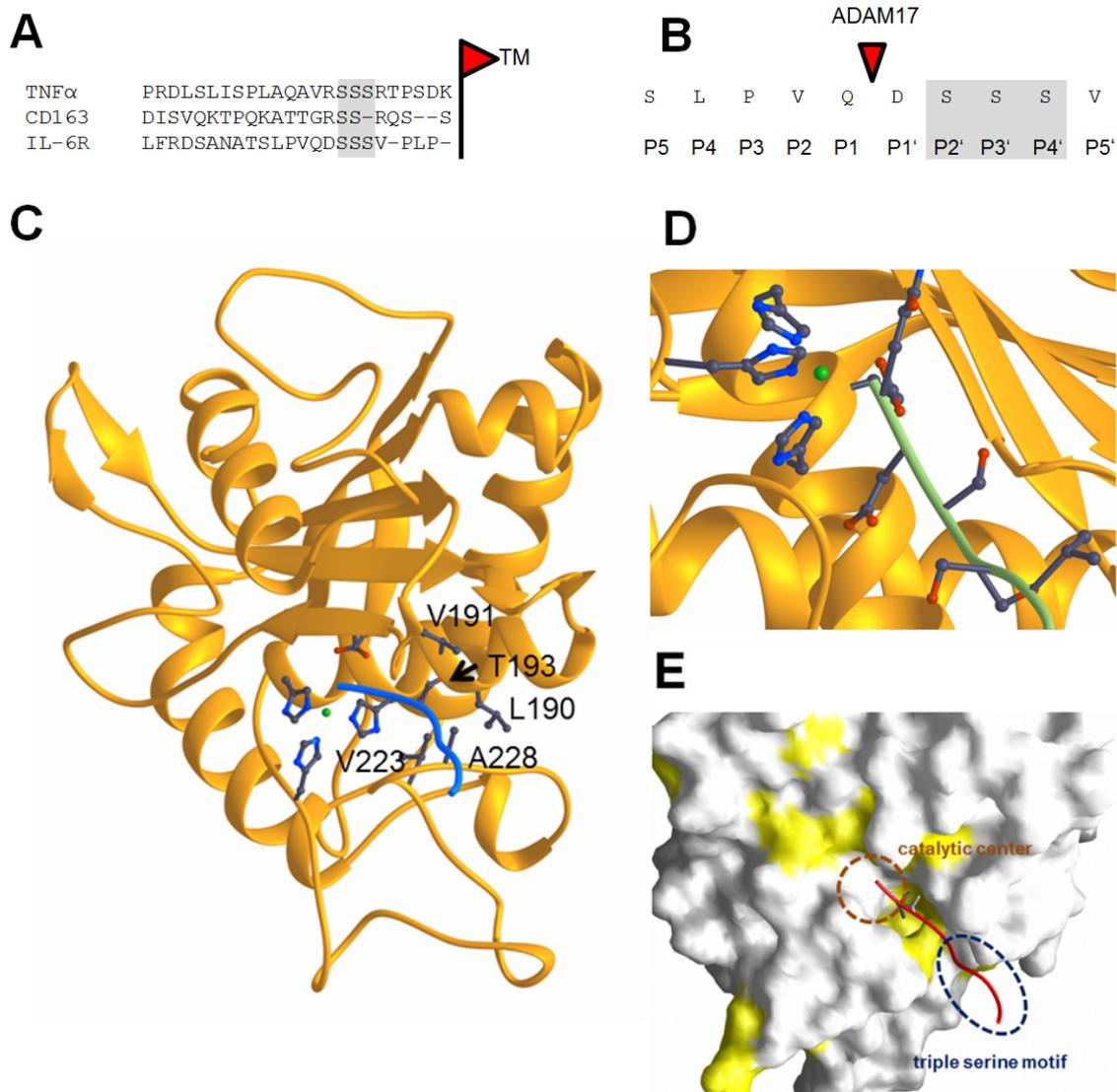


Abbildung 10: Der Stalk-Bereich des IL-6R beinhaltet ein 3S-Motiv in unmittelbarer Nähe der von Müllberg et al. 1994 veröffentlichten ADAM17-Schnittstelle.

(A) Alignment der Aminosäuresequenzen des membranproximalen Stalk-Bereichs von TNF α , CD163 (modifiziert nach Etzerodt et al. 2014) und dem IL-6R. Das Serin-reiche Motiv in den drei Proteinen ist grau hinterlegt und der Beginn der Transmembran-Region ist anhand einer vertikalen schwarzen Linie dargestellt. (B) Darstellung der fünf *non-prime*- und *prime sites* der ADAM17-Schnittstelle des IL-6R nach Müllberg et al. (Müllberg et al. 1994). Das 3S-Motiv ist grau hinterlegt. (C) Basierend auf der bekannten Struktur der katalytischen Domäne von ADAM17 in Komplex mit dem *tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP3)* (Wisniewska et al. 2008) wurde ein Modell der katalytischen Domäne von ADAM17 (orange) in Komplex mit den korrespondierenden Aminosäureresten des Stalk-Bereichs (blau) des IL-6R erstellt. Entscheidende Aminosäuren der katalytischen Domäne von ADAM17 sind hervorgehoben. (D) Darstellung des Nahbereichs der katalytischen Domäne von ADAM17. Das IL-6R-Peptid QDSSSV ist in grün dargestellt. (E) Hydrophobe Bereiche der Oberfläche der katalytischen Domäne von ADAM17 (gelb). Das IL-6R-Peptid ist in rot dargestellt. Die Modelle in den Abbildungen C, D und E wurden von Prof. Dr. Joachim Grötzinger vom Biochemischen Institut an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt.

3.2 Generierung von Expressionsplasmiden zur Untersuchung des Einflusses des (3S)-Motivs des IL-6R

Um den Einfluss des (3S)-Motivs auf die Prozessierung des IL-6R zu untersuchen, wurden zunächst Expressionsplasmide zur Transfektion von humanen Zelllinien generiert. Zu Beginn dieser Arbeit war der Vektor pcDNA3.1-hIL-6R (siehe Abschnitt 2.1.8) vorhanden. Die Inserts für die Varianten IL-6R Δ S359-S361, IL-6R_AAA und IL-6R_EKK wurden mittels SOE-PCR (siehe Abschnitt 2.2.1.2) unter Verwendung von spezifischen Primern (siehe 2.1.7) erstellt (siehe Abbildung 11). Anschließend wurden die Inserts über eine DNA-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.1.6) aufgetrennt und extrahiert (siehe Abschnitt 2.2.1.7). Die Inserts und der pcDNA3.1-hIL-6R-Vektor wurden anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *Bsu36I* und *NotI* wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben enzymatisch gespalten (siehe Abbildung 11) und anschließend über eine DNA-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.1.6) aufgetrennt und extrahiert (siehe Abschnitt 2.2.1.7).

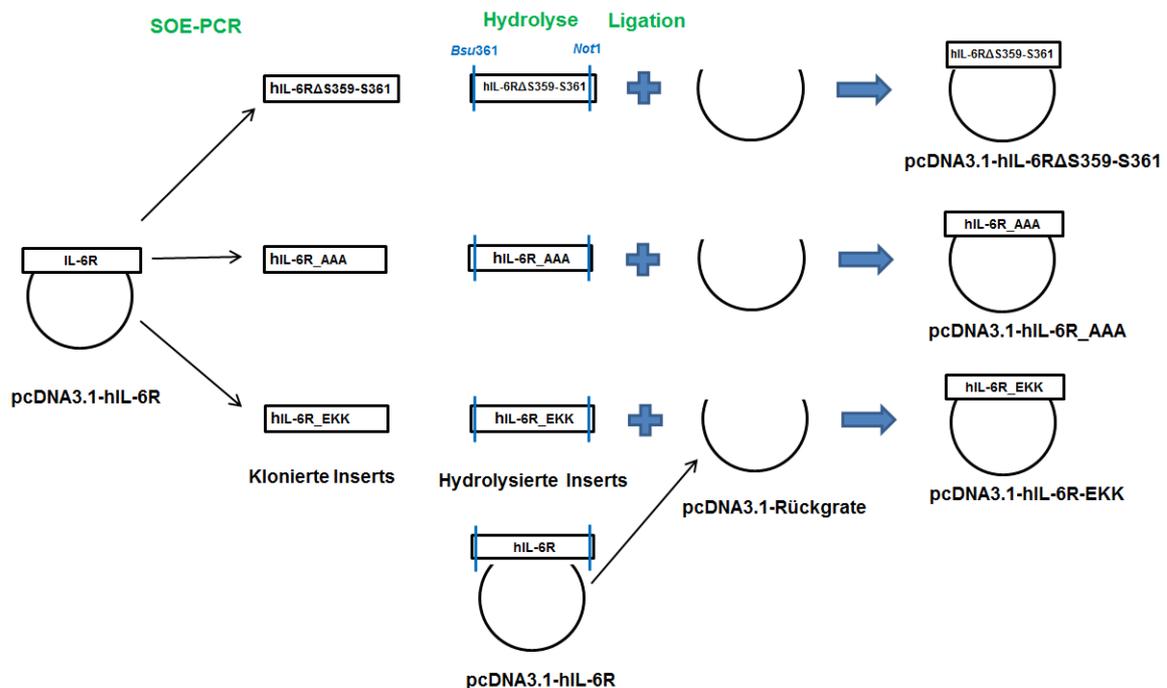


Abbildung 11: Generierung von pcDNA3.1-Expressionsplasmiden für Varianten des humanen IL-6R zur Untersuchung des Einflusses des 3S-Motivs.

Die Inserts für die verschiedenen Varianten des hIL-6R wurden mittels SOE-PCR unter Verwendung spezifischer Primer generiert. Der Vektor pcDNA3.1-hIL-6R diente hierbei als *template* für die SOE-PCR. Anschließend wurde der pcDNA3.1-hIL-6R-Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *Bsu36I* und *NotI* enzymatisch gespalten und die Inserts mit dem pcDNA3.1-Rückgrat ligiert.

Die gespaltenen Inserts wurden anschließend in das linearisierte und dephosphorylierte Rückgrat des pcDNA3.1-hIL-6R-Vektors mittels DNA-Ligation (siehe Abschnitt 2.2.1.9) eingefügt (siehe Abbildung 11). Die so entstandenen Plasmide wurden pcDNA3.1-hIL-6R Δ S359-S361, pcDNA3.1-hIL-6R_AAA und pcDNA3.1-hIL-6R_EKK benannt (siehe Abbildung 11).

Für die retrovirale Transduktion von murinen Zellen wurden die generierten Inserts in den pMOWS-Vektor subkloniert (Ketteler et al. 2002). Im ersten Schritt wurde das Insert für den IL-6R aus dem pcDNA3.1-hIL-6R-Vektor in den pMOWS-Vektor eingebracht (siehe Abbildung 12). Hierzu wurde der pMOWS-Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*MI wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben enzymatisch gespalten und anschließend über eine DNA-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.1.6) aufgetrennt und extrahiert (siehe Abschnitt 2.2.1.7A). Anschließend wurde das pMOWS-Rückgrat mit Klenow-Fragment behandelt (siehe Abschnitt 2.2.1.4), um glatte Enden zu erzeugen. Das pMOWS-Rückgrat wurde anschließend mit FastAP dephosphoryliert (siehe Abschnitt 2.2.1.5). Der pcDNA3.1-hIL-6R-Vektor wurde mit der Restriktionsendonuklease *Mss*I, die jeweils einmal vor und nach dem hIL-6R-Insert schneidet und glatte Enden erzeugt, enzymatisch gespalten und das erhaltene Insert wie oben beschrieben isoliert und gereinigt. Die Ligation von hIL-6R-Insert und pMOWS-Rückgrat führte zur Erstellung des pMOWS-hIL-6R-Vektors, der wie oben beschrieben vervielfältigt und gereinigt wurde (siehe Abbildung 12A).

Im zweiten Schritt wurden das generierte Insert-hIL-6R Δ S359-S361 aus dem pcDNA3.1-hIL-6R Δ S359-S361-Vektor in den pMOWS-hIL-6R-Vektor subkloniert (siehe Abbildung 12B). Hierzu wurde der Vektor pcDNA3.1-hIL-6R Δ S359-S361 und der bereits hergestellte pMOWS-hIL-6R-Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *Sbf*I und *Age*I enzymatisch gespalten (siehe Abschnitt 2.2.1.3), über eine DNA-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.1.6) aufgetrennt und extrahiert (siehe Abschnitt 2.2.1.7). Anschließend wurde das Insert hIL-6R Δ S359-S361 mit dem Rückgrat des verdauten pMOWS-hIL-6R ligiert. Der so entstandene Vektor wurde wie oben beschrieben vervielfältigt, gereinigt und pMOWS-hIL-6R Δ S359-S361 genannt (siehe Abbildung 12B).

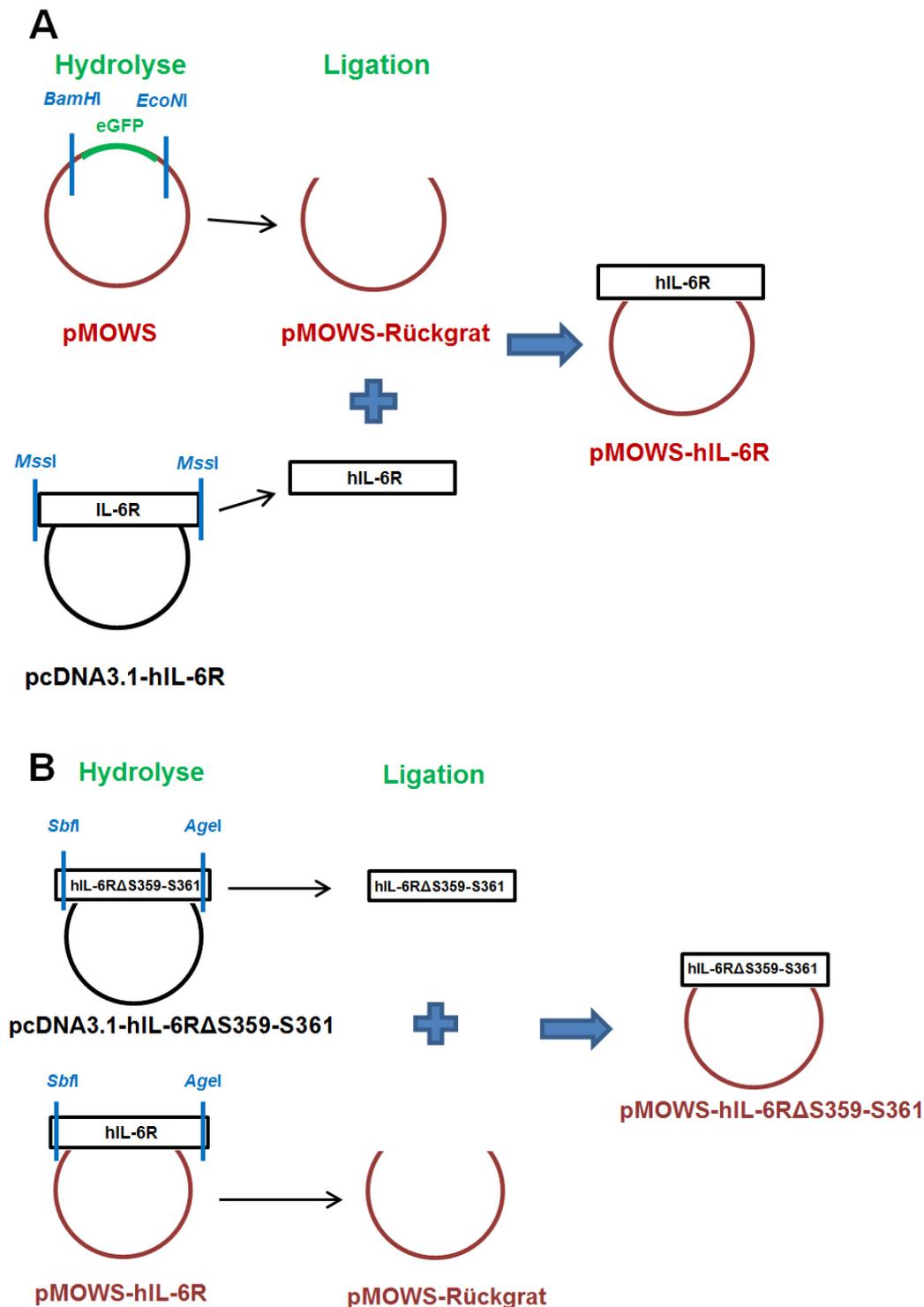


Abbildung 12: Generierung von pMOWS-Expressionsplasmiden der Varianten des humanen IL-6R zur Untersuchung des Einflusses des 3S-Motivs des IL-6R.

(A) Der pMOWS-Vektor wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*NI enzymatisch gespalten und das pMOWS-Rückgrat wurde anschließend mit Klenow-Fragment behandelt, um glatte Enden zu erzeugen. Das Insert des pcDNA3.1-hIL-6R-Vektors wurde mit der Restriktionsendonuklease *M*ssI ausgeschnitten und mit dem pMOWS-Rückgrat ligiert, um den pMOWS-hIL-6R-Vektor zu erhalten.

(B) Das generierte Insert hIL-6RΔS359-S361 aus dem pcDNA3.1-hIL-6RΔS359-S361-Vektor wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *S*bfI und *A*geI in den pMOWS-hIL-6R-Vektor subkloniert.

3.3 Die Deletion des 3S-Motivs führt zum Verlust der Proteolyse des IL-6R durch ADAM17

Um die Rolle des 3S-Motivs bei der Proteolyse des IL-6R durch ADAM17 zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen transient mit cDNAs transfiziert, die für den unveränderten IL-6R oder die 3S-Deletionsvariante (IL-6R Δ S359_S361) kodieren. Als Negativkontrolle wurden HEK293-Zellen mit der Variante IL-6R Δ S353_V362 transfiziert, bei der keine Prozessierung durch ADAM17 beobachtet werden konnte (Baran et al. 2013).

Zuerst wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht, ob alle drei verwendeten Varianten gleichmäßig auf der Zelloberfläche exprimiert sind. Hierbei wurde deutlich, dass alle Varianten inklusive der Negativkontrolle eine messbare Oberflächenexpression aufweisen (siehe Abbildung 13). Hieraus lässt sich schließen, dass das 3S-Motiv nicht für die intrazelluläre Sortierung und den Transport des Rezeptors an die Zelloberfläche wichtig ist. Diese Beobachtung steht im Einklang mit bereits veröffentlichten Ergebnissen, die zeigten, dass eine Deletion von mehreren Aminosäuren im Stalk-Bereich keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression des Rezeptors hat (Müllberg et al. 1994; Baran et al. 2013).

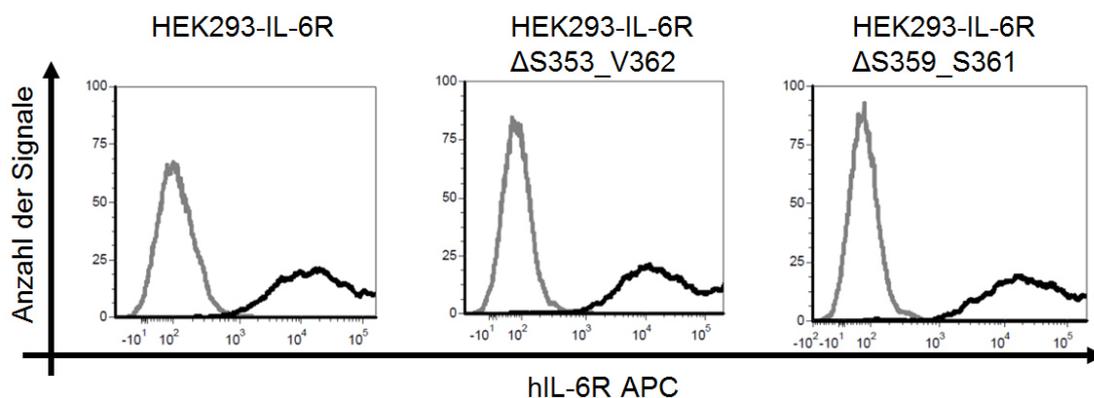


Abbildung 13: Oberflächenexpression der 3S-Deletions-Varianten des IL-6R.

HEK293-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden, die entweder für den unveränderten humanen IL-6R, den humanen IL-6R Δ S359_S361 oder den humanen IL-6R Δ S353_V362 kodieren, transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde die Oberflächenexpression der drei Varianten mittels Durchflusszytometrie, unter Verwendung eines APC-gekoppelten Sekundärantikörpers (Anti-mouse-APC), der den Fc Teil des gebundenen 4-11 Antikörpers erkennt, analysiert. Die Färbung der Negativkontrolle, bei der nur der APC-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet wurde, ist in grau dargestellt. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Nachdem die gleichmäßige Oberflächenexpression bestätigt werden konnte, wurde das ADAM17-vermittelte Shedding der drei IL-6R-Varianten untersucht. Hierzu wurden transient transfizierte HEK293-Zellen zwei Stunden mit dem ADAM17-Aktivator PMA behandelt. Die Quantifizierung des sIL-6R in den Zellkulturüberständen mittels ELISA (siehe Abbildung 14A) zeigte einen deutlichen Anstieg der sIL-6R Konzentration nach PMA-Stimulation. Dieser Anstieg im Vergleich zur DMSO-Kontrolle konnte ebenfalls mittels Western Blot detektiert werden (siehe Abbildung 14A). Die Behandlung mit dem ADAM10- und ADAM17-spezifischen Inhibitor GW 30 min vor der Stimulation verhinderte eine PMA-induzierte Proteolyse des IL-6R (siehe Abbildung 14A). Nach der Behandlung mit dem ADAM10-spezifischen Inhibitor GI wurde kein signifikanter Effekt verzeichnet (siehe Abbildung 14A), was bereits veröffentlichte Studien bestätigt, die ADAM17 als PMA-induzierbare Sheddase des IL-6R beschreiben (Müllberg et al. 1993; Müllberg et al. 1994; Garbers et al. 2011; Baran et al. 2013).

Die Behandlung der HEK293-Zellen mit dem Ionophor Ionomycin aktiviert ADAM10-vermitteltes Shedding des IL-6R (Jones et al. 1998; Garbers et al. 2011; Baran et al. 2013), was ebenfalls in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Tatsächlich führt die Behandlung von HEK293-Zellen, die mit der cDNA für den IL-6R transfiziert wurden, nach Ionomycin-Stimulation zu einer erhöhten sIL-6R-Entstehung (siehe Abbildung 14B). Dieser Anstieg konnte gleichermaßen mit GI und GW blockiert werden (siehe Abbildung 14B). ADAM17 schneidet den IL-6R zwischen Q357 und D358 im Stalk-Bereich (Müllberg et al. 1994) und die Deletion von zehn Aminosäuren zwischen S353 und V362 verhindert ADAM17-vermittelte Proteolyse des IL-6R (Müllberg et al. 1994; Baran et al. 2013).

Um das Shedding der drei untersuchten Varianten besser vergleichen zu können, wurde die Menge an sIL-6R im Überstand nach PMA-Stimulation von HEK293-Zellen, die mit der cDNA für den unveränderten IL-6R transfiziert wurden, auf 100% gesetzt (siehe Abbildung 14 und Baran et al. 2013) und alle anderen Werte dementsprechend berechnet. Tatsächlich führte die PMA-Behandlung von HEK293-IL-6R Δ S353_V362-Zellen zu einer stark reduzierten sIL-6R-Entstehung von nur $19,7 \pm 10,3\%$ im Vergleich zu den HEK293-IL-6R-Zellen (siehe Abbildung 14E). Die Vorbehandlung mit GI und GW reduzierte die sIL-6R Entstehung weiter, was darauf schließen lässt, dass ADAM10 noch in der Lage ist, die Δ S353_V362-Variante des IL-6R konstitutiv zu shedden (siehe Abbildung 14E). Diese Aussage wird durch die Erkenntnis unterstützt, dass die HEK293-IL-6R Δ S353_V362-Zellen nach Ionomycin-Stimulation eine verstärkte sIL-6R-Entstehung im Überstand im Vergleich zur PMA stimulierten Probe aufwiesen (siehe Abbildung 14D).

Um die Rolle des 3S-Motivs auf die ADAM10 und ADAM17-vermittelte Proteolyse des IL-6R zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit der cDNA transfiziert, die für die IL-6R Δ S359_S361-Variante kodiert. Behandlung der Zellen mit PMA führte zu nur $25,0 \pm 7,2\%$ sIL-6R-Entstehung im Vergleich zum unveränderten IL-6R (siehe Abbildung 14E). Diese Beobachtung konnte mittels Western Blot Analyse verifiziert werden, da nur ein geringer Anstieg der sIL-6R-Entstehung nach PMA Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle verzeichnet wurde (siehe Abbildung 14E).

Wie ebenfalls für die Δ S353_V362-Variante gezeigt werden konnte, sorgte die Vorbehandlung mit GI oder GW für eine nur geringfügige Reduzierung des IL-6R Sheddings (siehe Abbildung 14E), was allerdings nicht in der Western Blot Analyse bestätigt werden konnte. Die IL-6R- Δ S353_V362-Variante (siehe Abbildung 14D), wurde weiterhin von ADAM10 prozessiert, allerdings etwas geringer als der unveränderte IL-6R ($59.2 \pm 13.0\%$, siehe Abbildung 14F), was die grundlegenden Unterschiede zwischen ADAM10- und ADAM17-vermitteltem Shedding des IL-6R verdeutlicht.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Deletion des 3S-Motivs das ADAM17-vermittelte Shedding des IL-6R effektiv verhindert, während ADAM10 weiterhin in der Lage ist diese Variante des IL-6R zu prozessieren. Die Deletion von 10 Aminosäuren des Stalk-Bereichs (IL-6R- Δ S353_V362-Variante) inklusive der ADAM17 Schnittstelle (Müllberg et al. 1994) verhindert die Prozessierung durch ADAM17, während die ADAM10-vermittelte Proteolyse partiell intakt bleibt. Daraus lässt sich folgern, dass das 3S-Motiv eine wichtige Rolle bei der Erkennung oder der Proteolyse des IL-6R durch ADAM17 spielt.

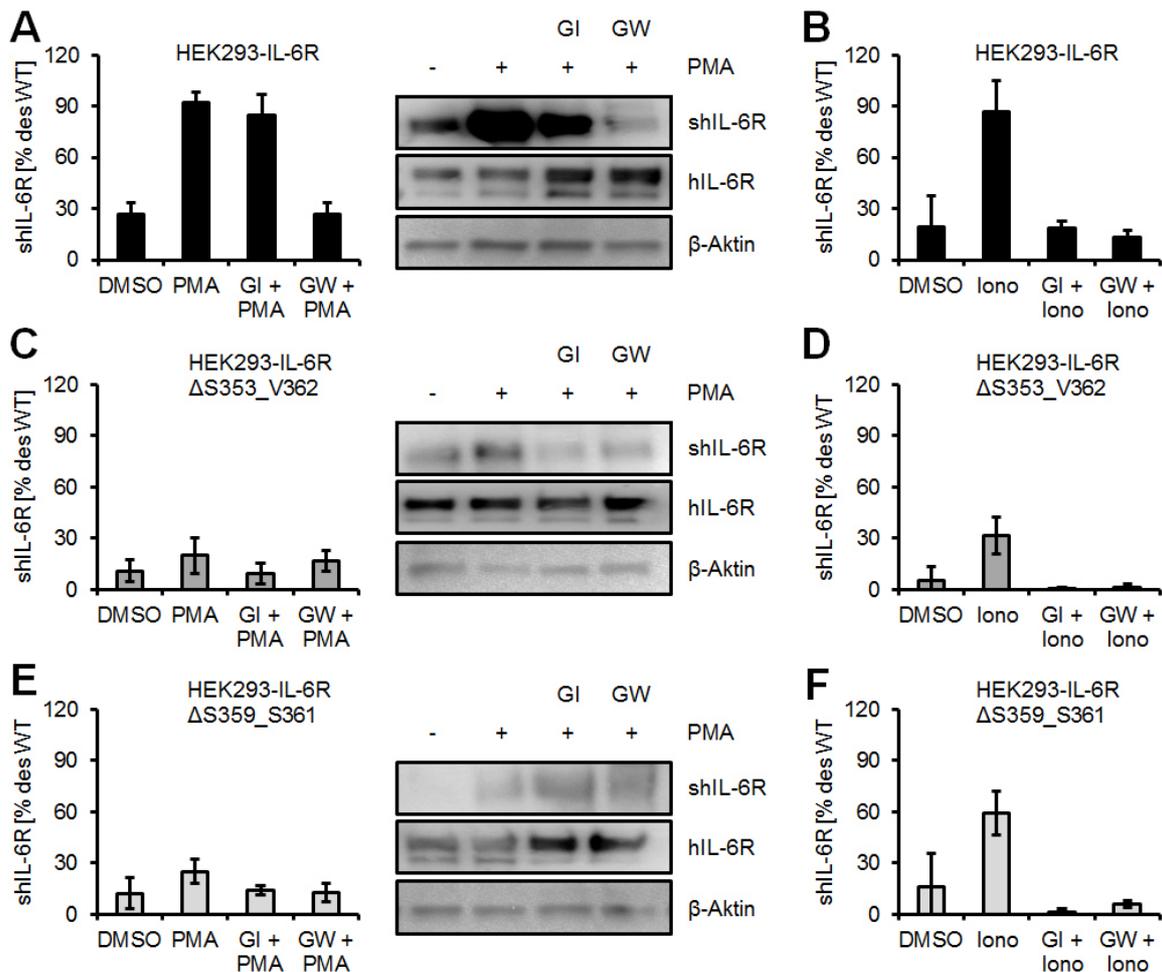


Abbildung 14: Untersuchung des Einflusses der Deletion des 3S-Motivs auf die ADAM10- und ADAM17-vermittelte Proteolyse des IL-6R.

(A) HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid transfiziert, das für den humanen IL-6R kodiert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 2 Stunden mit PMA (100 nM) oder DMSO als Negativkontrolle behandelt. Zuvor wurden die Zellen 30 min mit den Inhibitoren GI und GW behandelt. Die Entstehung des sIL-6R im Überstand wurde mittels ELISA oder Western Blot nach Präzipitation des sIL-6R bestimmt. Die Zellen wurden nach der Stimulation lysiert und die Expression des IL-6R ebenfalls mittels Western Blot analysiert. Hierbei diente die Detektion von dem endogenen und ubiquitär exprimierten Protein β -Aktin als Ladekontrolle. (B) HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid, das für den humanen IL-6R kodiert, transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 Minuten mit Ionomycin (1 μ M) oder DMSO als Negativkontrolle behandelt. Die Entstehung des sIL-6R im Überstand wurde mittels ELISA analysiert. (C, D) Das Experiment wurde wie in Sektion A und B durchgeführt, allerdings wurden hier die Zellen mit dem pcDNA3.1-IL-6R Δ S353_V362 transfiziert. (E, F) Das Experiment wurde wie in Sektion A und B durchgeführt, allerdings wurden hier die Zellen mit dem Expressionsplasmid pcDNA3.1-IL-6R Δ S359_S361 transfiziert. Die Western Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. Die ELISA-Ergebnisse zeigen den Mittelwert (\pm S. D.) von drei unabhängigen Experimenten. Für die Berechnung der Prozentwerte wurde die sIL-6R-Konzentration im Überstand von HEK293-IL-6R Zellen nach PMA-Stimulation (siehe Sektion A) auf 100% gesetzt.

3.4 Die Mutation des 3S-Motivs führt nicht zur Blockade der ADAM10- und ADAM17-vermittelten Proteolyse des IL-6R

Die Deletion des 3S-Motivs stört nicht nur die hydrophile Interaktion zwischen dem IL-6R und ADAM17 (siehe Abbildung 10E), sondern es reduziert zudem die Distanz zwischen der Schnittstelle Q357/D358 und der Plasmamembran. Die Schnittstelle ist sechs Aminosäuren von der Membran entfernt, was circa einer Distanz von 22,8 Å (3,8 Å pro Aminosäurerest) entspricht. Die verminderte Proteolyse des IL-6R Δ S359_S361 (siehe Abbildung 14E) kann daher entweder ein direkter Effekt des Verlustes des 3S-Motivs sein, oder aber durch sterische Behinderung zwischen ADAM17 und seinem Substrat begründet sein. Um dies weiter zu untersuchen, wurde das 3S-Motiv durch drei Alanine ersetzt (IL-6R_AAA), da diese 3 Aminosäuren an Position P3', P4' und P5' von ADAM17-Schnittstellen favorisiert sind (Tucher et al. 2014). Des Weiteren wurde das 3S-Motiv durch eine Glutaminsäure gefolgt von zwei Lysinen substituiert (IL-6R_EKK), da diese Aminosäurereste laut Tucher et al. unerwünscht an Position P3', P4' und P5' von ADAM17-Schnittstellen sind (Tucher et al. 2014). Demzufolge würde ein direkter Effekt des 3S-Motivs bei der IL-6R_EKK-Variante verloren gehen.

HEK293-Zellen wurden transient mit cDNA, die für beide Varianten (IL-6R_AAA und IL-6R_EKK) kodieren, transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurde eine gleichmäßige Oberflächenexpression beider Varianten mittels Durchflusszytometrie bestimmt (siehe Abbildung 15).

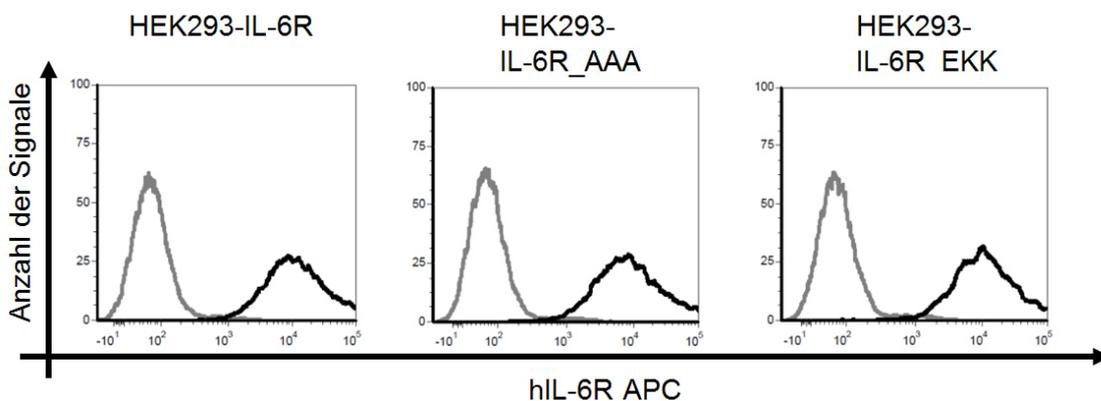


Abbildung 15: Oberflächenexpression der 3S-Substitutions-Varianten des IL-6R.

HEK293-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden, die entweder für den unveränderten humanen IL-6R, den humanen IL-6R_AAA oder den humanen IL-6R_EKK kodieren, transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Oberflächenexpression der drei Varianten mittels Durchflusszytometrie, unter Verwendung eines APC-gekoppelten Sekundärantikörpers (Anti-mouse-APC), der den Fc Teil des gebundenen 4-11 Antikörpers erkennt, analysiert. Die Färbung der Negativkontrolle, bei der nur der APC-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet worden ist, ist in grau dargestellt. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Die PMA-induzierte Proteolyse war im Vergleich zum unveränderten IL-6R im Grunde genommen in der IL-6R_AAA-Variante ($82,96 \pm 20,92\%$ siehe Abbildung 16A) und in der IL-6R_EKK-Variante ($98,33 \pm 15,21\%$ siehe Abbildung 16B) unverändert. Erneut verhinderte nur die Vorbehandlung mit GW das IL-6R Shedding (siehe Abbildung 16A,B). Die Proteolyse blieb im Vergleich zum unveränderten IL-6R ebenfalls unverändert, nachdem beide Varianten mit Ionomycin stimuliert wurden, um die Proteolyse durch ADAM10 zu untersuchen ($87,32 \pm 9,72\%$ und $102,74 \pm 27,09\%$ siehe Abbildung 16C,D). Hier verhinderte die Vorbehandlung mit GI und GW die IL-6R-Proteolyse durch ADAM10 (siehe Abbildung 16C,D). Diese Ergebnisse lassen folgern, dass die stark geminderte Proteolyse der IL-6R Δ S359_S361-Variante nicht direkt durch den Verlust des 3S-Motivs verursacht wurde, sondern eher mit der geringeren Distanz zwischen Schnittstelle und Plasmamembran begründet werden kann.

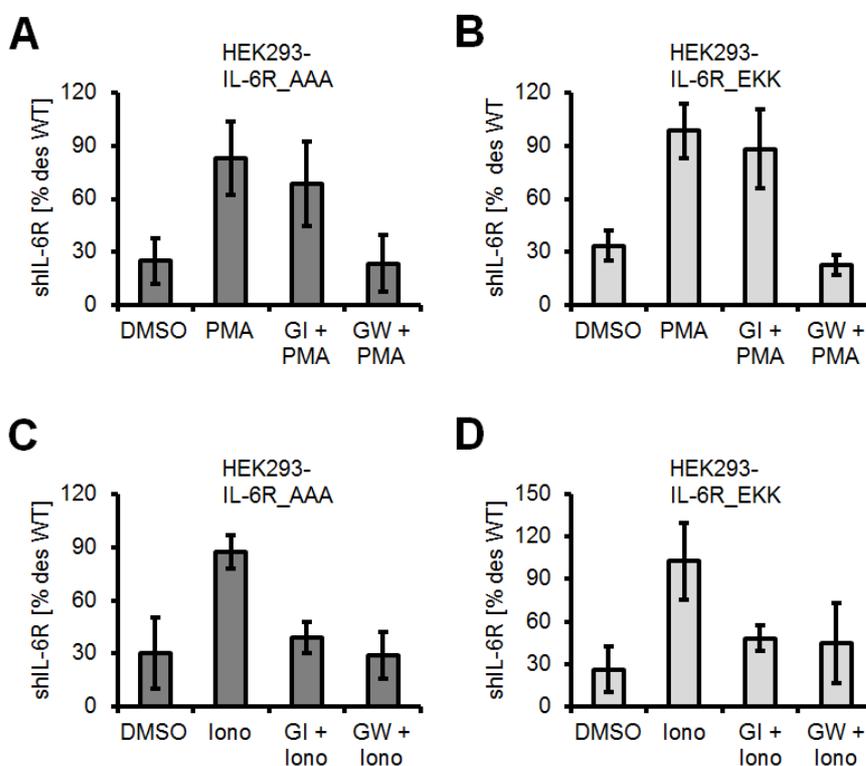


Abbildung 16: Untersuchung des Einflusses der Substitution des 3S-Motivs auf ADAM10 und ADAM17-vermittelte Proteolyse des IL-6R.

(A) HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid, das für den humanen IL-6R_AAA kodiert, transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 2 Stunden mit PMA (100 nM) oder DMSO als Negativkontrolle behandelt. Zuvor wurden die Zellen 30 min mit den Inhibitoren GI und GW behandelt. Die Entstehung des sIL-6R im Überstand wurde mittels ELISA bestimmt. (B) Das Experiment wurde wie in Sektion A durchgeführt, allerdings wurden hier die Zellen mit dem Expressionsplasmid pcDNA3.1-IL-6R_EKK transfiziert. (C) HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid transfiziert, das für den humanen IL-6R_AAA kodiert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 30 Minuten mit Ionomycin (1 μ M) oder DMSO als Negativkontrolle behandelt. Die Entstehung des sIL-6R im Überstand wurde mittels ELISA analysiert. (D) Das Experiment wurde wie in Sektion C durchgeführt, allerdings wurden hier die Zellen mit dem pcDNA3.1-IL-6R_EKK transfiziert. Die ELISA-Ergebnisse zeigen den Mittelwert (\pm S. D.) von drei unabhängigen Experimenten. Für die Berechnung der Prozentwerte wurde die sIL-6R-Konzentration im Überstand von HEK293-IL-6R Zellen nach PMA-Stimulation (hier nicht gezeigt) auf 100% gesetzt.

3.5 Die Deletion des 3S-Motivs hat keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression und Signaltransduktion des IL-6R

Die Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor induziert die Rekrutierung von zwei gp130 β -Rezeptoren und führt anschließend zur Aktivierung von intrazellulären Signalwegen, wobei der Jak/STAT-Weg der am besten analysierte ist (Heinrich et al. 2003; Aparicio-Siegmund et al. 2014). Um zu untersuchen, ob die Deletion der 3S-Motivs die biologische Aktivität des IL-6R und somit das *IL-6-classic signaling* beeinflusst, wurden Ba/F3-gp130-Zellen mit dem IL-6R oder mit der IL-6R Δ S359_S361-Variante, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, stabil transduziert. Hierbei wurden die Expressionsplasmide pMOWS-hIL-6R Δ S359-S361 und pMOWS-hIL-6R, deren Generierung in Abbildung 12 dargestellt ist, verwendet. Ba/F3-Zellen sind murine prä-B-Zellen, die in Abhängigkeit von IL-3 wachsen. Die stabile Transduktion von gp130 macht die Zellen ebenfalls responsiv für die Stimulation mit IL-6 in Kombination mit dem sIL-6R oder Hyper-IL-6, ein Fusionsprotein aus IL-6/sIL-6R (Fischer et al. 1997). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine zweite Transduktion mit IL-6R-cDNA Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen generiert, die in Gegenwart von IL-6 ohne den sIL-6R proliferieren (Garbers et al. 2011; Baran et al. 2013).

Zuerst wurde eine gleichmäßige Oberflächenexpression des IL-6R auf Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen und den Ba/F3-gp130-IL-6R Δ S359_S361-Zellen mittels Durchflusszytometrie verifiziert (siehe Abbildung 17).

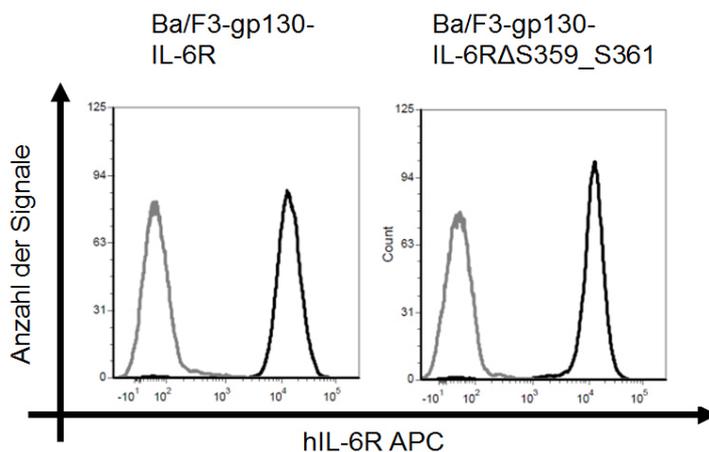


Abbildung 17: Oberflächenexpression des IL-6R auf stabil transduzierten Ba/F3-gp130-IL-6R- und Ba/F3-gp130-IL-6R Δ S359_S361-Zellen.

Die Oberflächenexpression des IL-6R auf stabil transduzierten Ba/F3-gp130-IL-6R- und Ba/F3-gp130-IL-6R Δ S359_S361-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie, unter Verwendung eines APC-gekoppelten Sekundärantikörpers, der den Fc Teil des gebundenen 4-11 Antikörpers erkennt, analysiert. Die Färbung der Negativkontrolle, bei der nur der APC-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet worden ist, ist in grau dargestellt. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen proliferieren dosisabhängig in Abhängigkeit zur ansteigenden IL-6- bzw. von Hyper-IL-6-Konzentrationen (siehe Abbildung 18A). Beide Zytokine induzieren die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden, was durch Phosphorylierung von STAT3 veranschaulicht wird (siehe Abbildung 18B). Es wurde bereits gezeigt, dass IL-6R-Mutanten mit verkürzten Stalk-Bereichen in Gegenwart von IL-6 proliferieren, solange der Stalk-Bereich aus mindestens 22 Aminosäureresten besteht (Baran et al. 2013). Dementsprechend proliferieren die Ba/F3-gp130-IL-6R Δ S359_S361-Zellen gleichermaßen in Abhängigkeit von steigenden IL-6- bzw. Hyper-IL-6-Konzentrationen (siehe Abbildung 18C). Die Verwendung von Hyper-IL-6 (Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R) dient hierbei als Positivkontrolle, um sicherzustellen, dass die untersuchten Zellen tatsächlich dosisabhängig proliferieren. In ähnlicher Weise führte die 15 minütige Behandlung der Zellen mit IL-6 zu einer gleichmäßigen Phosphorylierung von STAT3 (siehe Abbildung 18D), was die vollständige biologische Aktivität der IL-6R Δ S359_S361-Variante nachweist.

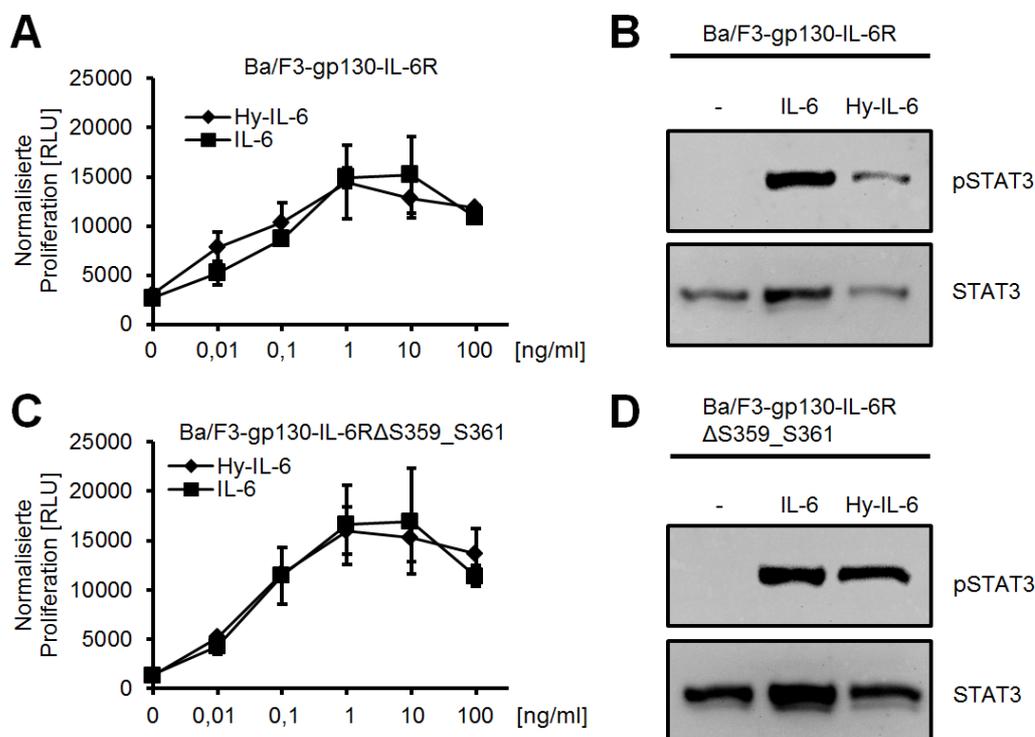


Abbildung 18: Biologische Aktivität des IL-6R auf stabil transduzierten Ba/F3-gp130-IL-6R- und Ba/F3-gp130-IL-6R Δ S359_S361-Zellen.

(A) Gleiche Mengen an Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen wurden für 48 h mit den angegebenen Konzentrationen an IL-6 oder Hyper-IL-6 (Positivkontrolle) unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellviabilität wurde wie in Abschnitt 2.2.3.7 beschrieben analysiert. (B) Gleiche Mengen an Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen wurden 2 h in serumfreiem Medium kultiviert und anschließend mit 10 ng/ml IL-6, 10 ng/ml Hyper-IL-6 oder ohne Zytokin für 15 min stimuliert. Die Phosphorylierung von STAT-3 wurde mittels Western Blot analysiert. Die Gesamtmenge an STAT3 diene als Ladekontrolle. (C) Das Experiment wurde wie in Sektion A beschrieben durchgeführt, allerdings wurden hier Ba/F3-gp130-IL-6R Δ S359_S361-Zellen verwendet. (D) Das Experiment wurde wie in Sektion B beschrieben durchgeführt, allerdings wurden hier Ba/F3-gp130-IL-6R Δ S359_S361-Zellen verwendet. Die Werte des Zellviabilitätsassays zeigen den Mittelwert (\pm S. D.) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten. Die Western Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

3.6 Die Deletion von ADAM10 und ADAM17 unterstreicht deren wichtige Rolle bei der Proteolyse des IL-6R *in vitro*

ADAM10 und ADAM17 können selektiv mit Ionomycin bzw. PMA aktiviert werden (Matthews et al. 2003; Garbers et al. 2011). Allerdings konnte die Ionomycin-induzierte kompensatorische Proteolyse des IL-6R (Garbers et al. 2011) und auch anderer Substrate (Le Gall et al. 2009) durch ADAM17 in ADAM10^{-/-} murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) beobachtet werden. Um zu klären, ob diese Beobachtungen auch für das humane System zutreffen, wurden mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems generierte HEK293-Zelllinien genutzt, die defizient für ADAM10 (HEK293-A10^{-/-}), ADAM17 (HEK293-A17^{-/-}) oder beide Proteasen (HEK293-A10^{-/-}/A17^{-/-}) sind.

Die erfolgreiche Deletion beider Proteasen wurde mittels Durchflusszytometrie (siehe Abbildung 19A, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von jun. Prof. Dr. Rabe, Biochemie, CAU Kiel) und Western Blot (siehe Abbildung 19B) von Zelllysaten bestätigt. ADAM17 wird als ein inaktives Zymogen synthetisiert (Proform) und wird durch proteolytische Prozessierung durch Enzyme wie beispielsweise Furin oder die *proprotein-convertases 7* (PC7) in seine aktive Form (mature Form) überführt (Endres et al. 2003). Beide Formen von ADAM17 konnten mittels Western Blot detektiert werden (siehe Abbildung 19B, rechts).

Obwohl Ionomycin und PMA in HEK293-Zellen die Proteolyse induzierten (siehe Abbildung 20A), blieb nur das PMA-induzierte Shedding des IL-6R in HEK293-A10^{-/-}-Zellen unverändert (siehe Abbildung 20B). Im Gegensatz hierzu war die Proteolyse nach Ionomycin-Stimulation drastisch reduziert und sogar noch stärker beeinträchtigt, wenn die HEK293-A10^{-/-}-Zellen mit dem spezifischen ADAM10 Inhibitor GI vorbehandelt wurden (siehe Abbildung 20B). Somit kann ADAM17, im Gegensatz zu den Versuchen in ADAM10^{-/-} MEFs, nicht durch Ionomycin aktiviert werden und fungiert nicht als kompensatorische Protease im humanen System. Ionomycin-induziertes Shedding in HEK293-A17^{-/-}-Zellen war intakt; allerdings zeigte die Stimulation mit PMA keinen Effekt auf die Proteolyse des IL-6R (siehe Abbildung 20C). Die genetische Deletion beider Proteasen führte zu keinem induzierbaren Shedding des IL-6R, weder mit Ionomycin noch mit PMA. Die Menge des entstandenen sIL-6R im Überstand bei diesen Zellen lag zwischen 1% und 2% im Vergleich zu genetisch unveränderten HEK293-Zellen (siehe Abbildung 20D). Demnach sieht es so aus, als ob keine andere Protease in diesem humanen Zellsystem für die induzierte Proteolyse des IL-6R verantwortlich ist. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass Cathepsin G, das vermutlich nicht in HEK293-Zellen exprimiert ist, den IL-6R schneiden kann (Bank et al. 1999). Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Proteasen, die nicht in HEK293-Zellen exprimiert sind, den IL-6R prozessieren können.

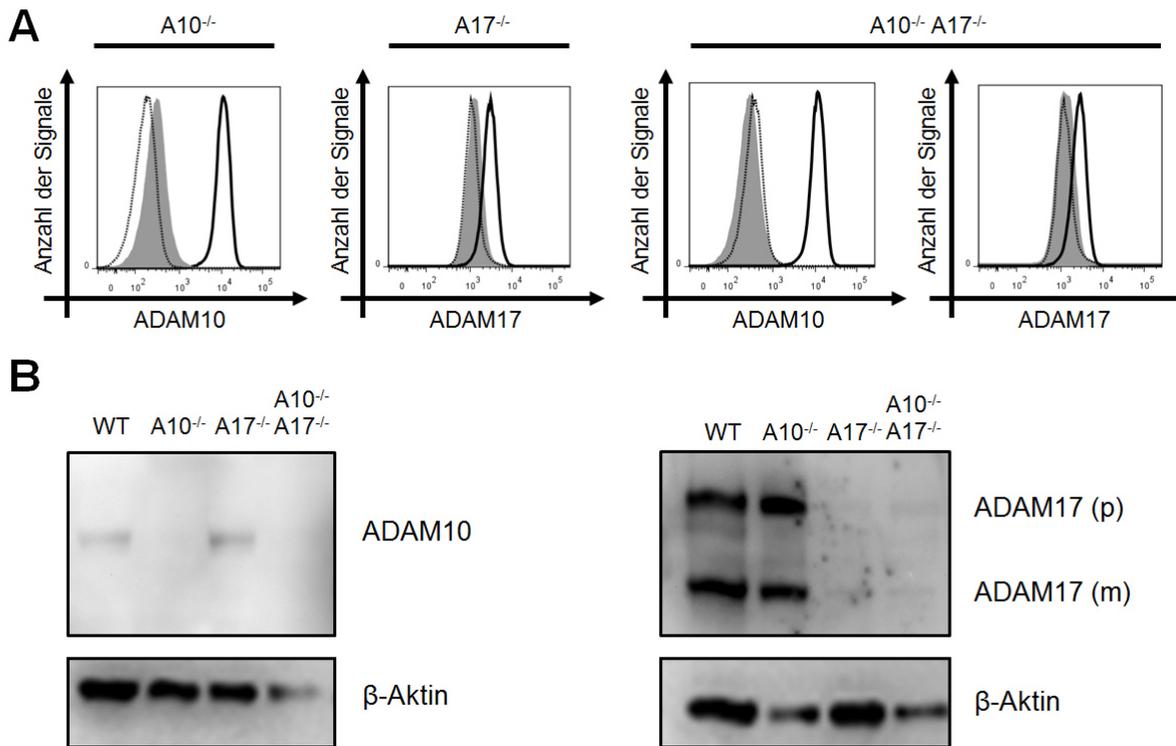


Abbildung 19: Verifizierung der Deletion von ADAM10 und ADAM17 in HEK293-Zellen.

(A) Zelloberflächenexpression von ADAM10 und ADAM17 auf mittels CRISPR/Cas9 hergestellten, Einzel- und Doppelknockout HEK293-Zellen. Die Expression der Proteasen der parentalen HEK293-Zellen ist in schwarz dargestellt. Die Protease-Expression der entsprechenden Knockoutzelllinien ist in gestrichelten Linien dargestellt. Die Isotypkontrolle ist in den grau ausgefüllten Histogrammen dargestellt. Die entsprechenden Experimente wurden von der Arbeitsgruppe von jun. Prof. Dr. Björn Rabe vom Biochemischen Institut an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. (B) Die Abwesenheit von ADAM10 in ADAM10 ($A10^{-/-}$) und $A10^{-/-}$ /ADAM17 ($A17^{-/-}$) HEK293-Zellen und die Abwesenheit von ADAM17 in ($A17^{-/-}$) und $A10^{-/-}$ / $(A17^{-/-})$ HEK293-Zellen wurde mittels Western Blot bestätigt. Es wurde die Proform (p) sowie die mature Form (m) von ADAM17 detektiert. Die Detektion des endogenen und ubiquitär exprimierten Proteins β -Aktin diente als Ladekontrolle.

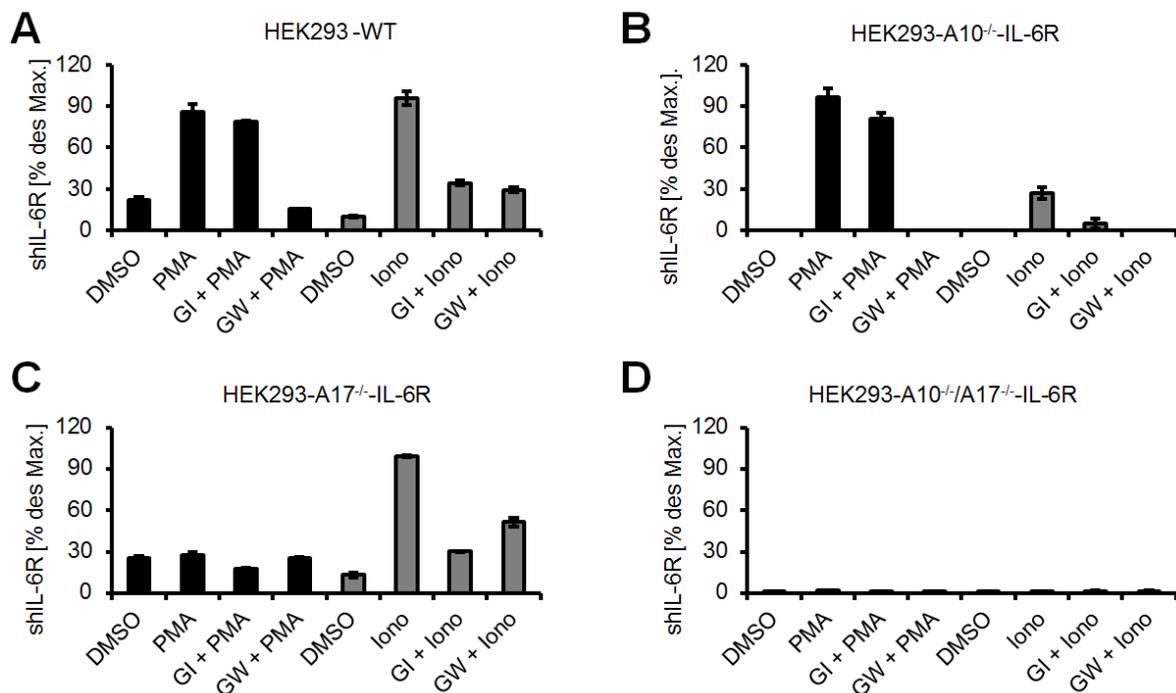


Abbildung 20: Shedding des IL-6R in ADAM17- und ADAM10-Knockoutzellen.

(A-D) Die gekennzeichneten HEK293-Knockoutzelllinien wurden transient mit dem IL-6R transfiziert. Die Zellen wurden 48 h später wie in der Legende von Abbildung 16 beschrieben stimuliert und der sIL-6R im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Die ELISA-Ergebnisse zeigen den Mittelwert (\pm S. D.) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten.

3.7 Expression und Reinigung der alternativ gespleißten Form des löslichen IL-6R

Obwohl die Existenz des sIL-6R in humanen Körperflüssigkeiten seit mehr als 25 Jahren bekannt ist (Novick et al. 1989; Honda et al. 1992), ist der Mechanismus seiner Entstehung größtenteils unerforscht. Müller-Newen et al. konnten einen sIL-6R (ab hier als ds-sIL-6R bezeichnet) aus humanen Plasma reinigen, der über alternatives Spleißen der *IL6R* mRNA generiert wurde (Müller-Newen et al. 1996). Allerdings haben mehrere Untersuchungen, in denen der ds-sIL-6R mittels ELISA quantifiziert wurde gezeigt, dass nur 1-20% des gesamten sIL-6R durch alternatives Spleißen entsteht (Horiuchi et al. 1998; Dimitrov et al. 2006; Leggate et al. 2010; Garbers et al. 2014). Um diese Erkenntnisse zu bestätigen wurde ein polyklonaler Antikörper durch die Firma Pineda Antikörper-Service (Berlin) generiert, der die zehn C-terminalen Aminosäuren des ds-sIL-6R erkennt, die weder in dem vollständigen IL-6R noch im proteolytisch gespaltenen sIL-6R vorhanden sind (siehe Abbildung 21). Dieser Antikörper wird in der Folge als ds6R bezeichnet, und wird als Primäntikörper des ELISA zur Quantifizierung des ds-sIL-6R eingesetzt.

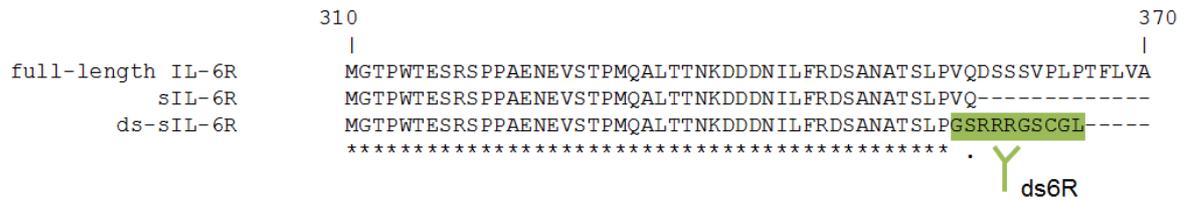


Abbildung 21: Multiples Aligment der Aminosäuresequenzen des membranständigen IL-6R, des sIL-6R und des ds-sIL-6R.

Es wurde die Aminosäuresequenz von M310 bis A370 des hIL-6R, die Aminosäuresequenz von M310 bis Q357 des sIL-6R und die Aminosäuresequenz des alternativ gespleißten IL-6R (ds-sIL-6R) verglichen. Die zehn C-terminalen Aminosäurereste des ds-sIL-6R, die das Epitop des ds6R-Antikörpers repräsentieren, sind grün gekennzeichnet.

Um die Quantifizierung der alternativ gespleißten Form des IL-6R mittels ELISA zu ermöglichen, wurde der ds-sIL-6R, der für die Erstellung der Standardreihe benötigt wurde, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben rekombinant hergestellt und gereinigt. Die Identität und die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.2.2.4) und Western Blot (siehe Abschnitt 2.2.2.6) überprüft (siehe Abbildung 22A). Dabei wurde deutlich, dass der ds-sIL-6R erfolgreich exprimiert wurde, und das gereinigte Protein minimal mit Fremdprotein verunreinigt zu sein scheint, da die SDS-PAGE bei circa 130 kDa eine Proteinbande zeigt, die nicht in dem korrespondierenden Western Blot detektiert wurde (siehe Abbildung 22A).

Um zu überprüfen, ob der hergestellte ds-sIL-6R trotz der minimalen Verunreinigung durch Fremdprotein eine ähnliche biologische Aktivität wie der gescheddete sIL-6R besitzt, wurden Ba/F3-gp130-Zellen mit IL-6 und ansteigenden Konzentrationen an sIL-6R und ds-sIL-6R für 48 h kultiviert. Anschließend wurde die Proliferation der Zellen überprüft (siehe Abbildung 22 B,C). Beide Varianten des sIL-6R waren gleichermaßen biologisch aktiv und in der Lage IL-6 *trans-signaling* zu betreiben, weil sie die Proliferation der Ba/F3-gp130-Zellen konzentrationsabhängig in Kombination mit 10 ng/ml IL-6 stimulierten (siehe Abbildung 22 B,C). Daraus lässt sich schließen, dass die minimale Verunreinigung des ds-sIL-6R durch Fremdprotein keinen Einfluss auf die biologische Aktivität des Proteins hat.

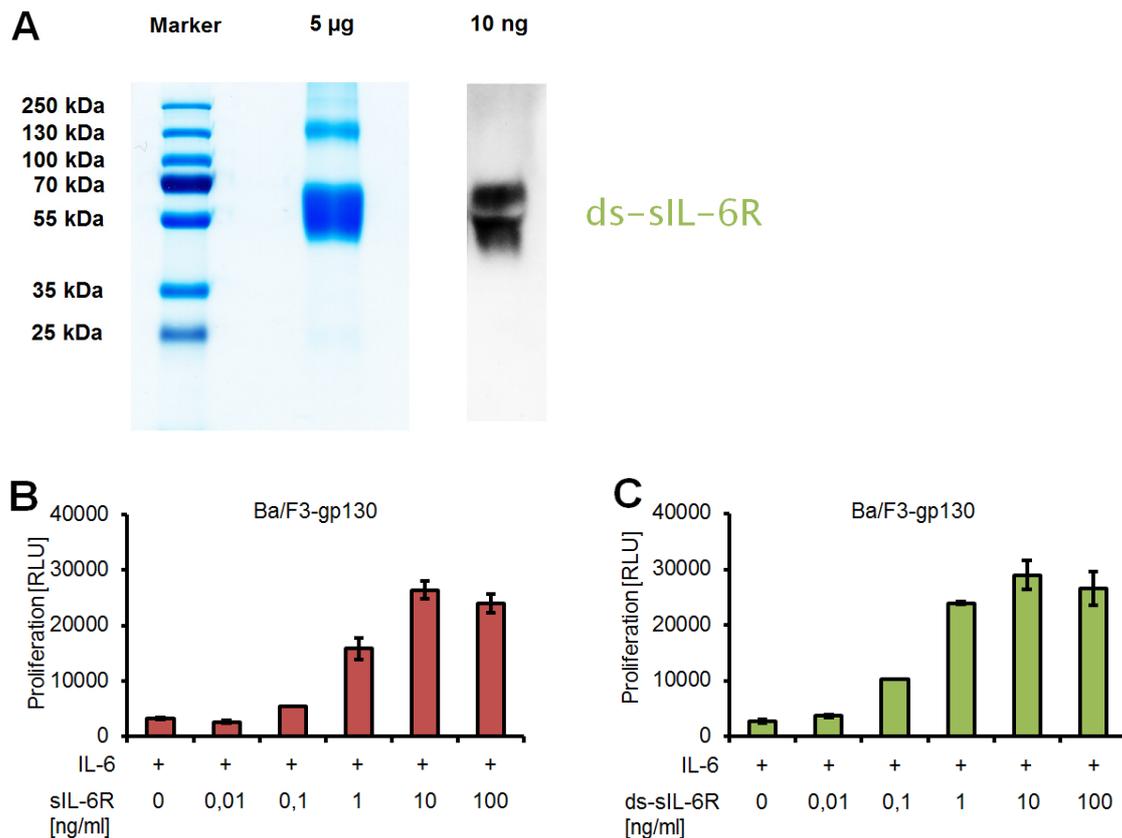


Abbildung 22: SDS-PAGE und Western Blot des hergestellten und gereinigten ds-sIL-6R.

(A) 5 µg des produzierten und gereinigten Proteins wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einer Coomassiefärbelösung im Gel angefärbt. Zusätzlich wurden 10 ng des Proteins mittels Western Blot analysiert und die alternativ gespleißte Form des IL-6R (ds-sIL-6R) mittels dem ds6R Antikörper detektiert. (B,C) Proliferationsassay von Ba/F3-gp130-Zellen bei 10 ng/ml IL-6 und ansteigenden Mengen (0-100 ng/ml) an (B) rekombinanten sIL-6R oder (C) rekombinanten ds-sIL-6R. Die Zellviabilität wurde nach 48 h analysiert. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert (\pm S. D.) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten.

3.8 Etablierung eines ELISA zur Quantifizierung der alternativ gespleißten Form des IL-6R

Zur Quantifizierung des gesamten löslichen IL-6R wurde ein Sandwich-ELISA mit einem Fang-Antikörper (4-11) verwendet, der den N-Terminus aller sIL-6R erkennt (siehe Abbildung 23A). Der polyklonale Detektionsantikörper (Baf227) (Chalaris et al. 2007; Garbers et al. 2014) erkennt alle an 4-11 gebundenen sIL-6R-Varianten. Die Messung von zwei Verdünnungsreihen (0-1000 pg/ml) von rekombinanten sIL-6R und ds-sIL-6R zeigten, dass dieser ELISA eine vergleichbare Quantifizierung des sIL-6R und des ds-sIL-6R (siehe Abbildung 23A) gewährleistet.

Des Weiteren ermöglichte dieser Sandwich-ELISA ebenfalls die Quantifizierung des gesamten sIL-6R in humanem Serum von gesunden Probanden. Die ermittelten Konzentrationen des gesamten sIL-6R lagen bei $46,0 \pm 6,4$ ng/ml (siehe Abbildung 23B) und befanden sich somit in einem ähnlichen Bereich wie bei den Untersuchungen von Garbers et al. 2014.

Des Weiteren konnte mit Hilfe des polyklonalen ds6R-Antikörpers, der nur den ds-sIL-6R erkennt, ein Sandwich-ELISA für die alternativ gespleißte Form des IL-6R entwickelt werden (siehe Abbildung 23C, (Horiuchi et al. 1994)). Bei der Analyse der humanen Seren, die auch in Abbildung 23B untersucht wurden, wurden nur $7,0 \pm 2,0$ ng/ml ds-sIL-6R detektiert (siehe Abbildung 23D). Somit bestätigt diese Untersuchung die Ergebnisse anderer Studien (Lust et al. 1992), die ebenfalls zeigen, dass nur ein geringer Anteil des gesamten sIL-6R durch alternatives Spleißen entsteht. Das lässt darauf schließen, dass die Mehrheit des sIL-6R durch einen anderen Mechanismus entsteht.

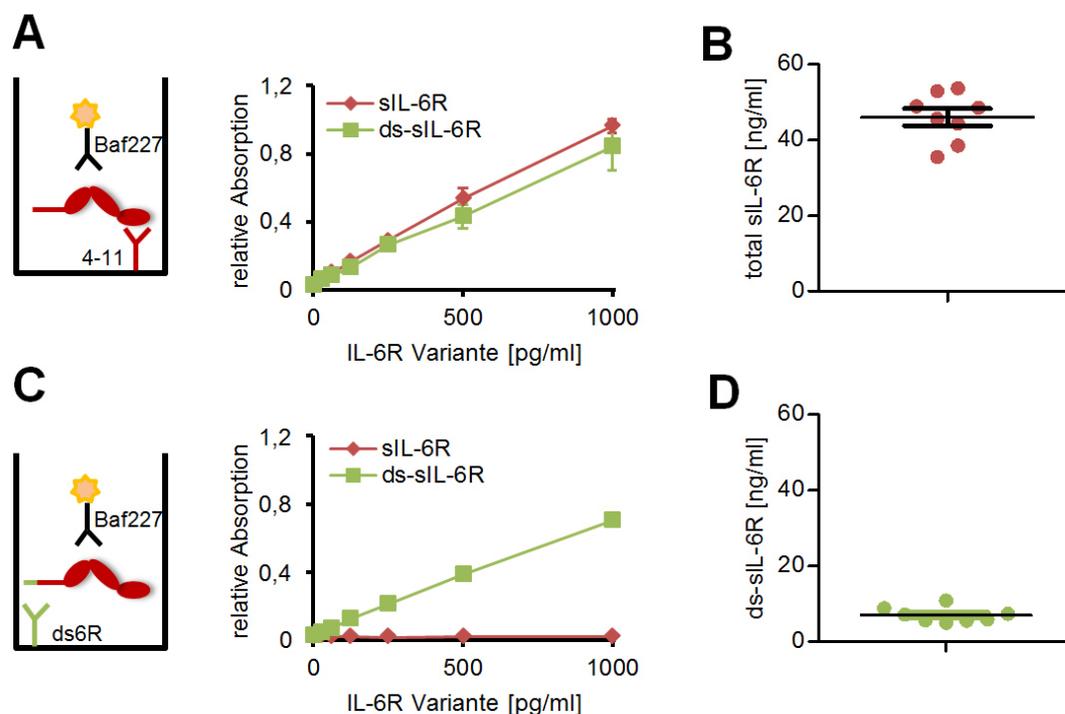


Abbildung 23: Quantifizierung des gesamten sIL-6R und des ds-sIL-6R mittels ELISA.

(A) Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA, der alle Formen des sIL-6R detektiert, und *proof-of-principle experiment* mit rekombinanten Proteinen. Hierbei sind die Mittelwerte (\pm S. D.) eines Experiments gezeigt. (B) Quantifizierung der gesamten sIL-6R Konzentration in humanem Serum. Der Mittelwert ist mit einem horizontalen Strich gekennzeichnet. (C) Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA, der nur den ds-sIL-6R detektiert, und *proof-of-principle experiment* mit rekombinanten Proteinen. Hierbei sind die Mittelwerte (\pm S. D.) eines Experimentes gezeigt. (D) Quantifizierung der ds-sIL-6R Konzentration in humanem Serum. Der Mittelwert ist mit einem horizontalen Strich gekennzeichnet.

3.9 Identifizierung einer löslichen Form des IL-6R mit einem durch eine Protease generierten C-Terminus und einer neuen O-Glykanstelle mittels Massenspektrometrie

Um andere humane sIL-6R-Formen *in vivo* zu identifizieren, wurde humanes Serum zunächst von endogenen Antikörpern befreit, da diese die massenspektrometrischen Untersuchungen stören, und anschließend der gesamte sIL-6R mit Hilfe von 4-11-Beads präzipitiert (siehe Abbildung 24). Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE der Größe nach unter nicht reduzierenden Bedingungen getrennt und der sIL-6R mittels Western Blot detektiert (siehe Abbildung 24). Eine Auftrennung der Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen verhindert, dass die noch im Präzipitat verbliebenen Antikörper in ihre leichte und schwere Kette zerfallen. Unter reduzierenden Bedingungen würde sich die schwere Kette des Antikörpers (ca. 50 kDa) im SDS-Gel in der Proteinbande, die auch den präzipitierten sIL-6R enthält (siehe Abbildung 24), befinden, und somit den sIL-6R verunreinigen.

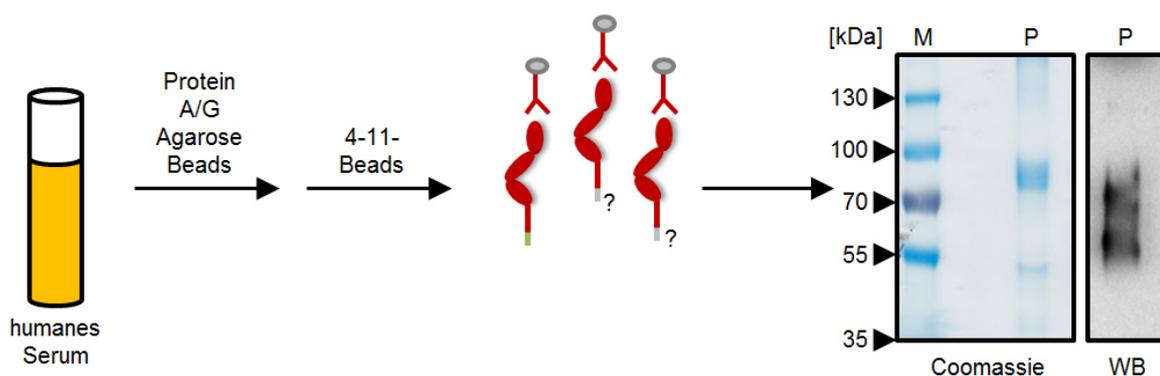


Abbildung 24: Präzipitation aller Formen des sIL-6R aus humanem Serum.

Schematische Darstellung der Präzipitation des gesamten sIL-6R aus humanem Serum. Ein repräsentatives Coomassie-gefärbtes nicht reduzierendes SDS-Gel und korrespondierender Western Blot (WB) der präzipitierten Proteine ist rechts gezeigt.

Die sIL-6R enthaltene Region des Coomassie-gefärbten SDS-Gels wurde ausgeschnitten und in der Arbeitsgruppe für systematische Proteomics und Bioanalytik von Prof. Dr. Andreas Tholey (Institut für Experimentelle Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) wie in der Folge beschrieben aufbereitet und analysiert (siehe Abbildung 25A).

Die N-Glykosylierungen der Proteine wurden zunächst durch die Behandlung mit PNGase F entfernt (siehe Abbildung 25A). Diese Endoglykosidase hydrolysiert die Bindung zwischen Kohlenhydrat und Seitenkette des Asparagins, was zur Modifizierung des Asparagins zu einer Asparaginsäure führt. Anschließend wurden die Proteine mit Chymotrypsin in Gegenwart von 50% H_2^{18}O enzymatisch gespalten (siehe Abbildung 25A). Mit dieser Strategie, die auf Proteolyse in Anwesenheit von isotopisch markiertem Wasser (H_2^{18}O) basiert (Scholzer et al. 1996), werden alle durch Chymotrypsin generierten C-Termini mit einem ^{18}O -Isotop markiert, während die ursprünglichen C-Termini unmarkiert bleiben (siehe Abbildung 25A).

Zunächst wurde ein C-terminales Peptid identifiziert, das dem C-Terminus des ds-sIL-6R entspricht (siehe Abbildung 25B), was zu der oben beschriebenen Feststellung passt, dass der ds-sIL-6R zu der Gesamtmenge des sIL-6R im humanen Serum beiträgt. Des Weiteren wurde mit Hilfe von manueller Interpretation der Massenspektren ein C-terminales Peptid identifiziert, welches auf P355 endet. Der auf diese Weise endende sIL-6R könnte somit durch Proteolyse des membrangebundenen IL-6R zwischen P355 und V356 entstanden sein (siehe Abbildung 25C). Beide identifizierten C-terminalen Peptide trugen ein N-Glykan an N350, was aufgrund der Behandlung mit PNGase F zu D350 modifiziert wurde (siehe Abbildung 25B und C in grün). Des Weiteren wurden an diesem C-terminalen Peptid verschiedene bisher unbekannte O-Glykanmotive identifiziert, die mit Hilfe von *electron transfer dissociation* (ETD) innerhalb des N350 Sequons am T352 lokalisiert wurden. Diese verschiedenen O-Glykanmotive können der Abbildung 25C und Abbildung 26 entnommen werden. Mit dieser MS-basierten Methode ist es das erste Mal gelungen, eine sIL-6R-Form im humanen Serum zu identifizieren, die nicht durch alternatives Spleißen, sondern wahrscheinlich durch Proteolyse des membranständigen IL-6R entstanden ist.

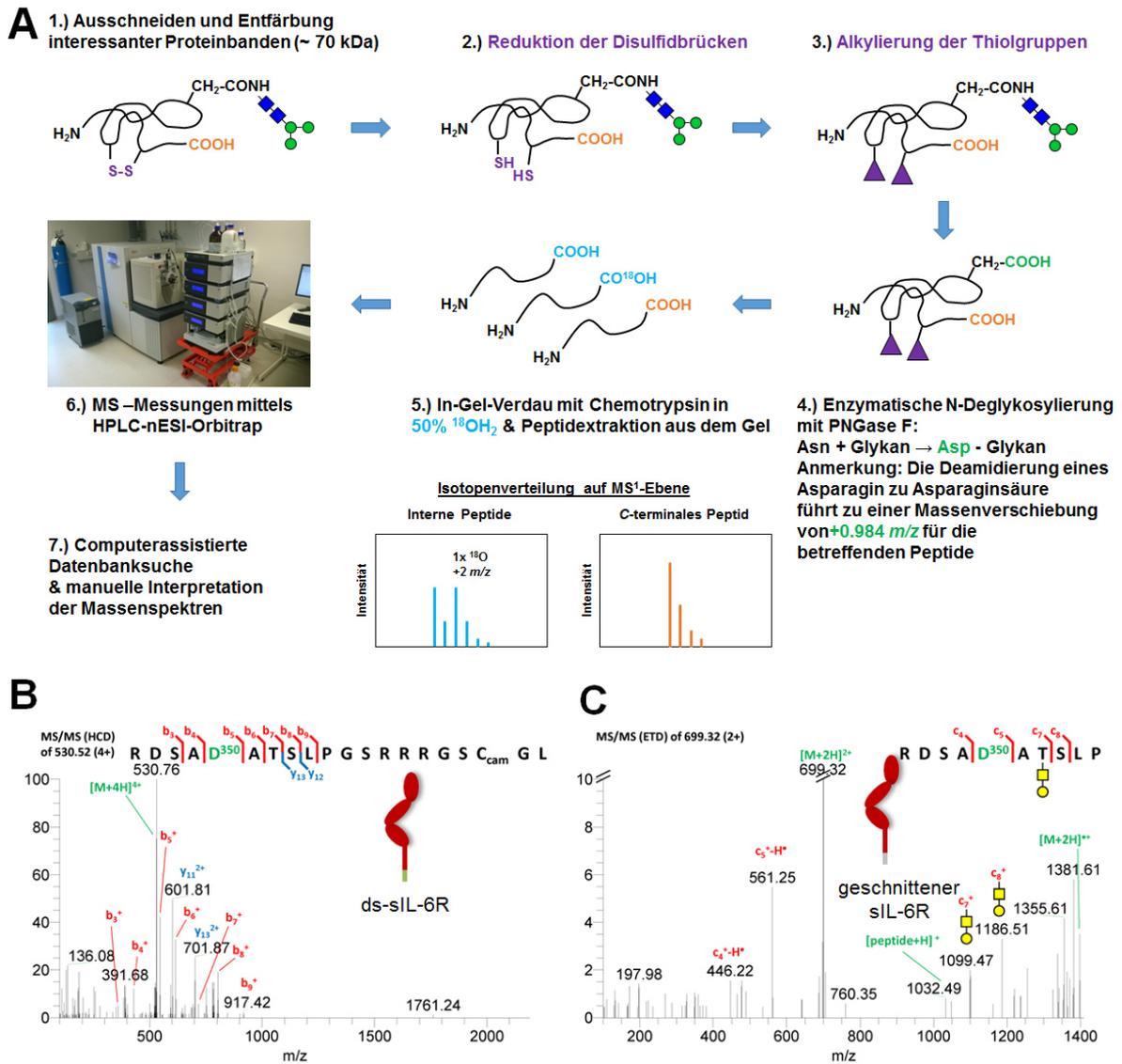


Abbildung 25: Identifizierung des ds-sIL-6R und einer bisher nicht beschriebenen gesheddeten Form des sIL-6R in humanem Serum.

(A) Schematische Darstellung des proteomischen Workflows. (B) MS/MS Spektren (*Higher-energy collisional dissociation* (HCD)) des C-terminalen Peptids des ds-sIL-6R, das mittels einer Computer-assistierten Datenbanksuche identifiziert wurde. Die N-Glykosylierungsstelle N350, welche aufgrund der Behandlung mit PNGase F zu D350 modifiziert wurde, ist in grün dargestellt. (C) MS/MS Spektren (*electron transfer dissociation* (ETD)) eines C-terminalen Peptids einer durch eine Protease gesheddeten s-IL-6R-Form, welches mittels manueller Spektreninterpretation identifiziert wurde. Die N-Glykosylierungsstelle N350, welche aufgrund der Behandlung mit PNGase F zu D350 modifiziert wurde, ist in grün dargestellt. Eines der identifizierten O-Glykane an T352 ist gezeigt. Die Abbildung wurde von Prasath Somasundaram von der AG für systematische Proteomics und Bioanalytik (Leitung: Prof. Dr. Andreas Tholey) des Instituts für Experimentelle Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt. Die dargestellten Experimente wurden ebenfalls von Prasath Somasundaram durchgeführt.

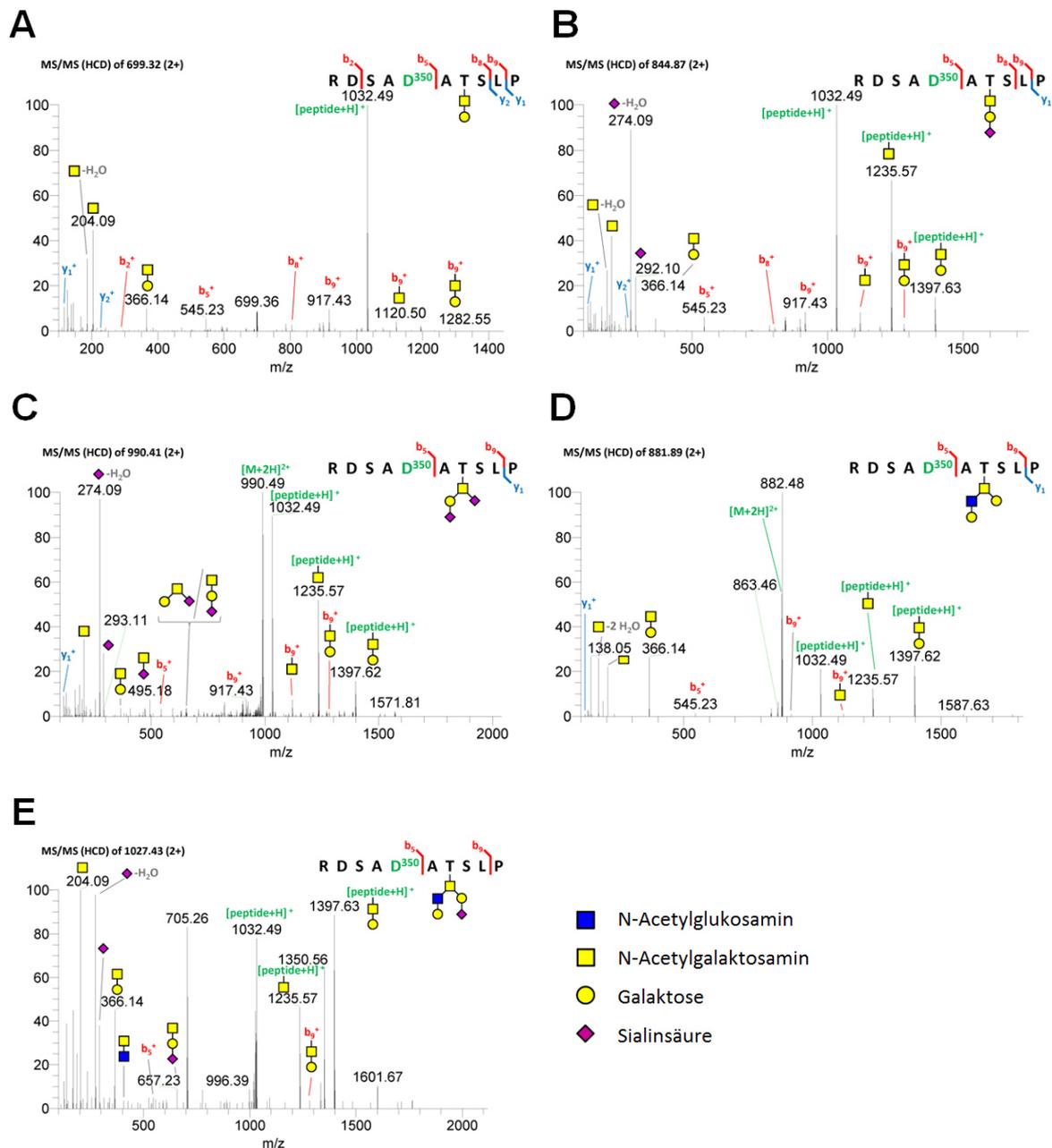


Abbildung 26: Identifizierung von verschiedenen O-Glykanstrukturen auf dem durch Proteolyse entstandenen sIL-6R im humanen Serum mittels Massenspektrometrie.

(A-E)MS/MS-Spektren (HCD) des mittels manueller Spektreninterpretation identifizierten C-terminalen Peptids des durch Proteolyse entstandenen sIL-6R. Die N-Glykosylierungsstelle am N350, die aufgrund der PNGase F Behandlung zu einer Asparaginsäure modifiziert wurde, ist in grün dargestellt. Die verschiedenen identifizierten O-Glykanmotive an T352 sind dargestellt. Die Namen der Bausteine der O-Glykanmotive sind der Legende (rechts unten) zu entnehmen. Die Abbildung wurde von Prasath Somasundaram von der AG für systematische Proteomics und Bioanalytik (Leitung: Prof. Dr. Andreas Tholey) des Instituts für Experimentelle Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt. Die dargestellten Experimente wurden ebenfalls von Prasath Somasundaram durchgeführt.

3.10 ADAM17 und ADAM10 schneiden den IL-6R zwischen P355 und V356 *in vitro*

Wie im vorherigen Kapitel gezeigt wurde, existiert ein durch Proteolyse entstandener sIL-6R *in vivo*. Im nächsten Schritt sollte nun die Protease identifiziert werden, die für die Entstehung dieser prozessierten sIL-6R-Form verantwortlich ist. Der IL-6R ist ein bekanntes Substrat für drei humane Proteasen. Dazu zählen die zwei Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 (Matthews et al. 2003; Garbers et al. 2011; Baran et al. 2013) sowie die Serinprotease Cathepsin G (CG) (Bank et al. 1999; Lokau et al. 2016). Bis heute ist der IL-6R das einzige ADAM17-Substrat, das zwischen Q357 und D358 zwei Aminosäuren *downstream* von P355 und V356 gespalten wird (Müllberg et al. 1994). Überraschenderweise ließ die Modellierung von dem IL-6R-Stalk-Bereich und ADAM17 darauf schließen, dass die Prozessierung des IL-6R-Stalk-Bereichs zwischen Q357 und D358 eher unwahrscheinlich ist. Stattdessen legt das Modell eine Prozessierung des IL-6R zwischen P355 und V356 nahe, wenn diese beiden Aminosäuren mit in die Modellierung einbezogen werden (PVQDSSS, siehe Abbildung 27). Die katalytische Domäne von ADAM17 bildet einen hydrophoben Bereich nahe des katalytischen Zentrums, welcher an P355/V356, aber nicht an Q357/D358 binden kann (siehe Abbildung 27).

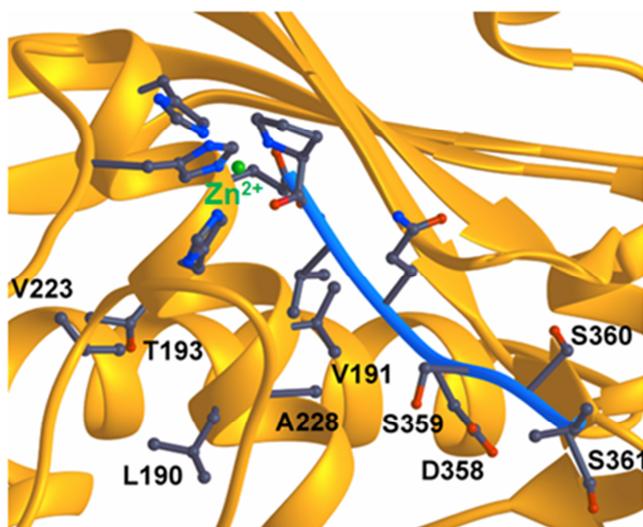


Abbildung 27: Detailliertes Modell des katalytischen Zentrums von ADAM17.

Das katalytische Zentrum von ADAM17 ist in gelb dargestellt. Das IL-6R Peptid PVQDSSS ist in blau dargestellt. Das Modell wurde von Prof. Dr. Joachim Grötzinger vom Biochemischen Institut an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt.

Aufgrund dieser widersprüchlichen Erkenntnisse wurden die Ergebnisse von Müllberg et al. mittels Massenspektrometrie überprüft (Müllberg et al. 1994). Hierzu wurden zunächst HEK293-Zellen mit cDNA, die für den humanen IL-6R kodiert, transient transfiziert. Anschließend wurde 48 h nach Transfektion ADAM17-vermitteltes Shedding des IL-6R mittels PMA-Stimulation induziert. Der so entstandene sIL-6R wurde aus dem Zellkulturüberstand präzipitiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (siehe Abbildung 28A). Mittels MS-Analyse wurde ein C-terminales Peptid identifiziert, welches auf P355 endet (siehe Abbildung 28B), was darauf hindeutet, dass *in vitro* dieselbe Schnittstelle wie *in vivo* verwendet wird (siehe Abbildung 25 C).

Des Weiteren konnten die N-Glykosylierung an N350, sowie das O-Glykanmotiv an T352 bestimmt werden, die ebenfalls *in vivo* identifiziert wurden (siehe Abbildung 28B und Abbildung 38 sowie Abbildung 25 und Abbildung 26 im Anhang). Ein mit Q357 endendes Peptid konnte nicht identifiziert werden. Somit konnte die ursprünglich publizierte ADAM17-Schnittstelle des IL-6R zwischen Q357 und D358 (Müllberg et al. 1994) nicht bestätigt werden. Stattdessen wurde eine ADAM17-Schnittstelle zwischen P355 und V356 identifiziert, die zu dem veröffentlichten Schnittstellenprofil von ADAM17 (Tucher et al. 2014) und den Schnittstellenpräferenzen von ADAM17 in der MEROPS-Datenbank (Rawlings et al. 2014) passt. Des Weiteren hat eine kürzlich durchgeführte Studie, in der die rekombinante katalytische Domäne von ADAM17 zur Prozessierung eines IL-6R-Peptids (D347-T365) des Stalk-Bereichs verwendet wurde, ebenfalls P355/V356 als ADAM17-Schnittstelle identifiziert (Goth et al. 2015).

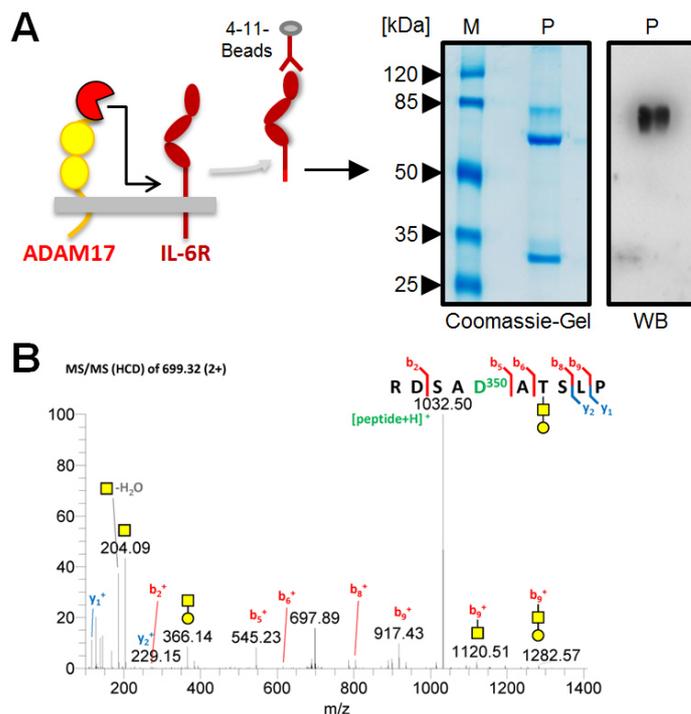


Abbildung 28: ADAM17 schneidet den IL-6R zwischen P355 und P356 *in vitro*.

(A) Schematische Darstellung der sIL-6R-Präzipitation aus Zellkulturüberstand von PMA stimulierten HEK293-IL-6R-Zellen. Der durch ADAM17 geschnittene sIL-6R wurde mittels 4-11-Beads präzipitiert und das Präzipitat mittels SDS-PAGE der Größe nach getrennt und zusätzlich mittels Western Blot untersucht. Ein repräsentatives Coomassie-gefärbtes SDS-Gel und ein Western Blot (WB) sind gezeigt (B) Die manuelle Interpretation der MS/MS-Spektren (HCD) führte zur Identifizierung des C-terminalen Peptids des sIL-6R. Eines der identifizierten O-Glykanstrukturen an T352 ist gezeigt. Die Abbildung wurde von Prasath Somasundaram von der AG für systematische Proteomics und Bioanalytik (Leitung: Prof. Dr. Andreas Tholey) des Instituts für Experimentelle Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt. Die dargestellten Experimente wurden ebenfalls von Prasath Somasundaram durchgeführt.

Um die ADAM10-Schnittstelle des IL-6R zu bestimmen, wurden HEK293-IL-6R-Zellen in einem ähnlichen Experiment mit Ionomycin stimuliert, was ADAM10-Shedding induziert (Jones et al. 1998; Garbers et al. 2011; Baran et al. 2013; Garbers et al. 2014 siehe Abbildung 29A). Überraschenderweise wurde dieselbe Schnittstelle zwischen P355 und V356 (siehe Abbildung 29B und Abbildung 28B), sowie auch dieselben O-Glykanmotive an T352 identifiziert (siehe Abbildung 29B und Abbildung 28B sowie Abbildung 38A-E Abbildung 39A-D), was darauf schließen lässt, dass beide Proteasen dieselbe Schnittstelle verwenden.

Die Schnittstelle von Cathepsin G (CG) wurde nicht bestimmt, da der sIL-6R, der von gereinigtem Cathepsin G prozessiert wurde, deutlich kleiner war als der durch ADAM17- und ADAM10-generierte sIL-6R (siehe Abbildung 39E), was darauf schließen lässt, dass CG weiter *upstream* innerhalb des IL-6R-Stalk-Bereichs schneidet. Somit kann CG ebenfalls nicht die Protease sein, die hauptsächlich für die Entstehung des sIL-6R im humanen Serum von gesunden Probanden verantwortlich ist.

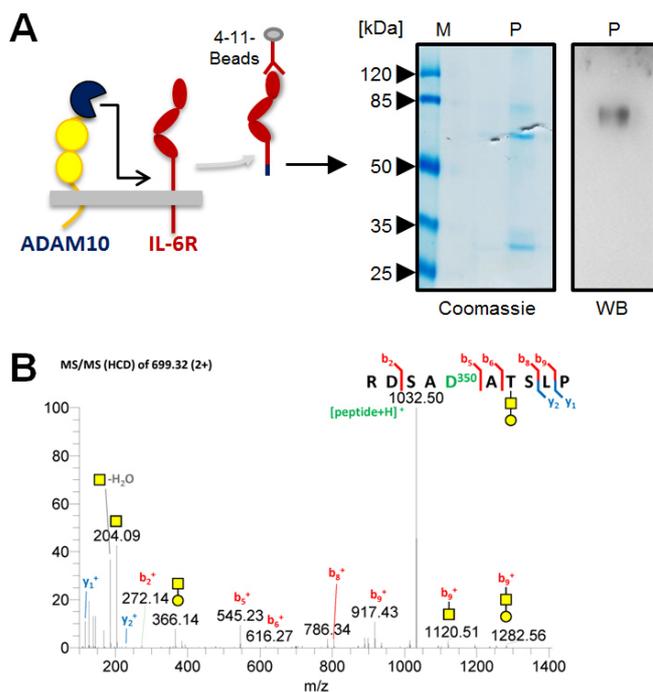


Abbildung 29: ADAM10 schneidet den IL-6R ebenfalls zwischen P355 und P356 *in vitro*.

(A) Schematische Darstellung der sIL-6R Präzipitation aus Zellkulturüberstand von Ionomycin-stimulierten HEK293-IL-6R-Zellen. Der durch ADAM10 geschnittene sIL-6R wurde mittels 4-11-Beads präzipitiert und das Präzipitat mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und zusätzlich mittels Western Blot untersucht. Ein repräsentatives Coomassie-gefärbtes SDS-Gel und ein Western Blot (WB) sind gezeigt (B) Die manuelle Interpretation der MS/MS-Spektren (HCD) führte zur Identifizierung des C-terminalen Peptids des sIL-6R. Eines der identifizierten O-Glykanstrukturen an T352 ist gezeigt. Die Abbildung wurde von Prasath Somasundaram von der AG für systematische Proteomics und Bioanalytik (Leitung: Prof. Dr. Andreas Tholey) des Instituts für Experimentelle Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt. Die dargestellten Experimente wurden ebenfalls von Prasath Somasundaram durchgeführt.

3.11 Bestimmung von fünf N-Glykanstellen vom löslichen IL-6R *in vitro* und *in vivo* mittels Massenspektrometrie

Obwohl N-Glykosylierungen des IL-6R bereits nachgewiesen wurden (Müllberg et al. 1994; Cole et al. 1999), wurde ihre funktionelle Rolle bisher nicht untersucht. Die Anwesenheit der Glykane auf dem vollständigen IL-6R und dem sIL-6R wurde durch Entfernung der N-Glykane mittels PNGase F-Behandlung, oder durch zusätzliche Entfernung der O-Glykane mit einem Deglyco-Mix, mit dem alle gängigen O- und N-Glykane entfernt werden, mittels Western Blot bestätigt (siehe Massenverschiebung in Abbildung 30A,B). Die Behandlung mit PNGase F reduzierte das apparente Molekulargewicht des IL-6R und des sIL-6R um ca. 15 kDa im Vergleich zu dem unbehandelten IL-6R (siehe Massenverschiebung in Abbildung 30A,B). Die zusätzliche Entfernung der O-Glykane durch die Behandlung mit dem Deglyco-Mix führte zu einer Reduzierung des Molekulargewichts um ca. 20 kDa im Vergleich zu dem unbehandelten IL-6R (siehe Massenverschiebung in

Abbildung 30A,B). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der vollständige IL-6R wie auch der sIL-6R N- und O-Glykane tragen.

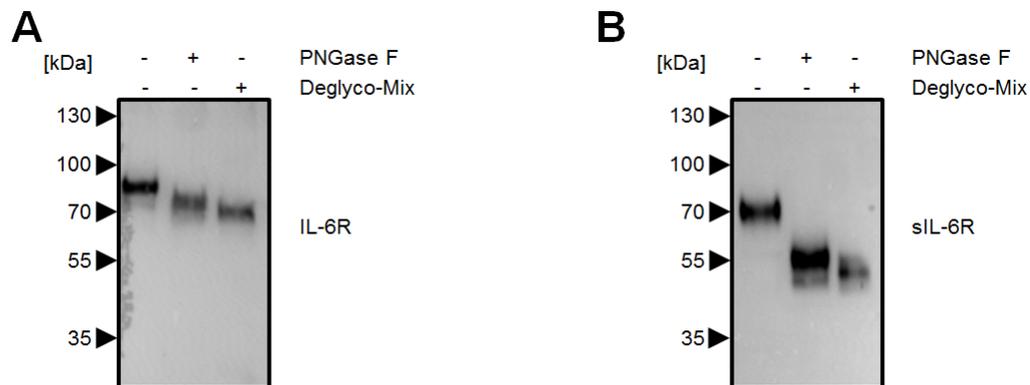


Abbildung 30: Nachweis von Glykosylierungen des IL-6R und des sIL-6R.

(A) HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid, das für den humanen IL-6R kodiert, transfiziert und 48 h später lysiert. Die Lysate wurden entweder mit PNGase F (entfernt N-Glykane), Deglyco-Mix (entfernt N- wie auch O-Glykane) oder ohne Enzym behandelt. Die Proteine wurden mittels Western Blot analysiert. Ein repräsentatives von zwei durchgeführten Experimenten ist gezeigt. (B) HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid, das für den humanen IL-6R kodiert, transfiziert und 48 h später für 2 h mit PMA stimuliert. Der sIL-6R wurde aus dem Zellkulturüberstand präzipitiert, anschließend entweder mit PNGase F, Deglyco-Mix oder ohne Enzym behandelt und mittels Western Blot analysiert. Ein repräsentatives von zwei durchgeführten Experimenten ist gezeigt.

Bei der Bestimmung der Schnittstelle wurden bereits die N-Glykosylierungsstelle N350 und die O-Glykosylierungsstelle T352 *in vivo* und *in vitro* detektiert (siehe Abbildung 25C und Abbildung 28B). Bei der Deglykosylierung durch PNGase F in der Gegenwart von $H_2^{18}O$ wurden die N-Glykosylierungsstellen an N55, N93, N221, N245 auf dem sIL-6R von PMA-stimulierten HEK-Zellen, die mit dem IL-6R transient transfiziert wurden, identifiziert (Abbildung 31A-D). Mit der Ausnahme von N245 konnten alle N-Glykosylierungsstellen ebenfalls auf dem sIL-6R aus humanem Serum verifiziert werden (siehe Abbildung 40A-C im Anhang). Da keine andere O-Glykosylierungsstelle neben T352 identifiziert wurde, besitzt der IL-6R zwei N-Glykane in der Domäne D1, zwei N-Glykane in der Domäne D3 und ein N- und ein O-Glykan in unmittelbarer Nähe der identifizierten Schnittstelle (siehe Abbildung 31E).

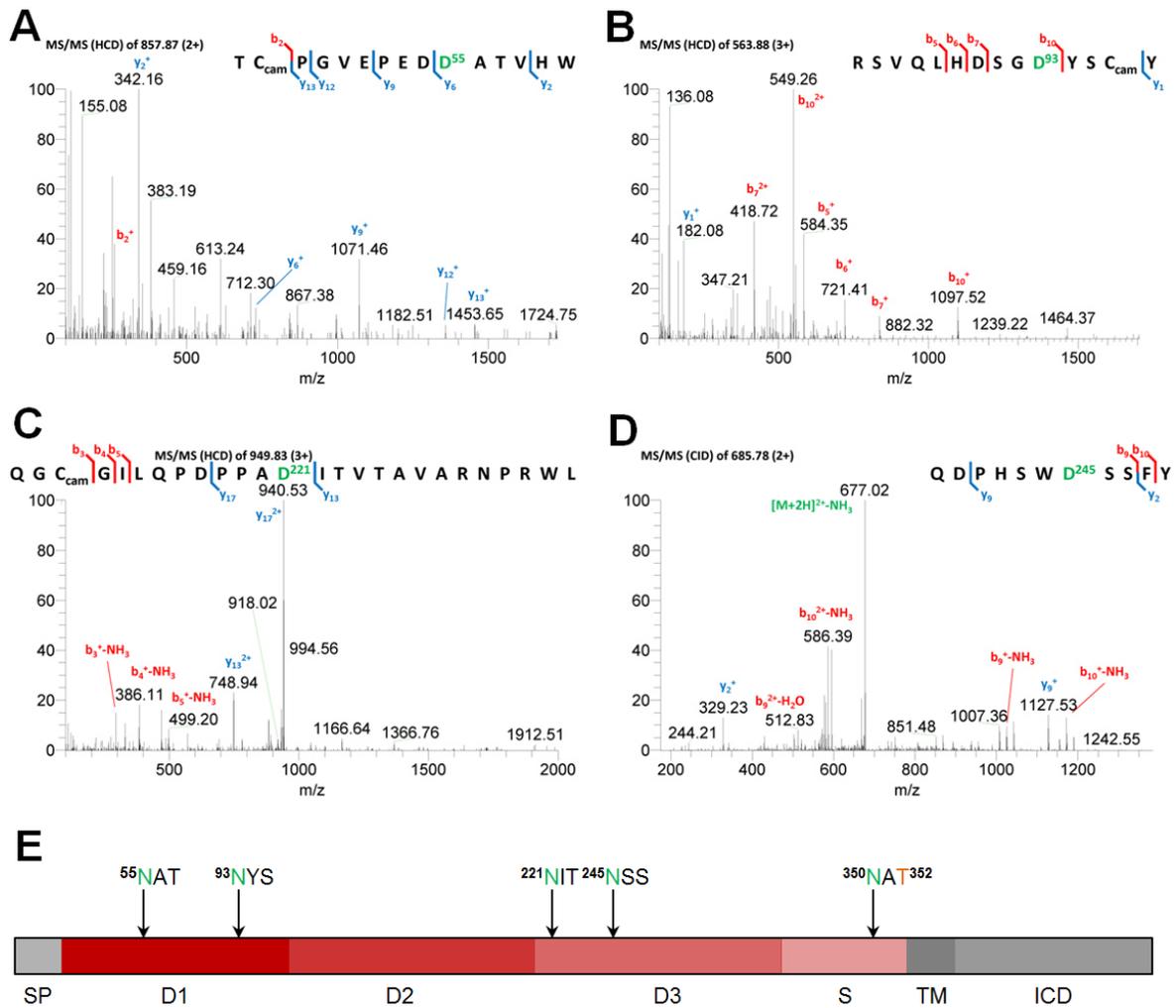


Abbildung 31: Nachweis von N-Glykosylierungsstellen des IL-6R *in vitro* mittels MS.

(A-D) MS/MS-Spektren (HCD) der mittels Computer-assistierter Datenbanksuche identifizierten Peptide, des aus Zellkulturüberstand präzipitierten sIL-6R, bei denen eine N-Glykosylierungsstelle nachgewiesen werden konnte. Die Aminosäurereste an Position N55, N93, N221 und N245, welche aufgrund der Behandlung mit PNGase F in der Gegenwart von H₂¹⁸O zu Asparaginsäureresten modifiziert wurden, sind in grün dargestellt. Die N-Glykosylierung von N350 wurde bereits in Abbildung 28B und Abbildung 29B nachgewiesen. Die Abbildungen (A-D) wurden von Prasath Somasundaram von der AG für systematische Proteomics und Bioanalytik (Leitung: Prof. Dr. Andreas Tholey) des Instituts für Experimentelle Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt. Die dargestellten Experimente wurden ebenfalls von Prasath Somasundaram durchgeführt. (E) Schematische Darstellung der verschiedenen Domänen und Bereiche des IL-6R sowie der fünf N- (grün) und der einen O-Glykanstelle (orange). SP: Signalpeptid; D: Domäne, S: Stalk-Bereich; TM: Transmembranbereich; ICD: Intrazelluläre Domäne.

3.12 N- und O-Glykane sind für den intrazellulären Transport und die Signaltransduktion des IL-6R entbehrlich

Um die funktionale Rolle der identifizierten Glykane zu untersuchen, wurden IL-6R-Mutanten, denen entweder eine, mehrere oder alle N-Glykosylierungsstellen fehlen, generiert und damit Ba/F3-gp130-Zellen stabil transduziert (siehe Abschnitt 2.2.3.5). Der Verlust der Glykosylierungsstellen wurde durch Punktmutation mittels SOE-PCR (siehe Abschnitt 2.2.1.2) unter Verwendung spezifischer Primer (siehe Tabelle 5) erreicht. Dabei wurden einzelne Basen in den Expressionsplasmiden so verändert, dass die glykosylierten Aminosäuren Asparagin und Threonin durch Alanin ersetzt wurden. Die generierten Inserts der pcDNA3.1-hIL-6R-Vektoren wurden wie in Abbildung 12B dargestellt, mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *SbfI* und *AgeI* in den pMOWS-Vektor eingeführt. Der Name und die Beschreibung der resultierenden pMOWS-Vektoren und der verwendeten pcDNA3.1-Vektoren ist Tabelle 7 zu entnehmen.

Die Analyse mittels Durchflusszytometrie zeigte, dass alle mutierten Varianten des IL-6R zur Zelloberfläche transportiert und dort exprimiert wurden (siehe Abbildung 32). Bei der Analyse der Proliferation in Abhängigkeit von IL-6 der einzelnen Ba/F3-gp130-Zelllinien konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem unveränderten IL-6R (siehe Abbildung 18) und den IL-6R-Mutanten, denen eine oder mehrere Glykosylierungsstellen fehlten (siehe Abbildung 33A-F), festgestellt werden. Die Verwendung von Hyper-IL-6 (Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R) dient auch hierbei als Positivkontrolle, um sicherzustellen, dass die untersuchten Zellen tatsächlich IL-6-dosisabhängig proliferieren.

Die IL-6R Mutanten, denen zwei (als N2 bezeichnet), drei (als N3 bezeichnet), vier (als N4 bezeichnet) (siehe Abbildung 32B-D) oder alle fünf (als N5 bezeichnet, siehe Abbildung 33F) N-Glykosylierungsstellen fehlten, zeigten ebenfalls eine ähnliche biologische Aktivität. Die Mutation der Glykosylierungsstelle T352 hatte auch keinen Einfluss auf die IL-6-Signaltransduktion (siehe Abbildung 33G). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Glykosylierungen des IL-6R unwichtig für den intrazellulären Transport und für die Zelloberflächenexpression des Rezeptors sind.

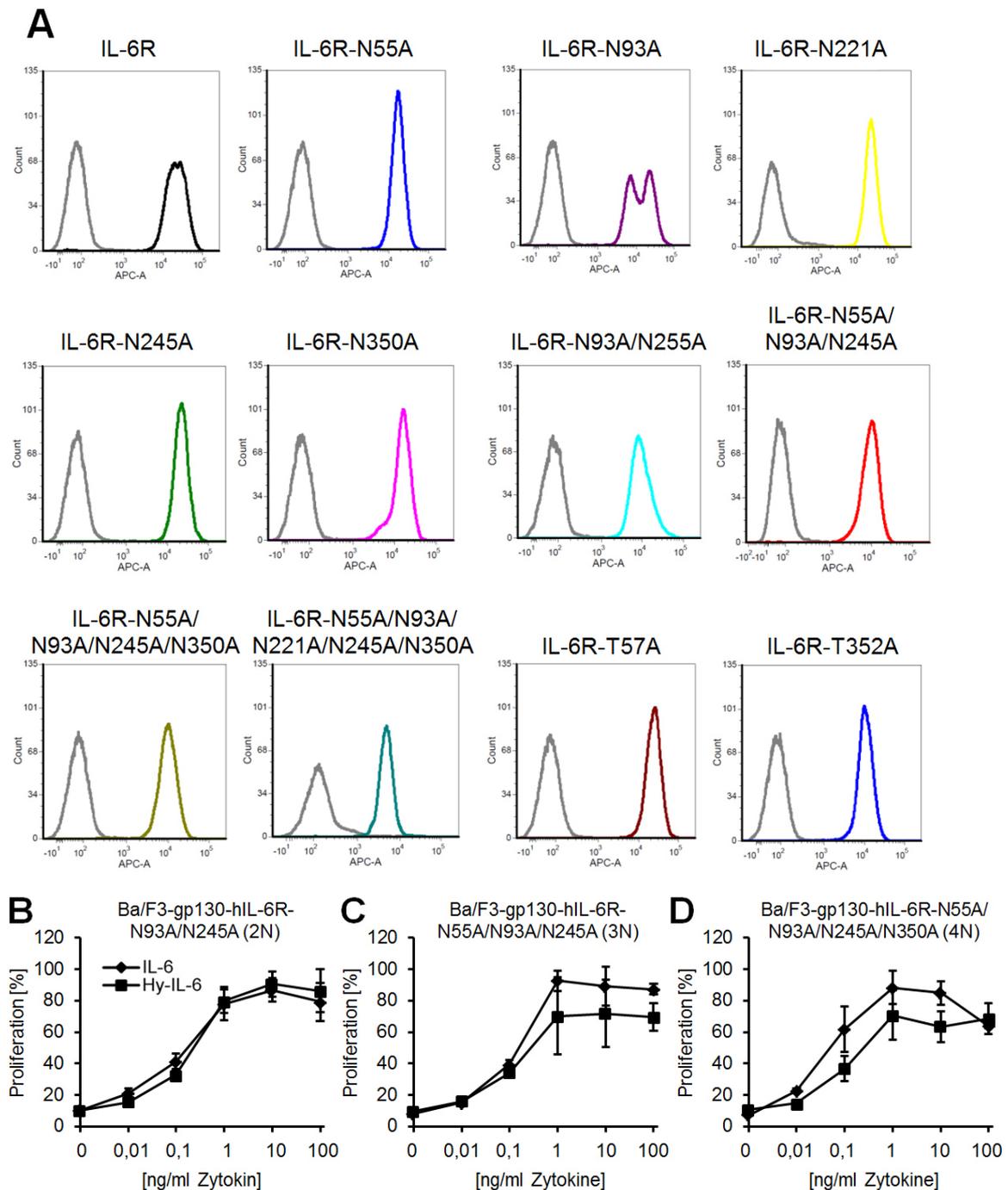


Abbildung 32: Zelloberflächenexpression und biologische Aktivität verschiedener Glykanmutanten des IL-6R.

(A) Zelloberflächenexpression des IL-6R auf verschiedenen Ba/F3-gp130-IL-6R-Zelllinien. Der Name der stabil transduzierten IL-6R-Mutante ist über dem zugehörigen Histogramm angegeben. Die Fluoreszenzfärbung ist farblich und die ungefärbte Kontrolle in grau dargestellt. Es ist ein repräsentatives Ergebnis von drei durchgeführten unabhängigen Experimenten gezeigt. (B-D) Die gleiche Anzahl der jeweils angegebenen Ba/F3-gp130-IL-6R-Zelllinie wurde für 48 h mit ansteigenden Konzentrationen (0-100 ng/ml) an entweder IL-6 oder Hyper-IL-6 (Positivkontrolle) inkubiert. Die Werte zeigen den Mittelwert (\pm S. D.) in Prozent im Vergleich zum unveränderten IL-6R eines repräsentativen Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

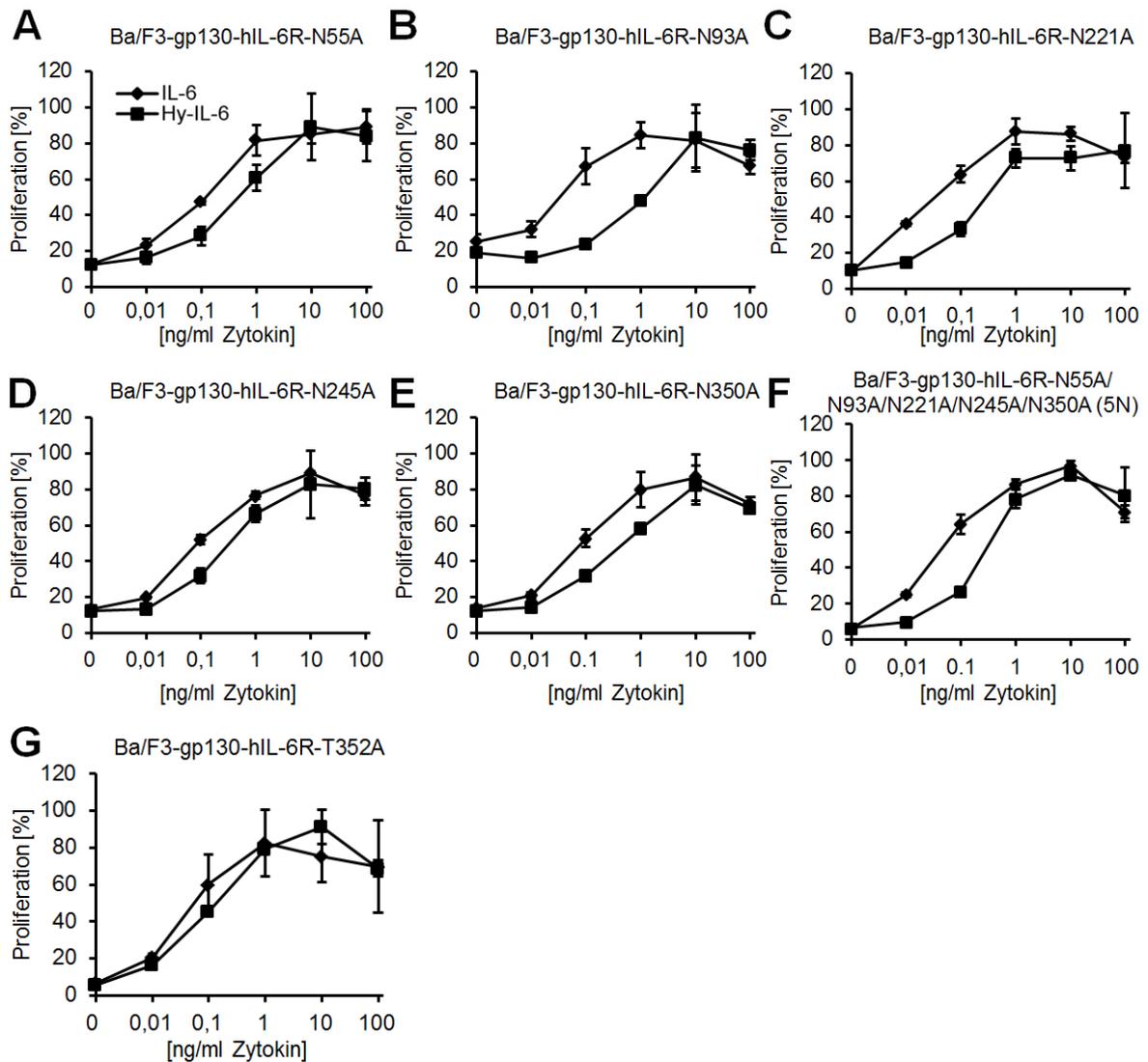


Abbildung 33: Biologische Aktivität verschiedener Glykanmutanten des IL-6R.

(A-G) Die gleiche Anzahl an Ba/F3-gp130-Zellen wurde für 48 h mit ansteigenden Konzentrationen (0-100 ng/ml) an IL-6 oder Hyper-IL-6 (Positivkontrolle) unter Standardbedingungen kultiviert. Die jeweils untersuchte stabil transduzierte IL-6R-Variante ist über dem dazugehörigen Diagramm angegeben. Die Zellviabilität wurde wie im Abschnitt 2.2.3.7 beschrieben analysiert. Die Werte zeigen den Mittelwert (\pm S. D.) in Prozent im Vergleich zum unveränderten IL-6R eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten.

3.13 Das N-und O-Glykanpaar in unmittelbarer Nähe der identifizierten Schnittstelle hat nur einen geringen Einfluss auf die Proteolyse des IL-6R

Nachdem ausgeschlossen werden konnte, dass die Glykosylierungen des IL-6R Einfluss auf die Signaltransduktion des IL-6R haben, wurde die mögliche Rolle der Glykane auf die Proteolyse des IL-6R untersucht. Dabei konzentrierten sich diese Untersuchungen zunächst auf das identifizierte Glykanpaar an N350/T352 in unmittelbarer Nähe der identifizierten ADAM10/17-Schnittstelle, welches mittels eines *in vitro Cleavage Assays* untersucht wurde. Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe, in denen O-glykosylierte und unglykosylierte IL-6R-Peptide mit rekombinantem ADAM17 geschnitten wurden, zeigten, dass O-Glykosylierungen die ADAM17-vermittelte Prozessierung des IL-6R-Peptids inhibieren (Goth et al. 2015).

In dieser Arbeit wurden zehn verschiedene (Glyko)-Peptide untersucht, die entweder der unveränderten Aminosäuresequenz von N342 bis P365 (QD) oder der Aminosäuresequenz Sequenz mit der D358A-Mutation (QA) des vollständigen IL-6R in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran entsprechen. Die D358A-Mutation (QA) basiert auf einem *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) in Exon 9 des IL-6R Gens. Dieser SNP führt zum Austausch der Aminosäure D358 zu A358 und sorgt somit für eine Verdopplung der Konzentration an sIL-6R in humanem Serum (Galiccia et al. 2004; Garbers et al. 2014). Dieser Anstieg an sIL-6R ist auf erhöhte ADAM17-vermittelte Proteolyse des membranständigen IL-6R zurückzuführen (Garbers et al. 2014). Es ist also zu erwarten, dass das Peptid 2(QA) deutlich besser als das Peptid 1(QD) von ADAM17 prozessiert wird.

Alle untersuchten (Glyko)-Peptide wurden jeweils einmal mit und einmal ohne die rekombinante katalytische Domäne von ADAM17 für 16 h inkubiert und anschließend mittels RP-Chromatographie aufgetrennt. Die untersuchten Glykopeptide wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Carlo Unverzagt am Lehrstuhl für Bioorganische Chemie der Universität Bayreuth hergestellt. Anschließend wurden die Peakflächen des RP-Chromatogramms bei einer Wellenlänge von 214 nm mittels Integration bestimmt. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurden die Peakflächen des ungeschnittenen Peptids beider Ansätze miteinander verglichen, wobei die Peakfläche des Peptids, das nicht mit der katalytischen Domäne von ADAM17 behandelt wurde, bei der Auswertung auf 100% gesetzt wurde. Somit werden in Abbildung 34 jeweils die Menge des ungeschnittenen Peptids angegeben.

Während das unglykosylierte Peptid 1(QD) nur minimal, aber signifikant geschnitten wurde ($85,98 \pm 4,23\%$ ungeschnitten, $p < 0,05$, siehe Abbildung 34A), wurde das korrespondierende Peptid 2(QA) komplett geschnitten ($1,0 \pm 1,0\%$ ungeschnitten, $p < 0,001$, siehe Abbildung 34A). Somit ist das Peptid 2(QA) ein deutlich besseres ADAM17-Substrat als das Peptid 1(QD), was die oben beschriebene Erwartung bestätigt. Das unglykosylierte durch ADAM17 prozessierte Peptid 1(QD) wurde massenspektrometrisch untersucht. Hierbei konnte ebenfalls wie in den Untersuchungen von Goth et al. (Goth et al. 2015) eine ADAM17-Schnittstelle zwischen P und V (siehe Abbildung 41 im Anhang), die den Aminosäuren P355 und V356 im vollständigen IL-6R entsprechen, identifiziert werden.

Das Anhängen eines N-Acetylglukosamins (GlcNAc) an den Aminosäurerest, der N350 im vollständigen IL-6R entspricht, reduzierte die Proteolyse des Peptids 3(QD) ($91,4 \pm 9,4\%$ ungeschnitten), aber veränderte nicht die Prozessierung des 4(QA) Peptids ($0,4 \pm 0,7\%$ ungeschnitten, siehe Abbildung 34B). Interessanterweise führte das Anhängen eines deutlich größeren, verzweigten N-Glykans zur Blockade der Proteolyse des 5(QD) Peptids (siehe Abbildung 34C), aber veränderte nicht die Prozessierung des 6(QA) Peptids (siehe Abbildung 34C). Das Anhängen eines N-Acetylgalaktosamins (GalNAc) an den Aminosäurerest, der T352 im vollständigen IL-6R entspricht, senkte interessanterweise die Proteolyse des 7(QD) Peptids ($91 \pm 8\%$, siehe Abbildung 34D), aber senkte auch das Shedding des 8(QA) Peptids im Vergleich zum unglykosylierten Peptid ($10,8 \pm 5,4\%$ ungeschnitten, $p < 0,05$ im Vergleich zum geschnittenen nicht glykosylierten Peptid, siehe Abbildung 34D). Es konnte ein endogenes GalNAc-Motiv an T352 des IL-6R, jedoch aber kein GlcNAc an dieser Position als erster Glykan-Baustein identifiziert werden (siehe Abbildung 25C, Abbildung 28B und Abbildung 29B sowie Abbildung 26, Abbildung 38 und Abbildung 39 im Anhang). Somit spiegelt das untersuchte Glyco-Peptid nicht genau die *in vivo* bzw. *in vitro* Situation wieder.

Als das verzweigte N-Glykan am Aminosäurerest, der N350 im vollständigen IL-6R entspricht, mit einem GalNAc an dem Aminosäurerest, der T352 im vollständigen IL-6R entspricht, kombiniert wurde, war die Proteolyse des 9(QD) Peptids ebenfalls blockiert (siehe Abbildung 34E). Jedoch blieben $14,7 \pm 6,3\%$ des 10(QA) Peptids intakt (siehe Abbildung 34E), was auf einen additiven Effekt der Glykane schließen lässt. Somit konnte, wie auch in den Untersuchungen von Goth et al. (Goth et al. 2015), ein inhibitorischer Einfluss der Glykosylierungen auf die ADAM17-vermittelte Proteolyse des IL-6R-Peptids gezeigt werden, auch wenn dieser Effekt in dieser Untersuchung eher gering ausfällt.

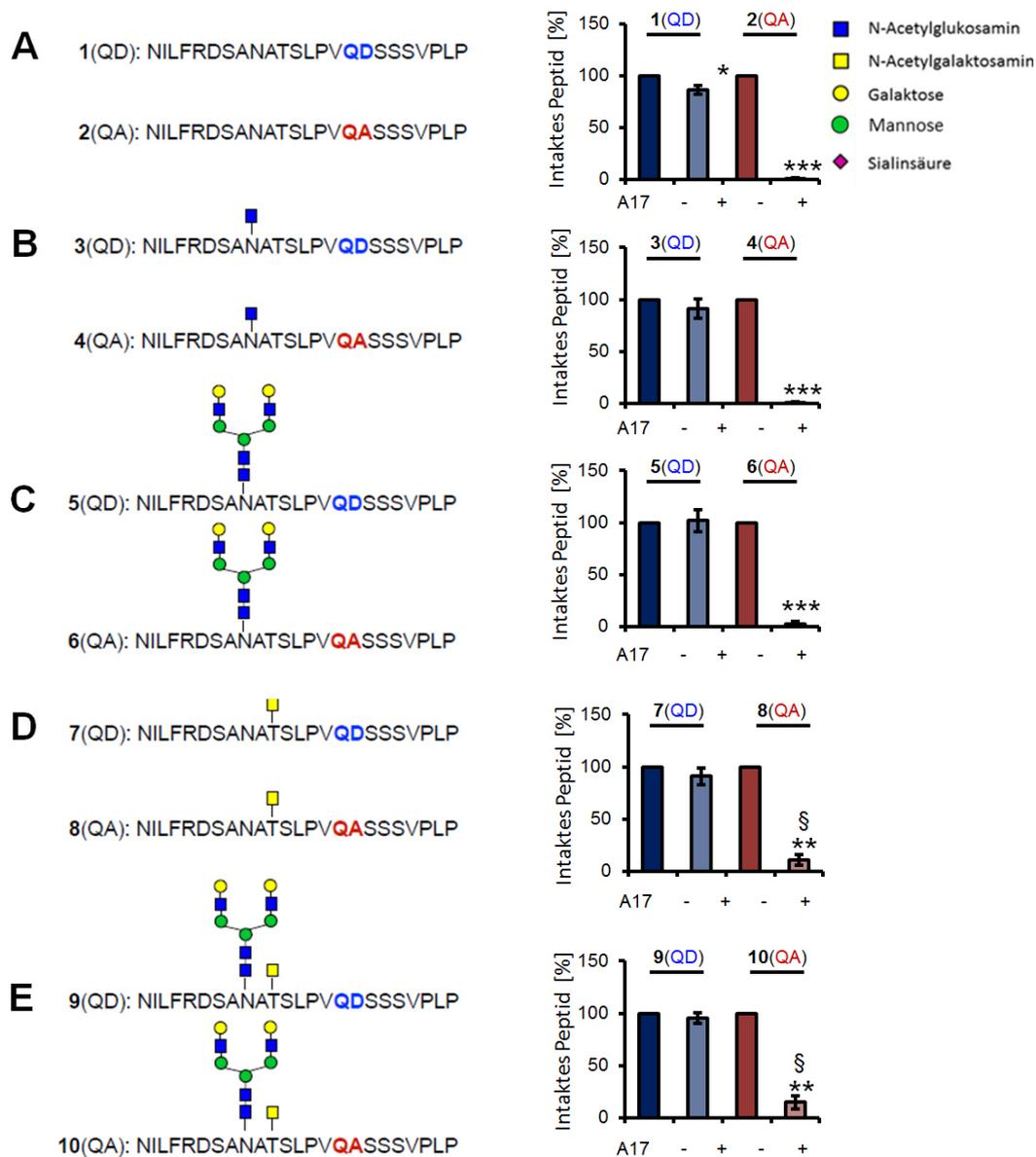


Abbildung 34: ADAM17 *in vitro* Cleavage Assay mit Glykopeptiden des IL-6R-Stalk-Bereichs.

Alle verwendeten Peptide wurden entweder mit oder ohne rekombinante katalytische Domäne von ADAM17 für 16 h bei 37°C in 25 mM Trispuffer (pH 9) inkubiert und anschließend mittels RP-Chromatographie getrennt. Die Menge der ungeschnittenen Peptide wurde anschließend mittels Peakflächenbestimmung des RP-Chromatogramms bei 214 nm ermittelt. Die Peakfläche des Peptids, das nicht mit der katalytischen Domäne von ADAM17 behandelt wurde, wurde bei der Auswertung auf 100% gesetzt. Die untersuchten Peptide (QD) entsprechen der Aminosäuresequenz von N342 bis P365 des vollständigen IL-6R in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran. Die Peptide (QA) basieren auf der oben beschriebenen D358A-Mutation. (A) Aminosäuresequenzen von zwei unglykosylierten Peptiden 1(QD) und 2(QA). (B) Aminosäuresequenzen der zwei Glykopeptide 3(QD) und 4(QA), an die ein GlcNac an den Aminosäurerest, der N350 im vollständigen IL-6R entspricht, angehängt wurde. (C) Aminosäuresequenzen der zwei Glykopeptide 5(QD) und 6(QA) an die ein verzweigtes N-Glykan an den Aminosäurerest, der N350 im vollständigen IL-6R entspricht, angehängt wurde. (D) Aminosäuresequenzen der zwei Glykopeptide 7(QD) und 8(QA) an die ein GalNac an den Aminosäurerest, der T352 im vollständigen IL-6R entspricht, angehängt wurde. (E) Aminosäuresequenzen der zwei Glykopeptide 9(QD) und 10(QA), an die ein verzweigtes N-Glykan und ein GalNac an die Aminosäurereste, die N350 und T352 im vollständigen IL-6R entsprechen, angehängt wurden. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert (\pm S. D.) von drei unabhängigen Experimenten. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zum unbehandelten Peptid; § $p < 0,05$ im Vergleich zum geschnittenen nicht glykosylierten Peptid). Die Glykopeptide wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Carlo Unverzagt am Lehrstuhl für Bioorganische Chemie der Universität Bayreuth hergestellt.

3.14 Das N-Glykan an Position N93 in der Domäne D1 des IL-6R fungiert als Regulationsstelle der ADAM17-vermittelten Proteolyse *in vitro*

Um den Einfluss der Glykosylierung auf ADAM17-vermitteltes Shedding zu untersuchen, wurden Ba/F3-gp130-Zelllinien mit PMA stimuliert und die Konzentration des entstandenen sIL-6R im Überstand mittels ELISA analysiert. Bei der Auswertung wurde die Konzentration des entstandenen sIL-6R der PMA-stimulierten Ba/F3-gp130-IL-6R-Zelllinie auf 100% gesetzt und die Werte aller anderen Zelllinien dementsprechend berechnet (siehe Abbildung 35A). Die Inkubation mit DMSO diente als Negativkontrolle. Überraschenderweise verstärkte die Mutation von N55 das PMA-induzierte Shedding des IL-6R ($348 \pm 116\%$), was darauf hindeutet, dass dieses N-Glykan eine sogenannte *Exosite* darstellt, welche die ADAM17-vermittelte Proteolyse des IL-6R reguliert (siehe Abbildung 35B). Diese *Exosite* stellt möglicherweise eine sekundäre ADAM17-Bindungsstelle im IL-6R dar, die räumlich weit von der ADAM17-Schnittstelle entfernt ist.

Das unstimulierte Shedding (von DMSO-behandelten Zellen) war ebenfalls erhöht und die Konzentration war sogar höher als die des PMA-stimulierten IL-6R ($148 \pm 25\%$, $p < 0,05$ siehe Abbildung 35B), obwohl beide Rezeptoren eine ähnliche Zelloberflächenexpression aufwiesen (siehe Abbildung 32A im Anhang). Da ADAM10 hauptverantwortlich für das konstitutive Shedding des IL-6R zu sein scheint (Matthews et al. 2003), lässt sich vermuten, dass die N55A Mutante auch deutlich besser von ADAM10 prozessiert wird, als der unveränderte IL-6R (siehe Abbildung 35A,B).

Um zu beweisen, dass das Glykan und nicht das A55 für diesen Effekt verantwortlich ist, wurde T57 mutiert, was zum Verlust der Konsensus-Sequenz und somit zum Verlust des N-Glykans führt. Auch hier konnte eine vergleichbare Erhöhung des IL-6R Sheddings beobachtet werden ($291 \pm 64\%$ PMA-stimuliert und $126 \pm 9\%$ unstimuliert, beide $p < 0,05$, siehe Abbildung 35C). Die Entfernung der N-Glykanstellen N93 und N221 verstärkte nicht die Entstehung des sIL-6R (siehe Abbildung 35D,E). Es wurde ein leicht erhöhtes Shedding der Mutante N245 beobachtet ($215 \pm 82\%$, Abbildung 35F). Die kombinierte Mutation von N93 und N245 (2N) verstärkte nicht die Proteolyse des IL-6R. Allerdings wiesen die 3N und 4N- Mutanten, in denen N55 mutiert war, erhöhtes ADAM17-vermitteltes Shedding des IL-6R auf (siehe Abbildung 35H,I), was ebenfalls auf die Existenz einer ADAM17-*Exosite* an N55 hindeutet.

Passend zu den Ergebnissen des ADAM17 *in vitro* Cleavage Assays (siehe Abbildung 34) erhöhte die Mutation der O und N-Glykanstellen N350 und T352 nur sehr leicht die Proteolyse des IL-6R (siehe Abbildung 35J,K). Zusammenfassend stellt das N-Glykan an N55 innerhalb der D1-Domäne des IL-6R eine *Exosite* dar, die die induzierte ADAM17-vermittelte Proteolyse und konstitutive Proteolyse des IL-6R reduziert.

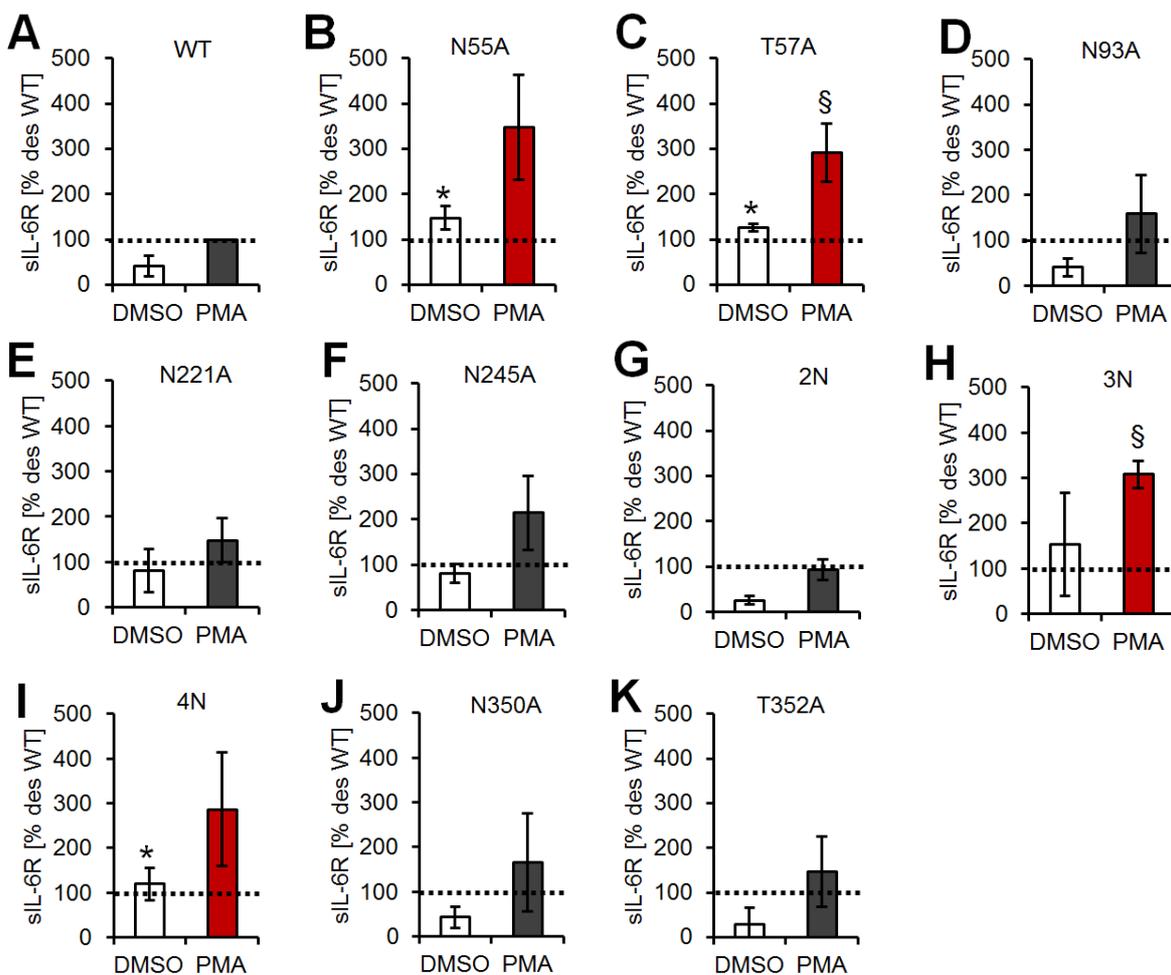


Abbildung 35: PMA-vermitteltes Shedding der IL-6R-Mutanten, bei denen eine oder mehrere Glykosylierungsstellen entfernt wurden.

(A-K) Das Experiment wurde mit stabil transduzierten Ba/F3-gp130-Zelllinien durchgeführt. Die gleiche Anzahl an Zellen wurde entweder mit PMA oder DMSO für 2 h behandelt und der entstandene sIL-6R im Überstand anschließend mittels ELISA analysiert. Die IL-6R-Mutante ist über dem zugehörigem Diagramm angegeben. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert (\pm S. D.) von drei unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$ im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen; § $p < 0,05$ im Vergleich zu den mit PMA behandelten Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen).

3.15 Ein IL-6R ohne N-Glykane wird nicht von ADAM17 prozessiert

Abschließend wurde die Proteolyse der 5N-Mutante, bei der alle N-Glykosylierungsstellen fehlen, untersucht. Überraschenderweise wurde ein signifikant reduziertes PMA-induziertes Shedding dieser 5N-Mutante im Vergleich zum unveränderten IL-6R detektiert ($27,2 \pm 17,2\%$, siehe Abbildung 36A). Des Weiteren konnte ebenfalls eine niedrigere Zelloberflächenexpression des Rezeptors mittels Durchflusszytometrie in der Ba/F3-gp130-IL-6R-5N-Zelllinie im Vergleich zum unveränderten IL-6R in der Ba/F3-gp130-IL-6R-Zelllinie beobachtet werden (siehe Abbildung 32A), die aber alleine nicht die deutlich reduzierte Proteolyse dieser Mutante erklären kann.

Um diese Beobachtungen zu verifizieren, wurden HEK293-Zellen transient mit cDNAs transfiziert, die für den unveränderten IL-6R oder für die 5N-Mutante kodieren, und das ADAM17-vermittelte Shedding mittels ELISA und Western Blot analysiert (siehe Abbildung 36A). Die PMA-Stimulation induzierte erneut eine verstärkte Proteolyse des unveränderten IL-6R (siehe Abbildung 36B,C), jedoch konnte keine Proteolyse der 5N-Mutante mittels ELISA (siehe Abbildung 36D) oder Western Blot detektiert werden (siehe Abbildung 36E), obwohl die 5N-Mutante mittels Western Blot in den Zelllysaten detektiert werden konnte (siehe Abbildung 36E) und auch in HEK293-Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert wurde (siehe Abbildung 36F). Zwar ist die Oberflächenexpression der 5N-Mutante geringer als die des unveränderten IL-6R (siehe Abbildung 13 und Abbildung 36F), jedoch würde diese Menge an membranständigem IL-6R ausreichen, um nach PMA-Stimulation den prozessierten sIL-6R im Zellkulturüberstand der HEK293-IL-6R-5N-Zellen detektieren zu können. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich die Gründe für die gestörte ADAM17-Proteolyse der 5N-Mutante zu untersuchen. Es lässt sich zusammenfassen, dass ein IL-6R ohne N-Glykane nicht mehr von ADAM17 prozessiert werden kann.

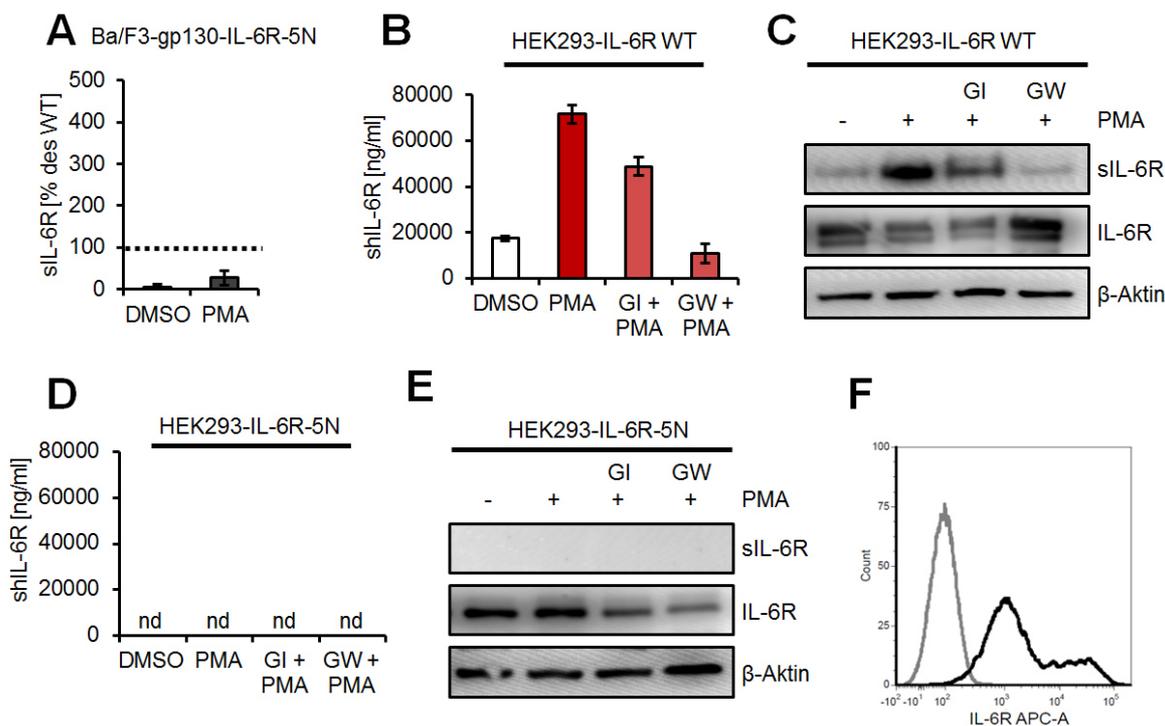


Abbildung 36: PMA-vermitteltes Shedding einer IL-6R-Mutante, die keine N-Glykosylierungsstellen besitzt.

(A) PMA-vermitteltes Shedding der stabil transduzierten Ba/F3-gp130-IL-6R-5N-Zellen. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert (\pm S. D.) im Vergleich zum PMA-stimulierten unveränderten hIL-6R von drei unabhängigen Experimenten. (B) HEK293-Zellen wurden transient mit der cDNA, die für den unveränderten IL-6R kodiert, transfiziert. Die Zellen wurden 30 min vor der Stimulation mit PMA (100 nM) mit den Inhibitoren GI und GW behandelt. Die Entstehung des sIL-6R im Überstand wurde mittels ELISA analysiert. (C) Das Experiment wurde wie in Sektion B durchgeführt. Der sIL-6R wurde allerdings mittels Concanavalin-A Beads präzipitiert und mittels Western Blot analysiert. Des Weiteren wurden die Zellen lysiert und die IL-6R-Expression in den Lysaten ebenfalls mittels Western Blot analysiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Ein repräsentatives Experiment von drei durchgeführten Experimenten ist dargestellt. (D-E) Das Experiment wurde wie in Sektion B und C durchgeführt, allerdings wurden die HEK293-Zellen in diesem Fall transient mit cDNA, die für die IL-6R-5N-Mutante kodiert, transfiziert. (F) Die Oberflächenexpression des IL-6R-5N auf transient transfizierten HEK293-IL-6R-5N Zellen wurde 48 h nach Transfektion mittel Durchflusszytometrie überprüft. Das schwarze Histogramm zeigt die Zelloberflächenexpression. Die Negativkontrolle ist in grau dargestellt.

4 DISKUSSION

4.1 Das 3S-Motiv im IL-6R-Stalk-Bereich

Bei ADAM10 und ADAM17 handelt es sich um katalytische Enzyme, die in vielen physiologischen und pathologischen Situationen eine wichtige Rolle spielen. Einige Substrate werden nur von ADAM10 geschnitten, während andere nur von ADAM17 oder von beiden Proteasen prozessiert werden. Bis heute ist nicht genau geklärt, wie beide Proteasen ihr Substrat erkennen. Verschiedene strukturelle Untersuchungen beider Metalloproteasen und ihrer Substrate haben jedoch ergeben, dass die spezifische Interaktion von Substrat und Protease hierbei eine wichtige Rolle einnimmt. In dieser Arbeit konnte ein 3S-Motiv im Stalk-Bereich des IL-6R identifiziert werden, das auch in ähnlicher Form in den beiden ADAM17-Substraten TNF α und CD163 in der Nähe der Plasmamembran zu finden ist. Dieses 3S-Motiv befindet sich in unmittelbarer Nähe der ADAM17-Schnittstelle zwischen Q357 und D358 (Müllberg et al. 1994). Es wurde gezeigt, dass die Deletion dieses 3S-Motivs im IL-6R nicht das Shedding von ADAM10 blockiert, aber ausreicht, um die Proteolyse des IL-6R durch ADAM17 zu verhindern.

Es konnten bereits mehr als 100 Substrate identifiziert werden, die entweder von ADAM10, ADAM17 oder von beiden Proteasen prozessiert werden. Hierbei befanden sich alle identifizierten Schnittstellen dieser beiden Proteasen in der Nähe der Plasmamembran (Rawlings et al. 2014). Es wurde bereits gezeigt, dass die Deletion von zehn Aminosäuren (S353-V362) zu einem IL-6R führt, der nicht von ADAM17 prozessiert werden kann (Müllberg et al. 1994). Das Shedding einer weiteren Variante des IL-6R (IL-6R Δ D358_V362), in der ebenfalls das 3S-Motiv deletiert wurde, war ebenfalls blockiert. Eine Variante, der 35 Aminosäuren innerhalb des Stalk-Bereichs fehlen, zeigte nur eine sehr geringe sIL-6R-Bildung (4% im Vergleich zum genetisch unveränderten IL-6R), obwohl die Schnittstelle nach Müllberg et al. sowie die in dieser Arbeit bestimmte ADAM17-Schnittstelle zwischen P355 und V356 unverändert war (Baran et al. 2013). Dies unterstreicht die Möglichkeit, dass neben der Schnittstelle andere Bereiche des IL-6R von ADAM17 erkannt werden müssen, um die Proteolyse zu ermöglichen.

Die Deletion des 3S-Motivs (S359-S361) hat keine Auswirkung auf die IL-6-Signaltransduktion und lässt die Aminosäuresequenz der in dieser Arbeit bestimmten ADAM17-Schnittstelle ebenfalls intakt, verhindert aber die Proteolyse des IL-6R. Dies lässt auf eine wichtige Rolle der Aminosäuren, die sich hinter der Schnittstelle befinden, bei der Substraterkennung von ADAM17 schließen. Allerdings reduziert die Deletion die Distanz zwischen Schnittstelle und Plasmamembran von ca. 28,6 Å auf ca. 17,2 Å. Um zwischen einer sterischen Hinderung und einem direkten Effekt des 3S-

Motivs zu unterscheiden, wurden die drei Serine durch die Aminosäuren Glutaminsäure, Lysin und Lysin (EKK) ersetzt, die an dieser Stelle laut dem ADAM17-Schnittprofil unerwünscht sind (Tucher et al. 2014). Auch bei dieser Substitution lieferte die von Müllberg et al. bestimmte ADAM17-Schnittstelle den Ausgangspunkt (Müllberg et al. 1994) der Mutationsstrategie, da zu dieser Zeit die ADAM17-Schnittstelle, die in dieser Arbeit identifiziert worden ist, noch nicht bekannt war. Wenn man von der hier identifizierten ADAM17-Schnittstelle P355/V356 ausgeht, liegen die Aminosäuren Glutaminsäure, Lysin und Lysin vier bis sechs Positionen hinter der ADAM17-Schnittstelle. Da diese Aminosäuren an diesen Positionen ebenfalls von ADAM17 nicht favorisiert sind (Tucher et al. 2014), dürfte die Verwendung der IL-6R-EKK-Variante auch in diesem Fall sinnvoll sein, um den direkten Effekt des 3S-Motivs zu untersuchen. Die IL-6R-EKK-Variante wurde ähnlich wie der genetisch unveränderte IL-6R durch ADAM17 prozessiert, was darauf schließen lässt, dass die gestörte ADAM17-vermittelte Proteolyse der IL-6R-Δ3S-Variante durch die Reduzierung der Distanz zwischen Plasmamembran und der Schnittstelle verursacht wurde. Dies steht im klaren Gegensatz zu den anderen ADAM17-Substraten TNF α und CD163, bei denen eine Mutation innerhalb des Serin-Motivs ausreicht, um ADAM17-vermittelte Proteolyse zu verhindern (Etzerodt et al. 2014). Interessanterweise war ADAM10 in der Lage, den IL-6R Δ S359_S361 zu prozessieren. Demnach scheinen diese Aminosäuren sowie der Distanzverlust zur Plasmamembran weniger wichtig für die Proteolyse des IL-6R durch ADAM10 zu sein, was einen Unterschied der beiden Proteasen bezüglich ihrer Substratspezifität unterstreicht.

Die Shedding-Analyse des IL-6R wird oft unter Verwendung von spezifischen Inhibitoren oder mit Hilfe Protease-defizienter muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs) durchgeführt. Interessanterweise kann die Proteolyse in ADAM10^{-/-} MEFs auch mit Ionomycin stimuliert werden, obwohl ADAM10 fehlt. Die Verwendung des spezifischen ADAM10 und ADAM17 Inhibitors GW reduzierte die Entstehung des sIL-6R von Ionomycin stimulierten ADAM10^{-/-} MEFs deutlich (Garbers et al. 2011). Dies lässt darauf schließen, dass bei der Abwesenheit von ADAM10 ADAM17 für das kompensatorische Shedding des IL-6R verantwortlich ist. Zudem wurde schon mehrmals gezeigt, dass ein Calciumeinstrom in genetisch unveränderten Zellen nur ADAM10 aktiviert (Jones et al. 1998; Le Gall et al. 2009; Garbers et al. 2011). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieses kompensatorische Shedding in HEK293-A10^{-/-}-Zellen nicht existiert. Weitere Untersuchungen könnten sich mit dem Mechanismus beschäftigen, der in ADAM10^{-/-} MEFs für das kompensatorische Shedding verantwortlich ist. Hierbei könnte auch untersucht werden, wie ADAM17 mittels Calciumeinstrom in diesen Zellen aktiviert wird.

4.2 Entstehung des sIL-6R

Lösliche Zytokinrezeptoren spielen in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen (Bjerner et al. 2002; Egler et al. 2008; Chayanupatkul & Honsawek 2010; Myles et al. 2011; Neiryneck et al. 2015) eine elementare Rolle. Sie zeigen ähnliche Bindungsaffinitäten wie ihre membranständigen Pendanten, solange die ligandenbindende Region intakt ist. Die Mehrheit der löslichen Rezeptoren besitzt antagonistische Eigenschaften, weil sie mit den membranständigen Rezeptoren um das Zytokin konkurrieren. Die Zytokine, die an den löslichen Rezeptor gebunden haben, sind nicht mehr in der Lage an ihren membranständigen Rezeptor zu binden und somit ihre Zielzelle zu aktivieren. Das bekannteste Beispiel für eine antagonistische Wirkung ist der lösliche TNF-Rezeptor (Aderka et al. 1991). Ein Fc-Fusionsprotein aus zwei extrazellulären Bereichen des TNF-Rezeptors 2 (TNFR2) inhibiert das TNF-Signaling und ist unter dem Namen Etanercept für die Behandlung Rheumatoider Arthritis und Schuppenflechte in Deutschland zugelassen.

Ein Beispiel für eine agonistische Wirkungsweise liefert der sIL-6R (Jones & Rose-John 2002), der im Komplex mit IL-6 aufgrund der ubiquitären Expression von gp130 prinzipiell alle Zellen des menschlichen Körpers aktivieren kann. Somit können Zellen, die den IL-6R nicht exprimieren, über *IL-6-trans-signaling* aktiviert werden, obwohl sie normalerweise nicht responsiv für IL-6 sind. Des Weiteren wurde gezeigt, dass *IL-6-trans-signaling* hauptsächlich für proinflammatorische Prozesse verantwortlich ist, und dass eine spezifische Blockade von *IL-6-trans-signaling* bei der Behandlung von Krankheiten, wie zum Beispiel einer polymikrobiellen Sepsis (Barkhausen et al. 2011), sinnvoller ist als eine globale IL-6 Blockade (Jones et al. 2011; Garbers et al. 2015).

Überraschenderweise ist trotz der wichtigen Rolle des *IL-6-trans-signaling* sehr wenig über die Mechanismen, die für die Entstehung des sIL-6R im Menschen verantwortlich sind, bekannt. Lösliche Zytokinrezeptoren werden entweder durch alternatives Spleißen der Vorläufer-RNA oder durch proteolytische Prozessierung des membrangebundenen Rezeptors generiert. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass eine Isoform des sIL-6R im humanen Serum existiert, die einen C-Terminus besitzt, der nur durch alternatives Spleißen der *IL6R* mRNA entsteht (Müller-Newen et al. 1996). Allerdings konnte in mehreren Studien und auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Großteil des sIL-6R im humanen Serum nicht den C-Terminus der alternativ gespleißten Isoform (ds-sIL-6R) besitzt (Horiuchi et al. 1998; Dimitrov et al. 2006; Leggate et al. 2010; Garbers et al. 2014). Eine Einschränkung dieses Ergebnisses ist allerdings, dass sich im C-Terminus des ds-sIL-6R viele Arginine befinden, die bevorzugt von Serin-Endopeptidasen wie zum Beispiel Matriptasen prozessiert werden (Rawlings et al. 2014). Der prozessierte C-Terminus könnte dann gegebenenfalls nicht mehr vom ds6R-Antikörper erkannt werden, was zu einer Unterschätzung der

Menge des ds-sIL-6R führen würde. Dieses Szenario ist allerdings nicht sehr wahrscheinlich, da es sich bei dem ds6R-Antikörper um einen polyklonalen Antikörper handelt, der möglicherweise auch prozessierte C-Termini erkennen könnte.

Der Großteil des sIL-6R muss demzufolge durch einen anderen Mechanismus als das alternative Spleißen entstehen. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal ein C-Terminus des sIL-6R mittels Massenspektrometrie identifiziert werden, der durch proteolytische Spaltung des membranständigen IL-6R entstanden ist. Interessanterweise wurde der IL-6R zwischen den Aminosäuren P355 und V356 gespalten, was nicht zu der von Müllberg et al. publizierten ADAM17 Schnittstellen zwischen Q357 und D358 passt (Müllberg et al. 1994). Die in dieser Arbeit gezeigte Modellierung des katalytischen Zentrums von ADAM17 (siehe Abbildung 27) lässt drauf schließen, dass ADAM17 die Proteolyse zwischen P355 und V356 im IL-6R-Stalk-Bereich bevorzugt. Außerdem ist der IL-6R laut der MEROPS-Datenbank das einzige Substrat von ADAM17, das zwischen einem Glutamin und einer Asparaginsäure gespalten wird, während eine Proteolyse zwischen Prolin und Valin auch für andere Substrate beschrieben ist (Rawlings et al. 2014).

Die bei dem sIL-6R aus humanem Serum identifizierte Schnittstelle zwischen P355 und V356 konnte bei dem *in vitro* generierten sIL-6R bestätigt werden. Hierbei wurden HEK293-Zellen, die den IL-6R überexprimieren, mit PMA behandelt, und der sIL-6R aus dem Überstand isoliert und massenspektrometrisch analysiert. Untersuchungen von Goth et al., in denen ein Peptid des IL-6R-Stalk-Bereichs mit der rekombinanten katalytischen Domäne von ADAM17 inkubiert wurde, zeigten ebenfalls, dass die ADAM17-Schnittstelle zwischen P355 und V356 liegt (Goth et al. 2015). Untersuchungen in dieser Arbeit mit einem ähnlichen Peptid des IL-6R-Stalk-Bereichs bestätigten diese ADAM17-Schnittstelle (P355/V356). Zudem zeigen die Schnittstellenprofile von ADAM17 in der MEROPS-Datenbank und von Tucher et al. eine starke Präferenz von Valin an der P1' Position und zeigen ebenfalls, dass Asparaginsäure an dieser Stelle nicht favorisiert ist (Rawlings et al. 2014; Tucher et al. 2014). Allerdings kann auch in diesem Fall nicht komplett ausgeschlossen werden, dass eine andere Protease das identifizierte Peptid *in vitro* prozessiert hat.

Aus *in vitro* Studien ist bekannt, dass auch Cathepsin G den IL-6R prozessieren kann (Bank et al. 1999). Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass Cathepsin G einen sIL-6R generiert, der deutlich kleiner ist als der durch ADAM17 generierte sIL-6R. Daraus lässt sich folgern, dass Cathepsin G nicht für die Generierung des identifizierten C-terminalen Peptids, das mit P355 endet, verantwortlich ist. Zudem ist die Aminosäure Prolin im Schnittstellenprofil von Cathepsin G an Position P1 nicht favorisiert, was ebenfalls diese Aussage unterstützt (Rawlings et al. 2014).

Überraschenderweise wurde in dieser Arbeit eine ADAM10-Schnittstelle identifiziert, die sich ebenfalls zwischen den Aminosäuren P355 und V356 befindet. Dies widerspricht auf den ersten Blick bereits publizierten Ergebnissen, die zeigen, dass die Deletionsvariante IL-6RΔS353_V362, die die Schnittstelle nicht mehr enthält, nicht mehr von ADAM17, aber noch von ADAM10 prozessiert werden kann (Baran et al. 2013). Allerdings konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Stimulation von ADAM10 mittels Ionomycin zur Proteolyse von IL-6RΔS353_V362 führt. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass ADAM10 neben der Schnittstelle zwischen den Aminosäuren P355 und V356 den IL-6R auch an anderen Stellen außerhalb des deletierten Bereichs prozessieren kann.

Die wichtigen Rollen beider Metalloproteasen werden durch die Tatsache verdeutlicht, dass vollständige ADAM10- bzw. ADAM17-Deletion in Mäusen (Black et al. 1997; Peschon et al. 1998; Hartmann et al. 2002) embryonal letal ist. Zur Untersuchung von ADAM17 wurden deshalb hypomorphe ADAM17^{ex/ex}-Mäuse generiert, die eine ADAM17-Expression von 5% im Vergleich zu genetisch unveränderten Mäusen in allen Geweben aufweisen (Chalaris et al. 2010). Überraschenderweise unterscheiden sich die Mengen an sIL-6R im Serum nicht von denen der genetisch unveränderten Tiere, obwohl aufgrund der geringeren ADAM17-Expression bei den ADAM17^{ex/ex}-Mäusen eine Reduktion des Serumspiegels zu erwarten gewesen wäre (Garbers et al. 2011).

Weitere Proteasen konnten als verantwortliche Sheddasen für die Generierung des sIL-6R in Mäusen ausgeschlossen werden. So weisen ADAM8^{-/-}-Mäuse ähnliche Serumspiegel an sIL-6R wie Wildtyptiere auf (Schumacher et al. 2015), was darauf hindeutet, dass auch ADAM8 nicht an der Bildung des sIL-6R *in vivo* beteiligt ist. Die drei Proteasen Neutrophil-Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3 werden durch N-terminale Entfernung von zwei Aminosäuren aktiviert. Diese Aktivierung wird durch Dipeptidylpeptidase I (DPPI) bewerkstelligt (Korkmaz et al. 2008). Um festzustellen, ob die drei Proteasen für die Entstehung des sIL-6R in Mäusen verantwortlich sind, wurden Serumkonzentrationen des sIL-6R von DPPI^{-/-}-Mäusen, die keine Aktivität von Neutrophil-Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3 aufweisen (Adkison et al. 2002), und Wildtyptieren verglichen. Auch hier konnte kein Unterschied festgestellt werden (Schumacher et al. 2015), womit die drei Proteasen ebenfalls nicht für die Generierung des sIL-6R zuständig sein können.

Es ist somit noch unklar, welche Proteasen *in vivo* für die Generierung des sIL-6R verantwortlich sind. HEK293-A10^{-/-}/A17^{-/-}-Zellen bilden nach PMA- bzw. Ionomycin-Stimulation nur 1-2% des sIL-6R von unveränderten HEK293-Zellen, was drauf hindeutet, dass beide Proteasen in HEK293-Zellen fast die gesamte Menge des sIL-6R generieren. Allerdings sollte an dieser Stelle angemerkt werden, dass in diesem Experiment nur ein Zeitraum von zwei Stunden untersucht wurde und HEK293-Zellen nicht notwendigerweise repräsentativ für alle Zellarten oder die Vorgänge *in vivo*

sind. Es wäre interessant zu untersuchen, ob der sIL-6R-Serumspiegel in ADAM17^{ex/ex} Mäusen, die außerdem defizient für ADAM10 sind (ADAM10^{ex/ex}), im Vergleich zu den genetisch unveränderten Mäusen ebenfalls deutlich reduziert ist. In diesem Fall könnte der vergleichsweise hohe sIL-6R-Serumspiegel in hypomorphen ADAM17^{ex/ex}-Mäusen durch eine kompensatorische ADAM10-vermittelte Proteolyse des murinen IL-6R, erklärt werden. Um diese Untersuchungen zu ermöglichen, müssten allerdings ADAM10^{ex/ex}-Mäuse generiert werden.

Der bestimmende genetische Faktor, der die humanen sIL-6R Serumspiegel beeinflusst, ist der *single nucleotide polymorphism* (SNP) rs2228145. Dieser SNP führt zu einem Austausch der Aminosäure D358 zu Alanin (Galicía et al. 2004). Probanden, die homozygot für diesen SNP sind, weisen deutlich erhöhte sIL-6R-Konzentrationen und ein reduziertes Risiko für koronare Herzerkrankungen auf (Collaboration et al. 2012; Interleukin-6 Receptor Mendelian Randomisation Analysis 2012). Obwohl das Spleißen der *IL6R* mRNA in diesen Individuen erhöht ist (Stone et al. 2013), wird der Großteil des sIL-6R durch einen anderen Mechanismus generiert. Es wurde bereits gezeigt, dass ein IL-6R, der die D358A Mutation beinhaltet, effektiver von ADAM10 und ADAM17 prozessiert wird (Garbers et al. 2014). Dies steht im Einklang mit Ergebnissen aus dieser Arbeit, die zeigen, dass ein IL-6R-Peptid des Stalk-Bereichs mit dieser Mutation ebenfalls deutlich besser von ADAM17 prozessiert wird als das unveränderte IL-6R-Peptid. In der Studie von Garbers et al. wurde die verstärkte Proteolyse des mutierten IL-6R damit begründet, dass die Substitution des D358 zu Alanin an Position P1', ausgehend von der von Müllberg et al. bestimmten ADAM17 Schnittstelle (Müllberg et al. 1994), den IL-6R zu einem besseren ADAM17-Substrat macht (Garbers et al. 2014; Tucher et al. 2014). Da in dieser Arbeit die ADAM17-Schnittstelle zwischen P355 und V356 identifiziert wurde, befindet sich die Mutation eigentlich an Position P3'. Da aber auch Alanin gegenüber Asparaginsäure an Position P3' favorisiert wird (Rawlings et al. 2014; Tucher et al. 2014), kann die verstärkte Proteolyse des IL-6R mit der Mutation (D358A) erklärt werden. Die Tatsache, dass der IL-6R, der die D358A Mutation beinhaltet, besser von ADAM10 und ADAM17 prozessiert wird (Garbers et al. 2014), liefert zudem ein weiteres Indiz dafür, dass beide Proteasen dieselbe Schnittstelle nutzen.

4.3 Einfluss der Glykane auf das Shedding des IL-6R

Die Hauptfunktion von N-Glykanen, die auf dem Großteil aller Membranproteine zu finden sind, ist die Sicherstellung der korrekten Proteinfaltung (Freeze et al. 2009). Falsch gefaltete Proteine werden ubiquitiniert und vom Proteasom abgebaut (Freeze et al. 2009). In dieser Arbeit wurden neben den C-terminalen Peptiden auch N-Glykane sowie O-Glykosylierungsmuster des IL-6R identifiziert und deren Einfluss auf die Proteolyse des IL-6R untersucht. Überraschenderweise hatte die Entfernung aller N-Glykane keine Auswirkung auf die IL-6-Signaltransduktion, was durch die

IL-6 abhängige Proliferation der Ba/F3-gp130-IL-6R-5N-Zellen verdeutlicht wird. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu Studien, in denen gezeigt wurde, dass bei anderen Rezeptoren wie zum Beispiel der EGFR (Sliker & Lane 1985) und GM-CSFR (Ding et al. 1995), die N-Glykane essentiell für die Ligandenbindung sind. Eine vollständig unglykosylierte Mutante des IL-6- β -Rezeptors gp130 war immer noch in der Lage, Signaltransduktion zu betreiben, jedoch waren der Transport sowie die Stabilität dieses Rezeptors deutlich gemindert (Wätzig et al. 2010). Im Gegensatz dazu zeigte der IL-6R-5N, der frei von N-Glykanen ist, eine nur leicht abgeschwächte Zelloberflächenexpression im Vergleich zum genetisch unveränderten IL-6R.

N- und O-Glykosylierungen sind bekannte posttranslationale Modifikationen, die für viele ADAM-Substrate wie beispielsweise TNF α (Takakura-Yamamoto et al. 1996) oder TGF α (Bringman et al. 1987) beschrieben sind. Substrate mit und ohne Glykane wurden benutzt, um ADAM17-spezifische Inhibitoren zu generieren (Minond et al. 2012). Kürzlich wurde gezeigt, dass O-Glykosylierungen in der Nähe der Schnittstelle die ADAM17-vermittelte Proteolyse eines IL-6R-Peptids des Stalk-Bereichs vermindern können (Goth et al. 2015). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der IL-6R tatsächlich in diesem Bereich am T352 *in vivo* glykosyliert ist. Zudem sorgt dieses O-Glykan im Zusammenspiel mit dem N-Glykan an N350 für eine leicht reduzierte Proteolyse eines für diesen Bereich korrespondierenden Glykopeptids des IL-6R.

Zellbasierte Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten allerdings einen sehr geringen Einfluss dieses N-/O-glykosylierten Bereichs auf die ADAM17-vermittelte Proteolyse des IL-6R. Dagegen wurde ein N-Glykan an N55, welches sich in der Domäne D1 des IL-6R weit entfernt von der identifizierten ADAM17-Schnittstelle befindet, überraschenderweise als eine Protease-regulierende *Exosite* identifiziert, da deren Entfernung zu einer verstärkten ADAM17-vermittelten Proteolyse führte. Des Weiteren erreichte die Mutante IL-6R-5N, bei der alle N-Glykosylierungsstellen entfernt wurden, die Zelloberfläche und war in der Lage IL-6-*signaling* zu induzieren, konnte aber nicht mehr von ADAM17 prozessiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings der molekulare Mechanismus dieser Resistenz gegen die ADAM17-vermittelte Proteolyse nicht aufgeklärt werden.

4.4 Ausblick

4.4.1 Entstehung des sIL-6R

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 hauptverantwortlich für die Entstehung des sIL-6R sind. Im Überstand von A10^{-/-}/A17^{-/-}-HEK293-Zellen, die mit cDNA, die für den IL-6R kodiert, transfiziert wurden, konnten nach zweistündiger Stimulation mit PMA oder 30-minütiger Stimulation mit Ionomycin nur geringfügige Mengen an sIL-6R detektiert

werden. Eine Analyse der Proteolyse des IL-6R über einen längeren Zeitraum ohne Zugabe von Stimulatoren könnte für das Verständnis des konstitutiven Sheddings des IL-6R hilfreich sein. Ein weiterer Mechanismus zur Entstehung des sIL-6R liefert die Freisetzung von extrazellulären Vesikeln durch Rezeptor-exprimierende Zellen (Levine 2008; Robbins & Morelli 2014). Unter den vollständigen Proteinen, welche auf extrazellulären Vesikeln identifiziert wurden, befinden sich ADAM10- und ADAM17-Substrate wie zum Beispiel ICAM-1 (Segura et al. 2005), TNFR1 (Hawari et al. 2004) und der IL-6R (Schumacher et al. 2015).

Es konnte gezeigt werden, dass das Ektodomänen-Shedding sowie Mikrovesikel zur Freisetzung von Signalmolekülen von seneszenten Zellen beitragen (Effenberger et al. 2014). Interessanterweise wurde auch biologisch aktives ADAM10 und ADAM17 auf Mikrovesikeln nachgewiesen (Folkesson et al. 2015), was darauf hindeutet, dass die Substrate auch von Mikrovesikeln freigesetzt werden können. Es wäre interessant zu untersuchen, ob HEK293-IL-6R-Zellen, ebenfalls extrazelluläre Vesikel mit dem vollständigen IL-6R freisetzen. Sollte das der Fall sein, könnte ein Vergleich von Mikrovesikeln von diesen Zellen und A10^{-/-}/A17^{-/-}-HEK293-IL-6R-Zellen zeigen, ob der IL-6R von membranständigem ADAM10 und ADAM17 auf Mikrovesikeln konstitutiv gesheidet wird. Ein Vergleich mit den ADAM10- und ADAM17-Einzelknockoutzellen könnte zusätzlich aufklären, welche der beiden Metalloproteasen hauptverantwortlich für die Proteolyse des membranständigen IL-6R von Mikrovesikeln ist.

In dieser Arbeit wurde die Schnittstelle zwischen den Aminosäuren P355 und V356 im Stalk-Bereich des IL-6R im humanen Serum identifiziert. Untersuchungen mit PMA-stimulierten HEK293-IL-6R-Zellen ließen drauf schließen, dass ADAM17 *in vitro* ebenfalls die P355/V356 Schnittstelle nutzt. Es kann allerdings nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass andere Proteasen neben ADAM10 und ADAM17 ebenfalls diese Schnittstelle verwenden. Eine Suche in der MEROPS-Datenbank zeigt, dass zahlreiche andere humane Enzyme, wie zum Beispiel Cathepsin F, Matrix Metalloproteinase-2 und die Carboxypeptidase A6 die Schnittstelle P/V nutzen (Rawlings et al. 2014). Die Stimulationsversuche in den Doppelknockout-Zellen deuten zwar darauf hin, dass ADAM10 und ADAM17 die Hauptproteasen für die Generation des sIL-6R sind; allerdings sollte dieses Ergebnis in anderen humanen Zelllinien, in denen ADAM10 und ADAM17 deletiert sind und die gegebenenfalls ein anderes Spektrum an Proteasen exprimieren, verifiziert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass ADAM10 ebenfalls die Schnittstelle P355/V356 nutzt. Allerdings war ADAM10 im Gegensatz zu ADAM17 in der Lage, die IL-6R Δ S353_V362-Variante, der die Schnittstelle fehlt, zu prozessieren. Daraus lässt sich schließen, dass ADAM10 neben der Schnittstelle P355/V356 weitere Schnittstellen nutzt. Leider ist es in dieser Arbeit nicht gelungen, das C-terminale Peptid, das durch die ADAM10-vermittelte Proteolyse der IL-6R Δ S353_V362-Variante

entstanden ist, mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Dennoch wäre es durchaus sinnvoll, weitere Identifikationsversuche zu unternehmen, um weitere Unterschiede beider Metalloproteasen bei der Prozessierung des IL-6R aufzudecken.

4.4.1.1 Einfluss der Glykane auf das Shedding des IL-6R

In dieser Arbeit ist es gelungen die wichtige Rolle der Glykosylierung in der Regulation der sIL-6R-Entstehung zu verdeutlichen. Es konnte gezeigt werden, dass das in dieser Arbeit identifizierte und bisher unbekannt O-Glykan an der Aminosäure T352 einen, wenn auch geringen, Einfluss auf das Shedding des IL-6R hat. Einige Glykanmotive an diesem T352 konnten identifiziert, allerdings nicht quantifiziert werden. Durch eine umfangreiche qualitative und quantitative Analyse der N- und O-Glykane nahe der identifizierten Schnittstelle in humanem Serum könnte man die Aussagekraft des ADAM17 *in vitro Cleavage-Assays* erhöhen, indem Glykopeptide untersucht werden, die den *in vivo* identifizierten Glykanmotiven entsprechen. Bisher wurde noch kein Glykopeptid, dessen Zuckermotiv mit einer Sialinsäure versehen ist, untersucht. Es konnte bereits an vielen Beispielen gezeigt werden, dass Sialinsäuren aufgrund ihrer Ladung biologische Erkennungsstellen für ihre Liganden maskieren (Schauer 2009). Somit ist es durchaus vorstellbar, dass die Sialinsäure auch einen Einfluss auf die ADAM17-vermittelte Proteolyse des IL-6R hat, insbesondere weil in dieser Arbeit bereits sialierte O-Glykanmotive an der Aminosäure T352 identifiziert worden sind. Desweiteren wäre es sinnvoll, nach Mutationen im IL-6R zu suchen, die zur Entfernung oder Entstehung von Glykosylierungsstellen führen und zu prüfen, ob Probanden, die diese Mutation besitzen, veränderte sIL-6R Serumspiegel aufweisen.

Der Einfluss der Glykosylierungen auf die ADAM17-vermittelte Proteolyse des IL-6R wurde in dieser Arbeit hauptsächlich in murinen Ba/F3-gp130-Zellen untersucht. Es wäre sinnvoll, diese Untersuchungen auf humane Zelllinien auszuweiten. Die Mutante des IL-6R, die keine N-Glykane besitzt (5N), kann nicht mehr von ADAM17 prozessiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit ist es nicht gelungen, Gründe für die gestörte Proteolyse zu finden. Erste Untersuchungen in der Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass die Interaktion der 5N-Mutante mit ADAM17 nicht gestört ist. Es wäre interessant zu untersuchen, ob sich die Konformation der 5N-Mutante von der des unveränderten IL-6R unterscheidet. Die 5N-Mutante könnte als Werkzeug genutzt werden, um die ADAM17-unabhängige Proteolyse des IL-6R zu untersuchen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die limitierte Proteolyse des Interleukin-6-Rezeptors (IL-6R) führt zur Freisetzung der IL-6R-Ektodomäne. Der so entstandene lösliche IL-6R (sIL-6R) kann mit Interleukin-6 (IL-6) einen agonistischen Komplex bilden, der Glykoprotein130 (gp130) exprimierende Zellen aktiviert, auch wenn diese Zellen keinen membranständigen IL-6R exprimieren. Dieser Signalweg wird als *trans-signaling* bezeichnet und ist hauptsächlich für die pro-inflammatorischen Prozesse von IL-6 verantwortlich. Die Metalloproteasen *A disintegrin and metalloproteinase* (ADAM) ADAM10 und ADAM17 sind die Hauptsheddasen des IL-6R.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Deletion eines Triple-Serin-Motivs (S359-S361), das sich im Stalk-Bereich des IL-6R in unmittelbarer Nähe der bereits identifizierten ADAM17-Schnittstelle (Q357/D358) befindet, die ADAM17-vermittelte Proteolyse verhindert. Dieses ist jedoch kein direkter Einfluss des Triple-Serin-Motivs, sondern wurde durch die Reduzierung der Distanz zwischen Schnittstelle und der Plasmamembran verursacht. Die Tatsache, dass ADAM10 in der Lage ist, diese Deletionsvariante des IL-6R zu prozessieren, unterstreicht die funktionellen Unterschiede beider Metalloproteasen bei der Proteolyse des IL-6R.

Obwohl der sIL-6R ein attraktives therapeutisches Ziel ist, ist seine Entstehung im Menschen bis heute größtenteils ungeklärt. In dieser Arbeit konnte zunächst bestätigt werden, dass der Großteil des sIL-6R im humanen Serum nicht durch alternatives Spleißen der *IL6R* mRNA entsteht. Mit Hilfe von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie konnte ein C-terminales Peptid des humanen sIL-6R aus humanem Serum identifiziert werden, das durch proteolytische Spaltung des membrangebundenen IL-6R zwischen P355 und V356 entstanden ist. Des Weiteren zeigten *in vitro* Untersuchungen, dass ADAM17 diese Schnittstelle (P355/V356) und nicht die früher beschriebene zwischen Q357 und D358 nutzt.

N- und O-Glykosylierung hatte keinen Einfluss auf Zelloberflächenexpression und Signaltransduktion des IL-6R. Das identifizierte N- und O-Glykanpaar in unmittelbarer Nähe der ADAM17-Schnittstelle scheint nur einen geringeren Einfluss auf die ADAM17-vermittelte Proteolyse des IL-6R zu haben. Überraschenderweise wurde die N-Glykosylierung an Position N55 in der Domäne D1 des IL-6R als eine ADAM17-*Exosite* identifiziert, die die Proteolyse des IL-6R reguliert. Ein IL-6R, dem alle N-Glykosylierungsstellen mittels Punktmutationen entfernt wurden, kann nicht mehr von ADAM17 prozessiert werden, was eine wichtige Rolle der Glykosylierung in der Regulation der sIL-6R-Entstehung unterstreicht.

6 SUMMARY

Limited proteolysis of the Interleukin-6-Receptor (IL-6R) leads to the release of the IL-6R-ectodomain. Together with Interleukin-6 (IL-6) the resulting soluble IL-6R (sIL-6R) forms an agonistic complex, which activates glycoprotein 130 (gp130) expressing cells, even if these cells show no IL-6R expression. This signal pathway is called trans-signaling and is mainly associated with pro-inflammatory activities of IL-6. The metalloproteases A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) ADAM10 and ADAM17 are the major sheddases of the IL-6R.

Here it could be shown, that a deletion of a triple-serine-motif (S359-S361) which is located in the IL-6R-stalk-region adjacent to the identified ADAM17-cleavage site (Q357/D358) blocks ADAM17-mediated proteolysis. However, this is not caused by a direct influence of the triple-serine-motif, but can be explained by the reduction of the distance between cleavage site and plasma membrane. The fact that ADAM10 is able to process this deletion variant of the IL-6R underlines the functional differences of both metalloproteases.

Although the sIL-6R represents an attractive pharmaceutical target, its generation is mainly unknown. In this study it could be confirmed, that the majority of the sIL-6R in human serum is not generated by alternative splicing of the *IL6R* mRNA. With the help of liquid chromatography and mass spectrometry a c-terminal peptide of the sIL-6R could be identified in human serum, which was generated by proteolytic cleavage of membrane-bound IL-6R between P355 and V356. Furthermore it could be shown *in vitro* that ADAM17 cleaves between P355 and V356 and does not use the formerly published cleavage site between Q357 and D358.

N- and O-glycosylation showed no influence on cell surface expression and signal transduction of the IL-6R. The identified N- and O-glycan-pair in close proximity to the ADAM17 cleavage site seems to have only a minor influence on ADAM17 mediated proteolysis. Surprisingly, an N-glycosylation at position N55 in the domain D1 was identified as an ADAM17-exosite, which regulates proteolysis of the IL-6R. ADAM17-mediated proteolysis of an IL-6R, in which all N-glycosylation sites were removed is impaired, which underlines an important role of glycosylation in regulating the generation of the sIL-6R.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abou-Ghazal, M., D. S. Yang, W. Qiao, C. Reina-Ortiz, J. Wei, L. Y. Kong, G. N. Fuller, N. Hiraoka, W. Priebe, R. Sawaya and A. B. Heimberger (2008). "The incidence, correlation with tumor-infiltrating inflammation, and prognosis of phosphorylated STAT3 expression in human gliomas." Clin Cancer Res **14**(24): 8228-8235.

Aderka, D., H. Englemann, V. Hornik, Y. Skornick, Y. Levo, D. Wallach and G. Kushtai (1991). "Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients." Cancer Res **51**(20): 5602-5607.

Adkison, A. M., S. Z. Raptis, D. G. Kelley and C. T. Pham (2002). "Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis." J Clin Invest **109**(3): 363-371.

Althoff, K., J. Mullberg, D. Aasland, N. Voltz, K. Kallen, J. Grotzinger and S. Rose-John (2001). "Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins." Biochem J **353**(Pt 3): 663-672.

Althoff, K., P. Reddy, N. Voltz, S. Rose-John and J. Müllberg (2000). "Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins." Eur J Biochem **267**(9): 2624-2631.

Aparicio-Siegmund, S., J. Sommer, N. Monhasery, R. Schwanbeck, E. Keil, D. Finkenstadt, K. Pfeffer, S. Rose-John, J. Scheller and C. Garbers (2014). "Inhibition of protein kinase II (CK2) prevents induced signal transducer and activator of transcription (STAT) 1/3 and constitutive STAT3 activation." Oncotarget **5**(8): 2131-2148.

Aquino, D., R. Wong, R. U. Margolis and R. K. Margolis (1980). "Sialic acid residues inhibit proteolytic degradation of dopamine beta-hydroxylase." FEBS Lett **112**(2): 195-198.

Assier, E., M. C. Boissier and J. M. Dayer (2010). "Interleukin-6: from identification of the cytokine to development of targeted treatments." Joint Bone Spine **77**(6): 532-536.

Bank, U., D. Reinhold, C. Schneemilch, D. Kunz, H. J. Synowitz and S. Ansorge (1999). "Selective proteolytic cleavage of IL-2 receptor and IL-6 receptor ligand binding chains by neutrophil-derived serine proteases at foci of inflammation." J Interferon Cytokine Res **19**(11): 1277-1287.

Baran, P., R. Nitz, J. Grötzinger, J. Scheller and C. Garbers (2013). "Minimal interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling." J Biol Chem **288**(21): 14756-14768.

Barkhausen, T., T. Tschernig, P. Rosenstiel, M. van Griensven, R. P. Vonberg, M. Dorsch, A. Mueller-Heine, A. Chalaris, J. Scheller, S. Rose-John, D. Seegert, C. Krettek and G. H. Waetzig (2011). "Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model." Crit Care Med **39**(6): 1407-1413.

Baumann, H. and J. Gauldie (1994). "The acute phase response." Immunol Today **15**(2): 74-80.

Bazan, J. F. (1990). "Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(18): 6934-6938.

- Becker, C., M. C. Fantini, C. Schramm, H. A. Lehr, S. Wirtz, A. Nikolaev, J. Burg, S. Strand, R. Kiesslich, S. Huber, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, P. R. Galle, M. Blessing, S. Rose-John and M. F. Neurath (2004). "TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling." Immunity **21**(4): 491-501.
- Becker, C., M. C. Fantini, S. Wirtz, A. Nikolaev, H. A. Lehr, P. R. Galle, S. Rose-John and M. F. Neurath (2005). "IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer." Cell Cycle **4**(2): 217-220.
- Beitz, E. (2000). "TEXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon." Bioinformatics **16**(2): 135-139.
- Bjerner, J., L. M. Amlie, L. S. Rusten and E. Jakobsen (2002). "Serum levels of soluble transferrin receptor correlate with severity of disease but not with iron stores in patients with malignant lymphomas." Tumour Biol **23**(3): 146-153.
- Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March and D. P. Cerretti (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." Nature **385**(6618): 729-733.
- Black, R. A. and J. M. White (1998). "ADAMs: focus on the protease domain." Curr Opin Cell Biol **10**(5): 654-659.
- Bollrath, J., T. J. Phesse, V. A. von Burstin, T. Putoczki, M. Bennecke, T. Bateman, T. Nebelsiek, T. Lundgren-May, O. Canli, S. Schwitalla, V. Matthews, R. M. Schmid, T. Kirchner, M. C. Arkan, M. Ernst and F. R. Greten (2009). "gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis." Cancer Cell **15**(2): 91-102.
- Boulanger, M. J., D. C. Chow, E. E. Brevnova and K. C. Garcia (2003). "Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex." Science **300**(5628): 2101-2104.
- Bringman, T. S., P. B. Lindquist and R. Derynck (1987). "Different transforming growth factor-alpha species are derived from a glycosylated and palmitoylated transmembrane precursor." Cell **48**(3): 429-440.
- Briso, E. M., O. Dienz and M. Rincon (2008). "Cutting edge: soluble IL-6R is produced by IL-6R ectodomain shedding in activated CD4 T cells." J Immunol **180**(11): 7102-7106.
- Brockhausen, I., H. Schachter and P. Stanley (2009). O-GalNAc Glycans. Essentials of Glycobiology. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko et al. Cold Spring Harbor (NY).
- Calabrese, L. H. and S. Rose-John (2014). "IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease." Nat Rev Rheumatol **10**(12): 720-727.
- Campbell, I. L., M. Erta, S. L. Lim, R. Frausto, U. May, S. Rose-John, J. Scheller and J. Hidalgo (2014). "Trans-signaling is a dominant mechanism for the pathogenic actions of interleukin-6 in the brain." J Neurosci **34**(7): 2503-2513.

- Catarzi, S., F. Favilli, C. Romagnoli, T. Marcucci, L. Picariello, F. Tonelli, M. T. Vincenzini and T. Iantomasi (2011). "Oxidative state and IL-6 production in intestinal myofibroblasts of Crohn's disease patients." Inflamm Bowel Dis **17**(8): 1674-1684.
- Chalaris, A., N. Adam, C. Sina, P. Rosenstiel, J. Lehmann-Koch, P. Schirmacher, D. Hartmann, J. Cichy, O. Gavrilova, S. Schreiber, T. Jostock, V. Matthews, R. Hasler, C. Becker, M. F. Neurath, K. Reiss, P. Saftig, J. Scheller and S. Rose-John (2010). "Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice." J Exp Med **207**(8): 1617-1624.
- Chalaris, A., C. Garbers, B. Rabe, S. Rose-John and J. Scheller (2011). "The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer." Eur J Cell Biol **90**(6-7): 484-494.
- Chalaris, A., B. Rabe, K. Paliga, H. Lange, T. Laskay, C. A. Fielding, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller (2007). "Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils." Blood **110**(6): 1748-1755.
- Chalaris, A., D. Schmidt-Arras, K. Yamamoto and S. Rose-John (2012). "Interleukin-6 trans-signaling and colonic cancer associated with inflammatory bowel disease." Dig Dis **30**(5): 492-499.
- Chayanupatkul, M. and S. Honsawek (2010). "Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in plasma and synovial fluid is inversely associated with disease severity of knee osteoarthritis." Clin Biochem **43**(13-14): 1133-1137.
- Cho, S. H., D. W. Kim, S. H. Lee, N. Kolliputi, S. J. Hong, L. Suh, J. Norton, K. E. Hulse, S. Seshadri, D. B. Conley, R. C. Kern, B. K. Tan, A. Peters, L. C. Grammer and R. P. Schleimer (2015). "Age-related increased prevalence of asthma and nasal polyps in chronic rhinosinusitis and its association with altered IL-6 trans-signaling." Am J Respir Cell Mol Biol **53**(5): 601-606.
- Christlet, T. H., M. Biswas and K. Veluraja (1999). "A database analysis of potential glycosylating Asn-X-Ser/Thr consensus sequences." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **55**(Pt 8): 1414-1420.
- Chua, A. C., B. R. Klopčič, D. S. Ho, S. K. Fu, C. H. Forrest, K. D. Croft, J. K. Olynyk, I. C. Lawrance and D. Trinder (2013). "Dietary iron enhances colonic inflammation and IL-6/IL-11-Stat3 signaling promoting colonic tumor development in mice." PLoS One **8**(11): e78850.
- Chung, C. D., J. Liao, B. Liu, X. Rao, P. Jay, P. Berta and K. Shuai (1997). "Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3." Science **278**(5344): 1803-1805.
- Cole, A. R., N. E. Hall, H. R. Treutlein, J. S. Eddes, G. E. Reid, R. L. Moritz and R. J. Simpson (1999). "Disulfide bond structure and N-glycosylation sites of the extracellular domain of the human interleukin-6 receptor." J Biol Chem **274**(11): 7207-7215.
- Collaboration, I. R. G. C. E. R. F., N. Sarwar, A. S. Butterworth, D. F. Freitag, J. Gregson, P. Willeit, D. N. Gorman, P. Gao, D. Saleheen, A. Rendon, C. P. Nelson, P. S. Braund, A. S. Hall, D. I. Chasman, A. Tybjaerg-Hansen, J. C. Chambers, E. J. Benjamin, P. W. Franks, R. Clarke, A. A. Wilde, M. D. Trip, M. Steri, J. C. Witteman, L. Qi, C. E. van der Schoot, U. de Faire, J. Erdmann, H. M. Stringham, W. Koenig, D. J. Rader, D. Melzer, D. Reich, B. M. Psaty, M. E. Kleber, D. B. Panagiotakos, J. Willeit, P. Wennberg, M.

Woodward, S. Adamovic, E. B. Rimm, T. W. Meade, R. F. Gillum, J. A. Shaffer, A. Hofman, A. Onat, J. Sundstrom, S. Wassertheil-Smoller, D. Mellstrom, J. Gallacher, M. Cushman, R. P. Tracy, J. Kauhanen, M. Karlsson, J. T. Salonen, L. Wilhelmsen, P. Amouyel, B. Cantin, L. G. Best, Y. Ben-Shlomo, J. E. Manson, G. Davey-Smith, P. I. de Bakker, C. J. O'Donnell, J. F. Wilson, A. G. Wilson, T. L. Assimes, J. O. Jansson, C. Ohlsson, A. Tivesten, O. Ljunggren, M. P. Reilly, A. Hamsten, E. Ingelsson, F. Gambien, J. Hung, G. N. Thomas, M. Boehnke, H. Schunkert, F. W. Asselbergs, J. J. Kastelein, V. Gudnason, V. Salomaa, T. B. Harris, J. S. Kooner, K. H. Allin, B. G. Nordestgaard, J. C. Hopewell, A. H. Goodall, P. M. Ridker, H. Holm, H. Watkins, W. H. Ouwehand, N. J. Samani, S. Kaptoge, E. Di Angelantonio, O. Harari and J. Danesh (2012). "Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies." Lancet **379**(9822): 1205-1213.

Cressman, D. E., L. E. Greenbaum, R. A. DeAngelis, G. Ciliberto, E. E. Furth, V. Poli and R. Taub (1996). "Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice." Science **274**(5291): 1379-1383.

Debnath, B., S. Xu and N. Neamati (2012). "Small molecule inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) protein." J Med Chem **55**(15): 6645-6668.

Dimitrov, S., T. Lange, C. Benedict, M. A. Nowell, S. A. Jones, J. Scheller, S. Rose-John and J. Born (2006). "Sleep enhances IL-6 trans-signaling in humans." FASEB J **20**(12): 2174-2176.

Ding, D. X., J. C. Vera, M. L. Heaney and D. W. Golde (1995). "N-glycosylation of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha subunit is essential for ligand binding and signal transduction." J Biol Chem **270**(41): 24580-24584.

Dittrich, A., C. Khouri, S. D. Sackett, C. Ehling, O. Bohmer, U. Albrecht, J. G. Bode, C. Trautwein and F. Schaper (2012). "Glucocorticoids increase interleukin-6-dependent gene induction by interfering with the expression of the suppressor of cytokine signaling 3 feedback inhibitor." Hepatology **55**(1): 256-266.

Doganci, A., T. Eigenbrod, N. Krug, G. T. De Sanctis, M. Hausding, V. J. Erpenbeck, B. Haddad el, H. A. Lehr, E. Schmitt, T. Bopp, K. J. Kallen, U. Herz, S. Schmitt, C. Luft, O. Hecht, J. M. Hohlfeld, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, S. Rose-John, H. Renz, M. F. Neurath, P. R. Galle and S. Finotto (2005). "The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo." J Clin Invest **115**(2): 313-325.

Dombrowsky, G. (2015). "Gewinnung von ADAM10 und ADAM17 *knockout*-Zellen unter der Verwendung des CRISPR-Cas9-Systems und deren Charakterisierung in Bezug auf den Interleukin-6 Rezeptor." Studiengang Biochemie und Molekularbiologie der Naturwissenschaftlich Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Dusterhoft, S., K. Hobel, M. Oldefest, J. Lokau, G. H. Waetzig, A. Chalaris, C. Garbers, J. Scheller, S. Rose-John, I. Lorenzen and J. Grotzinger (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.

Effenberger, T., J. von der Heyde, K. Bartsch, C. Garbers, K. Schulze-Osthoff, A. Chalaris, G. Murphy, S. Rose-John and B. Rabe (2014). "Senescence-associated release of transmembrane proteins involves proteolytic processing by ADAM17 and microvesicle shedding." FASEB J **28**(11): 4847-4856.

- Egler, R. A., S. M. Burlingame, J. G. Nuchtern and H. V. Russell (2008). "Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor levels as markers of disease extent and prognosis in neuroblastoma." Clin Cancer Res **14**(21): 7028-7034.
- Endres, K., A. Anders, E. Kojro, S. Gilbert, F. Fahrenholz and R. Postina (2003). "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation." Eur J Biochem **270**(11): 2386-2393.
- Esteve, E., G. Villuendas, J. Mallolas, J. Vendrell, A. Lopez-Bermejo, M. Rodriguez, M. Recasens, W. Ricart, J. L. San Millan, H. Escobar-Morreale, C. Richart and J. M. Fernandez-Real (2006). "Polymorphisms in the interleukin-6 receptor gene are associated with body mass index and with characteristics of the metabolic syndrome." Clin Endocrinol (Oxf) **65**(1): 88-91.
- Etzerodt, A., M. Maniecki, K. Møller, H. Møller and S. Moestrup (2010). "Tumor necrosis factor -converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163." J Leukoc Biol **88**(6): 1201-1205.
- Etzerodt, A., M. R. Rasmussen, P. Svendsen, A. Chalaris, J. Schwarz, I. Galea, H. J. Moller and S. K. Moestrup (2014). "Structural basis for inflammation-driven shedding of CD163 ectodomain and tumor necrosis factor-alpha in macrophages." J Biol Chem **289**(2): 778-788.
- Etzerodt, A., M. R. Rasmussen, P. Svendsen, A. Chalaris, J. Schwarz, I. Galea, H. J. Møller and S. K. Moestrup (2014). "Structural basis for inflammation-driven shedding of CD163 ectodomain and tumor necrosis factor- α in macrophages." J Biol Chem **289**(2): 778-788.
- Eulendorf, R., A. Dittrich, C. Khouri, P. J. Muller, B. Mutze, A. Wolf and F. Schaper (2012). "Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs." Eur J Cell Biol **91**(6-7): 486-495.
- Fan, T. F., L. L. Bu, W. M. Wang, S. R. Ma, J. F. Liu, W. W. Deng, L. Mao, G. T. Yu, C. F. Huang, B. Liu, W. F. Zhang and Z. J. Sun (2015). "Tumor growth suppression by inhibiting both autophagy and STAT3 signaling in HNSCC." Oncotarget **6**(41): 43581-43593.
- Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J. P. Brakenhoff, K. J. Kallen, A. Wollmer, J. Grötzing and S. Rose-John (1997). "I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion." Nat Biotechnol **15**(2): 142-145.
- Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J. P. Brakenhoff, K. J. Kallen, A. Wollmer, J. Grötzing and S. Rose-John (1997). "I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion." Nat Biotechnol **15**(2): 142-145.
- Folkesson, M., C. Li, S. Frebelius, J. Swedenborg, D. Wagsater, K. J. Williams, P. Eriksson, J. Roy and M. L. Liu (2015). "Proteolytically active ADAM10 and ADAM17 carried on membrane microvesicles in human abdominal aortic aneurysms." Thromb Haemost **114**(6): 1165-1174.
- Freeze, H. H., J. D. Esko and A. J. Parodi (2009). Glycans in Glycoprotein Quality Control. Essentials of Glycobiology. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko et al. Cold Spring Harbor (NY).
- Gabler, K., I. Behrmann and C. Haan (2013). "JAK2 mutants (e.g., JAK2V617F) and their importance as drug targets in myeloproliferative neoplasms." JAKSTAT **2**(3): e25025.

- Galicia, J. C., H. Tai, Y. Komatsu, Y. Shimada, K. Akazawa and H. Yoshie (2004). "Polymorphisms in the IL-6 receptor (IL-6R) gene: strong evidence that serum levels of soluble IL-6R are genetically influenced." Genes Immun **5**(6): 513-516.
- Garbers, C., S. Aparicio-Siegmund and S. Rose-John (2015). "The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition." Curr Opin Immunol **34**: 75-82.
- Garbers, C., N. Janner, A. Chalaris, M. L. Moss, D. M. Floss, D. Meyer, F. Koch-Nolte, S. Rose-John and J. Scheller (2011). "Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding." J Biol Chem **286**(17): 14804-14811.
- Garbers, C., N. Monhasery, S. Aparicio-Siegmund, J. Lokau, P. Baran, M. A. Nowell, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller (2014). "The interleukin-6 receptor Asp358Ala single nucleotide polymorphism rs2228145 confers increased proteolytic conversion rates by ADAM proteases." Biochim Biophys Acta **1842**(9): 1485-1494.
- Garbers, C., W. Thaiss, G. W. Jones, G. H. Waetzig, I. Lorenzen, F. Guilhot, R. Lissilaa, W. G. Ferlin, J. Grotzinger, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller (2011). "Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor." J Biol Chem **286**(50): 42959-42970.
- Garbers, C., W. Thaiss, G. W. Jones, G. H. Wätzig, I. Lorenzen, F. Guilhot, R. Lissilaa, W. G. Ferlin, J. Grötzinger, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller (2011). "Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor." J Biol Chem **286**(50): 42959-42970.
- Geetha-Habib, M., H. R. Park and W. J. Lennarz (1990). "In vivo N-glycosylation and fate of Asn-X-Ser/Thr tripeptides." J Biol Chem **265**(23): 13655-13660.
- Goth, C. K., A. Halim, S. A. Khetarpal, D. J. Rader, H. Clausen and K. T. Schjoldager (2015). "A systematic study of modulation of ADAM-mediated ectodomain shedding by site-specific O-glycosylation." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(47): 14623-14628.
- Goth, C. K., A. Halim, S. A. Khetarpal, D. J. Rader, H. Clausen and T. K. Schjoldager (2015). "A systematic study of modulation of ADAM-mediated ectodomain shedding by site-specific O-glycosylation." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(47): 14623-14628.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- Greenhill, C. J., S. Rose-John, R. Lissilaa, W. Ferlin, M. Ernst, P. J. Hertzog, A. Mansell and B. J. Jenkins (2011). "IL-6 trans-signaling modulates TLR4-dependent inflammatory responses via STAT3." J Immunol **186**(2): 1199-1208.
- Grivennikov, S., E. Karin, J. Terzic, D. Mucida, G. Y. Yu, S. Vallabhapurapu, J. Scheller, S. Rose-John, H. Cheroutre, L. Eckmann and M. Karin (2009). "IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer." Cancer Cell **15**(2): 103-113.
- Guschin, D., N. Rogers, J. Briscoe, B. Witthuhn, D. Watling, F. Horn, S. Pellegrini, K. Yasukawa, P. Heinrich, G. R. Stark and et al. (1995). "A major role for the protein tyrosine

kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6." EMBO J **14**(7): 1421-1429.

Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, A. Lena Illert, K. von Figura and P. Saftig (2002). "The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts." Hum Mol Genet **11**(21): 2615-2624.

Hawari, F. I., F. N. Rouhani, X. Cui, Z. X. Yu, C. Buckley, M. Kaler and S. J. Levine (2004). "Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: a mechanism for generation of soluble cytokine receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1297-1302.

He, S., G. Liao, Y. Liu, L. Huang, M. Kang and L. Chen (2015). "Overexpression of STAT3/pSTAT3 was associated with poor prognosis in gastric cancer: a meta-analysis." Int J Clin Exp Med **8**(11): 20014-20023.

Heaney, M. L. and D. W. Golde (1996). "Soluble cytokine receptors." Blood **87**(3): 847-857.

Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Müller-Newen and F. Schaper (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." Biochem J **374**(Pt 1): 1-20.

Heinrich, P. C., J. V. Castell and T. Andus (1990). "Interleukin-6 and the acute phase response." Biochem J **265**(3): 621-636.

Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga and T. Kishimoto (1990). "Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130." Cell **63**(6): 1149-1157.

Hirano, T., T. Matsuda, M. Turner, N. Miyasaka, G. Buchan, B. Tang, K. Sato, M. Shimizu, R. Maini, M. Feldmann and et al. (1988). "Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis." Eur J Immunol **18**(11): 1797-1801.

Hirano, T., K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, A. Iwamatsu and et al. (1986). "Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin." Nature **324**(6092): 73-76.

Hirata, Y., T. Taga, M. Hibi, N. Nakano, T. Hirano and T. Kishimoto (1989). "Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies." J Immunol **143**(9): 2900-2906.

Honda, M., S. Yamamoto, M. Cheng, K. Yasukawa, H. Suzuki, T. Saito, Y. Osugi, T. Tokunaga and T. Kishimoto (1992). "Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection." J Immunol **148**(7): 2175-2180.

Horiuchi, S., W. Ampofo, Y. Koyanagi, A. Yamashita, M. Waki, A. Matsumoto, M. Yamamoto and N. Yamamoto (1998). "High-level production of alternatively spliced soluble interleukin-6 receptor in serum of patients with adult T-cell leukaemia/HTLV-I-associated myelopathy." Immunology **95**(3): 360-369.

Horiuchi, S., Y. Koyanagi, Y. Zhou, H. Miyamoto, Y. Tanaka, M. Waki, A. Matsumoto, M. Yamamoto and N. Yamamoto (1994). "Soluble interleukin-6 receptors released from T cell

or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism." Eur J Immunol **24**(8): 1945-1948.

Humphrey, R. K., G. M. Beattie, A. D. Lopez, N. Bucay, C. C. King, M. T. Firpo, S. Rose-John and A. Hayek (2004). "Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent." Stem Cells **22**(4): 522-530.

Hunter, C. A. and S. A. Jones (2015). "IL-6 as a keystone cytokine in health and disease." Nat Immunol **16**(5): 448-457.

Interleukin-6 Receptor Mendelian Randomisation Analysis, C. (2012). "The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis." Lancet **379**(9822): 1214-1224.

Ishibashi, T., H. Kimura, T. Uchida, S. Kariyone, P. Friese and S. A. Burstein (1989). "Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(15): 5953-5957.

Ito, H. (2003). "IL-6 and Crohn's disease." Curr Drug Targets Inflamm Allergy **2**(2): 125-130.

Jeanmougin, F., J. D. Thompson, M. Gouy, D. G. Higgins and T. J. Gibson (1998). "Multiple sequence alignment with Clustal X." Trends Biochem Sci **23**(10): 403-405.

Jones, G. W., R. M. McLoughlin, V. J. Hammond, C. R. Parker, J. D. Williams, R. Malhotra, J. Scheller, A. S. Williams, S. Rose-John, N. Topley and S. A. Jones (2010). "Loss of CD4+ T cell IL-6R expression during inflammation underlines a role for IL-6 trans signaling in the local maintenance of Th17 cells." J Immunol **184**(4): 2130-2139.

Jones, L. M., M. L. Broz, J. J. Ranger, J. Ozcelik, R. Ahn, D. Zuo, J. Ursini-Siegel, M. Hallett, M. Krummel and W. J. Müller (2015). "Stat3 establishes an immunosuppressive microenvironment during the early stages of breast carcinogenesis to promote tumor growth and metastasis." Cancer Res.

Jones, S. A., S. Horiuchi, D. Novick, N. Yamamoto and G. M. Fuller (1998). "Shedding of the soluble IL-6 receptor is triggered by Ca²⁺ mobilization, while basal release is predominantly the product of differential mRNA splicing in THP-1 cells." Eur J Immunol **28**(11): 3514-3522.

Jones, S. A. and S. Rose-John (2002). "The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex." Biochim Biophys Acta **1592**(3): 251-263.

Jones, S. A., J. Scheller and S. Rose-John (2011). "Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling." J Clin Invest **121**(9): 3375-3383.

Jostock, T., J. Müllberg, S. Ozbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M. F. Neurath and S. Rose-John (2001). "Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses." Eur J Biochem **268**(1): 160-167.

Kang, S., Y. Song, M. Suh and a. C. Kang (2002). "Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." Bull. Korean Chem. Soc. **23**(11): 1511.

- Ketteler, R., S. Glaser, O. Sandra, U. M. Martens and U. Klingmüller (2002). "Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors." Gene Ther **9**(8): 477-487.
- Ketteler, R., S. Glaser, O. Sandra, U. M. Martens and U. Klingmüller (2002). "Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors." Gene Ther **9**(8): 477-487.
- Kim, H. and H. Baumann (1999). "Dual signaling role of the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in regulating expression of acute-phase plasma proteins by interleukin-6 cytokine receptors in hepatic cells." Mol Cell Biol **19**(8): 5326-5338.
- Kim, S. W., J. S. Kim, J. Papadopoulos, H. J. Choi, J. He, M. Maya, R. R. Langley, D. Fan, I. J. Fidler and S. J. Kim (2011). "Consistent interactions between tumor cell IL-6 and macrophage TNF-alpha enhance the growth of human prostate cancer cells in the bone of nude mouse." Int Immunopharmacol **11**(7): 862-872.
- Kishimoto, T. (2010). "IL-6: from its discovery to clinical applications." Int Immunol **22**(5): 347-352.
- Kishimoto, T., S. Akira, M. Narazaki and T. Taga (1995). "Interleukin-6 family of cytokines and gp130." Blood **86**(4): 1243-1254.
- Korkmaz, B., T. Moreau and F. Gauthier (2008). "Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions." Biochimie **90**(2): 227-242.
- Kyo, S., T. Kanaya, M. Takakura and M. Inoue (2000). "A case of cervical cancer with aggressive tumor growth: possible autocrine growth stimulation by G-CSF and IL-6." Gynecol Oncol **78**(3 Pt 1): 383-387.
- Le Gall, S. M., P. Bobe, K. Reiss, K. Horiuchi, X. D. Niu, D. Lundell, D. R. Gibb, D. Conrad, P. Saftig and C. P. Blobel (2009). "ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha." Mol Biol Cell **20**(6): 1785-1794.
- Leggate, M., M. A. Nowell, S. A. Jones and M. A. Nimmo (2010). "The response of interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor isoforms following intermittent high intensity and continuous moderate intensity cycling." Cell Stress Chaperones **15**(6): 827-833.
- Lesina, M., M. U. Kurkowski, K. Ludes, S. Rose-John, M. Treiber, G. Kloppel, A. Yoshimura, W. Reindl, B. Sipos, S. Akira, R. M. Schmid and H. Algul (2011). "Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer." Cancer Cell **19**(4): 456-469.
- Levine, S. J. (2008). "Molecular mechanisms of soluble cytokine receptor generation." J Biol Chem **283**(21): 14177-14181.
- Levy, C., H. Nechushtan and E. Razin (2002). "A new role for the STAT3 inhibitor, PIAS3: a repressor of microphthalmia transcription factor." J Biol Chem **277**(3): 1962-1966.

- Li, J., T. Lan, C. Zhang, C. Zeng, J. Hou, Z. Yang, M. Zhang, J. Liu and B. Liu (2015). "Reciprocal activation between IL-6/STAT3 and NOX4/Akt signalings promotes proliferation and survival of non-small cell lung cancer cells." Oncotarget **6**(2): 1031-1048.
- Lissilaa, R., V. Buatois, G. Magistrelli, A. S. Williams, G. W. Jones, S. Herren, L. Shang, P. Malinge, F. Guilhot, L. Chatel, E. Hatterer, S. A. Jones, M. H. Kosco-Vilbois and W. G. Ferlin (2010). "Although IL-6 trans-signaling is sufficient to drive local immune responses, classical IL-6 signaling is obligate for the induction of T cell-mediated autoimmunity." J Immunol **185**(9): 5512-5521.
- Liu, Y., P. K. Li, C. Li and J. Lin (2010). "Inhibition of STAT3 signaling blocks the anti-apoptotic activity of IL-6 in human liver cancer cells." J Biol Chem **285**(35): 27429-27439.
- Liuzzi, J. P., L. A. Lichten, S. Rivera, R. K. Blanchard, T. B. Aydemir, M. D. Knutson, T. Ganz and R. J. Cousins (2005). "Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(19): 6843-6848.
- Lo, C. W., M. W. Chen, M. Hsiao, S. Wang, C. A. Chen, S. M. Hsiao, J. S. Chang, T. C. Lai, S. Rose-John, M. L. Kuo and L. H. Wei (2011). "IL-6 trans-signaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer." Cancer Res **71**(2): 424-434.
- Lo, H. W., S. C. Hsu, M. Ali-Seyed, M. Gunduz, W. Xia, Y. Wei, G. Bartholomeusz, J. Y. Shih and M. C. Hung (2005). "Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway." Cancer Cell **7**(6): 575-589.
- Lokau, J., R. Nitz, M. Agthe, N. Monhasery, S. Aparicio-Siegmund, N. Schumacher, J. Wolf, K. Moller-Hackbarth, G. H. Waetzig, J. Grotzinger, G. Muller-Newen, S. Rose-John, J. Scheller and C. Garbers (2016). "Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling." Cell Rep **14**(7): 1761-1773.
- Lu, D., C. Yang and Z. Liu (2012). "How hydrophobicity and the glycosylation site of glycans affect protein folding and stability: a molecular dynamics simulation." J Phys Chem B **116**(1): 390-400.
- Ludwig, A., C. Hundhausen, M. H. Lambert, N. Broadway, R. C. Andrews, D. M. Bickett, M. A. Leesnitzer and J. D. Becherer (2005). "Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules." Comb Chem High Throughput Screen **8**(2): 161-171.
- Lust, J. A., K. A. Donovan, M. P. Kline, P. R. Greipp, R. A. Kyle and N. J. Maihle (1992). "Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor." Cytokine **4**(2): 96-100.
- Macha, M. A., A. Matta, J. Kaur, S. S. Chauhan, A. Thakar, N. K. Shukla, S. D. Gupta and R. Ralhan (2011). "Prognostic significance of nuclear pSTAT3 in oral cancer." Head Neck **33**(4): 482-489.
- Mangan, J. K., S. G. Rane, A. D. Kang, A. Amanullah, B. C. Wong and E. P. Reddy (2004). "Mechanisms associated with IL-6-induced up-regulation of Jak3 and its role in monocytic differentiation." Blood **103**(11): 4093-4101.

- Martens, A. S., J. G. Bode, P. C. Heinrich and L. Graeve (2000). "The cytoplasmic domain of the interleukin-6 receptor gp80 mediates its basolateral sorting in polarized madin-darby canine kidney cells." J Cell Sci **113** (Pt 20): 3593-3602.
- Marz, P., U. Otten and S. Rose-John (1999). "Neural activities of IL-6-type cytokines often depend on soluble cytokine receptors." Eur J Neurosci **11**(9): 2995-3004.
- Mascarenhas, J. and R. Hoffman (2012). "Ruxolitinib: the first FDA approved therapy for the treatment of myelofibrosis." Clin Cancer Res **18**(11): 3008-3014.
- Matthews, V., B. Schuster, S. Schutze, I. Bussmeyer, A. Ludwig, C. Hundhausen, T. Sadowski, P. Saftig, D. Hartmann, K. J. Kallen and S. Rose-John (2003). "Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE)." J Biol Chem **278**(40): 38829-38839.
- Matthews, V. B., T. L. Allen, S. Risis, M. H. Chan, D. C. Henstridge, N. Watson, L. A. Zaffino, J. R. Babb, J. Boon, P. J. Meikle, J. B. Jowett, M. J. Watt, J. O. Jansson, C. R. Bruce and M. A. Febbraio (2010). "Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance." Diabetologia **53**(11): 2431-2441.
- May, P., U. Schniertshauer, C. Gerhartz, F. Horn and P. C. Heinrich (2003). "Signal transducer and activator of transcription STAT3 plays a major role in gp130-mediated acute phase protein gene activation." Acta Biochim Pol **50**(3): 595-601.
- McLoughlin, R. M., B. J. Jenkins, D. Grail, A. S. Williams, C. A. Fielding, C. R. Parker, M. Ernst, N. Topley and S. A. Jones (2005). "IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(27): 9589-9594.
- Minegishi, Y., M. Saito, T. Morio, K. Watanabe, K. Agematsu, S. Tsuchiya, H. Takada, T. Hara, N. Kawamura, T. Ariga, H. Kaneko, N. Kondo, I. Tsuge, A. Yachie, Y. Sakiyama, T. Iwata, F. Bessho, T. Ohishi, K. Joh, K. Imai, K. Kogawa, M. Shinohara, M. Fujieda, H. Wakiguchi, S. Pasic, M. Abinun, H. D. Ochs, E. D. Renner, A. Jansson, B. H. Belohradsky, A. Metin, N. Shimizu, S. Mizutani, T. Miyawaki, S. Nonoyama and H. Karasuyama (2006). "Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity." Immunity **25**(5): 745-755.
- Minond, D., M. Cudic, N. Bionda, M. Giulianotti, L. Maida, R. A. Houghten and G. B. Fields (2012). "Discovery of novel inhibitors of a disintegrin and metalloprotease 17 (ADAM17) using glycosylated and non-glycosylated substrates." J Biol Chem **287**(43): 36473-36487.
- Müllberg, J., W. Oberthur, F. Lottspeich, E. Mehl, E. Dittrich, L. Graeve, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1994). "The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site." J Immunol **152**(10): 4958-4968.
- Müllberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1993). "The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding." Eur J Immunol **23**(2): 473-480.
- Müllberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1992). "Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor." Biochem Biophys Res Commun **189**(2): 794-800.
- Müller-Newen, G., C. Kohne, R. Keul, U. Hemmann, W. Müller-Esterl, J. Wijdenes, J. P. Brakenhoff, M. H. Hart and P. C. Heinrich (1996). "Purification and characterization of the

- soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing." Eur J Biochem **236**(3): 837-842.
- Müller-Newen, G., A. Kuster, U. Hemmann, R. Keul, U. Horsten, A. Martens, L. Graeve, J. Wijdenes and P. C. Heinrich (1998). "Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses." J Immunol **161**(11): 6347-6355.
- Muthusamy, S., P. Malhotra, M. Hosameddin, A. K. Dudeja, S. Borthakur, S. Saksena, R. K. Gill, P. K. Dudeja and W. A. Alrefai (2015). "N-glycosylation is essential for ileal ASBT function and protection against proteases." Am J Physiol Cell Physiol **308**(12): C964-971.
- Myles, A., V. Viswanath, Y. P. Singh and A. Aggarwal (2011). "Soluble receptor for advanced glycation endproducts is decreased in patients with juvenile idiopathic arthritis (ERA category) and inversely correlates with disease activity and S100A12 levels." J Rheumatol **38**(9): 1994-1999.
- Narazaki, M., K. Yasukawa, T. Saito, Y. Ohsugi, H. Fukui, Y. Koishihara, G. D. Yancopoulos, T. Taga and T. Kishimoto (1993). "Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130." Blood **82**(4): 1120-1126.
- Nechemia-Arbely, Y., D. Barkan, G. Pizov, A. Shriki, S. Rose-John, E. Galun and J. H. Axelrod (2008). "IL-6/IL-6R axis plays a critical role in acute kidney injury." J Am Soc Nephrol **19**(6): 1106-1115.
- Nechemia-Arbely, Y., A. Shriki, U. Denz, C. Drucker, J. Scheller, J. Raub, O. Pappo, S. Rose-John, E. Galun and J. H. Axelrod (2011). "Early hepatocyte DNA synthetic response posthepatectomy is modulated by IL-6 trans-signaling and PI3K/AKT activation." J Hepatol **54**(5): 922-929.
- Neiryneck, N., G. Glorieux, E. Schepers, F. Verbeke and R. Vanholder (2015). "Soluble tumor necrosis factor receptor 1 and 2 predict outcomes in advanced chronic kidney disease: a prospective cohort study." PLoS One **10**(3): e0122073.
- Nemeth, E., S. Rivera, V. Gabayan, C. Keller, S. Taudorf, B. K. Pedersen and T. Ganz (2004). "IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin." J Clin Invest **113**(9): 1271-1276.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube and W. Ehrhardt (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." Electrophoresis **9**(6): 255-262.
- Nicholson, S. E., D. De Souza, L. J. Fabri, J. Corbin, T. A. Willson, J. G. Zhang, A. Silva, M. Asimakis, A. Farley, A. D. Nash, D. Metcalf, D. J. Hilton, N. A. Nicola and M. Baca (2000). "Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6493-6498.
- Nicola, N. A., D. Metcalf, M. Matsumoto and G. R. Johnson (1983). "Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor." J Biol Chem **258**(14): 9017-9023.
- Nishimoto, N., Y. Kanakura, K. Aozasa, T. Johkoh, M. Nakamura, S. Nakano, N. Nakano, Y. Ikeda, T. Sasaki, K. Nishioka, M. Hara, H. Taguchi, Y. Kimura, Y. Kato, H. Asaoku, S.

- Kumagai, F., Kodama, H., Nakahara, K., Hagihara, K., Yoshizaki and T. Kishimoto (2005). "Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease." Blood **106**(8): 2627-2632.
- Novick, D., H. Engelmann, D. Wallach and M. Rubinstein (1989). "Soluble cytokine receptors are present in normal human urine." J Exp Med **170**(4): 1409-1414.
- Nowell, M. A., P. J. Richards, C. A. Fielding, S. Ognjanovic, N. Topley, A. S. Williams, G. Bryant-Greenwood and S. A. Jones (2006). "Regulation of pre-B cell colony-enhancing factor by STAT-3-dependent interleukin-6 trans-signaling: implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **54**(7): 2084-2095.
- Nowell, M. A., P. J. Richards, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, N. Topley, A. S. Williams and S. A. Jones (2003). "Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130." J Immunol **171**(6): 3202-3209.
- Oberg, H. H., D. Wesch, S. Grussel, S. Rose-John and D. Kabelitz (2006). "Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4+CD25- and CD25high regulatory T cells." Int Immunol **18**(4): 555-563.
- Oelzner, P., S. Franke, G. Lehmann, T. Eidner, G. Hein and G. Wolf (2012). "The balance between soluble receptors regulating IL-6 trans-signaling is predictive for the RANKL/osteoprotegerin ratio in postmenopausal women with rheumatoid arthritis." Rheumatol Int **32**(1): 199-206.
- Okada, M., M. Kitahara, S. Kishimoto, T. Matsuda, T. Hirano and T. Kishimoto (1988). "IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells." J Immunol **141**(5): 1543-1549.
- Okumura, F., Y. Matsunaga, Y. Katayama, K. I. Nakayama and S. Hatakeyama (2010). "TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3." J Cell Sci **123**(Pt 13): 2238-2245.
- Ortiz, M. A., C. Diaz-Torne, M. V. Hernandez, D. Reina, D. de la Fuente, I. Castellvi, P. Moya, J. M. Ruiz, H. Corominas, C. Zamora, E. Canto, R. Sanmarti, C. Juarez and S. Vidal (2015). "IL-6 blockade reverses the abnormal STAT activation of peripheral blood leukocytes from rheumatoid arthritis patients." Clin Immunol **158**(2): 174-182.
- Peschon, J. J., J. L. Slack, P. Reddy, K. L. Stocking, S. W. Sunnarborg, D. C. Lee, W. E. Russell, B. J. Castner, R. S. Johnson, J. N. Fitzner, R. W. Boyce, N. Nelson, C. J. Kozlosky, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, D. P. Cerretti, R. J. Paxton, C. J. March and R. A. Black (1998). "An essential role for ectodomain shedding in mammalian development." Science **282**(5392): 1281-1284.
- Peters, M., A. M. Müller and S. Rose-John (1998). "Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis." Blood **92**(10): 3495-3504.
- Rawlings, N. D., M. Waller, A. J. Barrett and A. Bateman (2014). "MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors." Nucleic Acids Res **42**(Database issue): D503-509.

- Richards, P. J., M. A. Nowell, S. Horiuchi, R. M. McLoughlin, C. A. Fielding, S. Grau, N. Yamamoto, M. Ehrmann, S. Rose-John, A. S. Williams, N. Topley and S. A. Jones (2006). "Functional characterization of a soluble gp130 isoform and its therapeutic capacity in an experimental model of inflammatory arthritis." Arthritis Rheum **54**(5): 1662-1672.
- Riethmueller, S., J. C. Ehlers, J. Lokau, S. Düsterhöft, K. Knittler, G. Dombrowsky, J. Grötzinger, B. Rabe, S. Rose-John and C. Garbers (2016a). "Cleavage Site Localization Differentially Controls Interleukin-6 Receptor Proteolysis by ADAM10 and ADAM17." Sci Rep **6**: 25550.
- Riethmueller, S., P. Somasundaram, J. C. Ehlers, C. W. Hung, C. M. Flynn, J. Lokau, M. Agthe, S. Düsterhöft, Y. Zhu, J. Grötzinger, I. Lorenzen, T. Koudelka, K. Yamamoto, U. Pickhinke, C. Becker-Pauly, M. Rädisch, A. Albrecht, M. Hessefort, D. Stehle, C. Unverzagt, S. Rose-John, A. Tholey und C. Garbers (2016b): "Proteolytic origin of the soluble human IL-6R in vivo and a decisive role of N-glycosylation." PLOS Biol (in Revision)
- Robbins, P. D. and A. E. Morelli (2014). "Regulation of immune responses by extracellular vesicles." Nat Rev Immunol **14**(3): 195-208.
- Rodig, S. J., M. A. Meraz, J. M. White, P. A. Lampe, J. K. Riley, C. D. Arthur, K. L. King, K. C. Sheehan, L. Yin, D. Pennica, E. M. Johnson, Jr. and R. D. Schreiber (1998). "Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses." Cell **93**(3): 373-383.
- Rodriguez-Rodriguez, L., J. R. Lamas, J. Varade, P. Lopez-Romero, P. Tornero-Esteban, L. Abasolo, E. G. de la Concha, J. A. Jover, E. Urcelay and B. Fernandez-Gutierrez (2011). "Plasma soluble IL-6 receptor concentration in rheumatoid arthritis: associations with the rs8192284 IL6R polymorphism and with disease activity." Rheumatol Int **31**(3): 409-413.
- Romano, M., M. Sironi, C. Toniatti, N. Polentarutti, P. Fruscella, P. Ghezzi, R. Faggioni, W. Luini, V. van Hinsbergh, S. Sozzani, F. Bussolino, V. Poli, G. Ciliberto and A. Mantovani (1997). "Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment." Immunity **6**(3): 315-325.
- Rose-John, S. (2002). "GP130 stimulation and the maintenance of stem cells." Trends Biotechnol **20**(10): 417-419.
- Rose-John, S. (2012). "IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6." Int J Biol Sci **8**(9): 1237-1247.
- Rose-John, S. and P. C. Heinrich (1994). "Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function." Biochem J **300** (Pt 2): 281-290.
- Rose-John, S. and M. F. Neurath (2004). "IL-6 trans-signaling: the heat is on." Immunity **20**(1): 2-4.
- Rose-John, S., J. Scheller, G. Elson and S. A. Jones (2006). "Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer." J Leukoc Biol **80**(2): 227-236.
- Rose-John, S., G. H. Wätzig, J. Scheller, J. Grötzinger and D. Seegert (2007). "The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches." Expert Opin Ther Targets **11**(5): 613-624.

- Rutsch, S., V. T. Neppalli, D. M. Shin, W. DuBois, H. C. Morse, 3rd, H. Goldschmidt and S. Janz (2010). "IL-6 and MYC collaborate in plasma cell tumor formation in mice." Blood **115**(9): 1746-1754.
- Scambia, G., U. Testa, P. B. Panici, R. Martucci, E. Foti, M. Petrini, M. Amoroso, V. Masciullo, C. Peschle and S. Mancuso (1994). "Interleukin-6 serum levels in patients with gynecological tumors." Int J Cancer **57**(3): 318-323.
- Schaper, F., C. Gendo, M. Eck, J. Schmitz, C. Grimm, D. Anhuf, I. M. Kerr and P. C. Heinrich (1998). "Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression." Biochem J **335** (Pt 3): 557-565.
- Schaper, F. and S. Rose-John (2015). "Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade." Cytokine Growth Factor Rev **26**(5): 475-487.
- Schauer, R. (2009). "Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions." Curr Opin Struct Biol **19**(5): 507-514.
- Scheller, J., A. Chalaris, C. Garbers and S. Rose-John (2011). "ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration." Trends Immunol **32**(8): 380-387.
- Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras and S. Rose-John (2011). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." Biochim Biophys Acta **1813**(5): 878-888.
- Scheller, J., B. Schuster, C. Holscher, T. Yoshimoto and S. Rose-John (2005). "No inhibition of IL-27 signaling by soluble gp130." Biochem Biophys Res Commun **326**(4): 724-728.
- Schmitz, J., M. Weissenbach, S. Haan, P. C. Heinrich and F. Schaper (2000). "SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130." J Biol Chem **275**(17): 12848-12856.
- Schnolzer, M., P. Jedrzejewski and W. D. Lehmann (1996). "Protease-catalyzed incorporation of ¹⁸O into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." Electrophoresis **17**(5): 945-953.
- Schroers, A., O. Hecht, K. J. Kallen, M. Pachta, S. Rose-John and J. Grötzinger (2005). "Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly on the cellular membrane." Protein Sci **14**(3): 783-790.
- Schuett, H., R. Oestreich, G. H. Wätzig, W. Annema, M. Luchtefeld, A. Hillmer, U. Bavendiek, J. von Felden, D. Divchev, T. Kempf, K. C. Wollert, D. Seegert, S. Rose-John, U. J. Tietge, B. Schieffer and K. Grote (2012). "Transsignaling of interleukin-6 crucially contributes to atherosclerosis in mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(2): 281-290.
- Schumacher, N., D. Meyer, A. Mauermann, J. von der Heyde, J. Wolf, J. Schwarz, K. Knittler, G. Murphy, M. Michalek, C. Garbers, J. W. Bartsch, S. Guo, B. Schacher, P. Eickholz, A. Chalaris, S. Rose-John and B. Rabe (2015). "Shedding of Endogenous Interleukin-6 Receptor (IL-6R) Is Governed by A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) Proteases while a Full-length IL-6R Isoform Localizes to Circulating Microvesicles." J Biol Chem **290**(43): 26059-26071.

- Segura, E., C. Nicco, B. Lombard, P. Veron, G. Raposo, F. Batteux, S. Amigorena and C. Thery (2005). "ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming." Blood **106**(1): 216-223.
- Siewert, E., W. Müller-Esterl, R. Starr, P. C. Heinrich and F. Schaper (1999). "Different protein turnover of interleukin-6-type cytokine signalling components." Eur J Biochem **265**(1): 251-257.
- Slieker, L. J. and M. D. Lane (1985). "Post-translational processing of the epidermal growth factor receptor. Glycosylation-dependent acquisition of ligand-binding capacity." J Biol Chem **260**(2): 687-690.
- Song, S. N., N. Tomosugi, H. Kawabata, T. Ishikawa, T. Nishikawa and K. Yoshizaki (2010). "Down-regulation of hepcidin resulting from long-term treatment with an anti-IL-6 receptor antibody (tocilizumab) improves anemia of inflammation in multicentric Castleman disease." Blood **116**(18): 3627-3634.
- Song, Y., K. Miyaki, J. Araki, L. Zhang, K. Omae and M. Muramatsu (2007). "The interaction between the interleukin 6 receptor gene genotype and dietary energy intake on abdominal obesity in Japanese men." Metabolism **56**(7): 925-930.
- Sprecher, C. A., F. J. Grant, J. W. Baumgartner, S. R. Presnell, S. K. Schrader, T. Yamagiwa, T. E. Whitmore, P. J. O'Hara and D. F. Foster (1998). "Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor." Biochem Biophys Res Commun **246**(1): 82-90.
- Stanley, P., H. Schachter and N. Taniguchi (2009). N-Glycans. Essentials of Glycobiology. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko et al. Cold Spring Harbor (NY).
- Stone, K., E. Woods, S. M. Szmania, O. W. Stephens, T. K. Garg, B. Barlogie, J. D. Shaughnessy, Jr., B. Hall, M. Reddy, A. Hoering, E. Hansen and F. van Rhee (2013). "Interleukin-6 receptor polymorphism is prevalent in HIV-negative Castleman Disease and is associated with increased soluble interleukin-6 receptor levels." PLoS One **8**(1): e54610.
- Symes, A., N. Stahl, S. A. Reeves, T. Farruggella, T. Servidei, T. Gearan, G. Yancopoulos and J. S. Fink (1997). "The protein tyrosine phosphatase SHP-2 negatively regulates ciliary neurotrophic factor induction of gene expression." Curr Biol **7**(9): 697-700.
- Szabo, R., O. Lang, J. Lang, E. Illyes, L. Kohidai and F. Hudecz (2015). "Effect of SXWS/WSXWS peptides on chemotaxis and adhesion of the macrophage-like cell line J774." J Mol Recognit **28**(4): 253-260.
- Taga, T., M. Hibi, Y. Hirata, H. Yawata, S. Natsuka, K. Yasukawa, T. Totsuka, K. Yamasaki, T. Hirano and T. Kishimoto (1989). "Interleukin-6 receptor and a unique mechanism of its signal transduction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 2**: 713-722.
- Taga, T. and T. Kishimoto (1995). "Signaling mechanisms through cytokine receptors that share signal transducing receptor components." Curr Opin Immunol **7**(1): 17-23.
- Takakura-Yamamoto, R., S. Yamamoto, S. Fukuda and M. Kurimoto (1996). "O-glycosylated species of natural human tumor-necrosis factor-alpha." Eur J Biochem **235**(1-2): 431-437.

- Tanaka, H., I. Matsumura, K. Nakajima, H. Daino, J. Sonoyama, H. Yoshida, K. Oritani, T. Machii, M. Yamamoto, T. Hirano and Y. Kanakura (2000). "GATA-1 blocks IL-6-induced macrophage differentiation and apoptosis through the sustained expression of cyclin D1 and bcl-2 in a murine myeloid cell line M1." Blood **95**(4): 1264-1273.
- Tanaka, T., M. Narazaki and T. Kishimoto (2014). "IL-6 in inflammation, immunity, and disease." Cold Spring Harb Perspect Biol **6**(10): a016295.
- Tanaka, Y. and E. Martin Mola (2014). "IL-6 targeting compared to TNF targeting in rheumatoid arthritis: studies of olokizumab, sarilumab and sirukumab." Ann Rheum Dis **73**(9): 1595-1597.
- Taniguchi, K. and M. Karin (2014). "IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer." Semin Immunol **26**(1): 54-74.
- Tsukamoto, H., R. Nishikata, S. Senju and Y. Nishimura (2013). "Myeloid-derived suppressor cells attenuate TH1 development through IL-6 production to promote tumor progression." Cancer Immunol Res **1**(1): 64-76.
- Tucher, J., D. Linke, T. Koudelka, L. Cassidy, C. Tredup, R. Wichert, C. Pietrzik, C. Becker-Pauly and A. Tholey (2014). "LC-MS based cleavage site profiling of the proteases ADAM10 and ADAM17 using proteome-derived peptide libraries." J Proteome Res **13**(4): 2205-2214.
- van Dam, M., J. Müllberg, H. Schooltink, T. Stoyan, J. P. Brakenhoff, L. Graeve, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1993). "Structure-function analysis of interleukin-6 utilizing human/murine chimeric molecules. Involvement of two separate domains in receptor binding." J Biol Chem **268**(20): 15285-15290.
- van Veen, H. A., M. E. Geerts, P. H. van Berkel and J. H. Nuijens (2004). "The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis." Eur J Biochem **271**(4): 678-684.
- Vardam, T. D., L. Zhou, M. M. Appenheimer, Q. Chen, W. C. Wang, H. Baumann and S. S. Evans (2007). "Regulation of a lymphocyte-endothelial-IL-6 trans-signaling axis by fever-range thermal stress: hot spot of immune surveillance." Cytokine **39**(1): 84-96.
- Varki, A. and N. Sharon (2009). Historical Background and Overview. Essentials of Glycobiology. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko et al. Cold Spring Harbor (NY).
- Verstovsek, S., F. Passamonti, A. Rambaldi, G. Barosi, P. J. Rosen, E. Rumi, E. Gattoni, L. Pieri, P. Guglielmelli, C. Elena, S. He, N. Contel, B. Mookerjee, V. Sandor, M. Cazzola, H. M. Kantarjian, T. Barbui and A. M. Vannucchi (2014). "A phase 2 study of ruxolitinib, an oral JAK1 and JAK2 Inhibitor, in patients with advanced polycythemia vera who are refractory or intolerant to hydroxyurea." Cancer **120**(4): 513-520.
- Vollmer, P., B. Oppmann, N. Voltz, M. Fischer and S. Rose-John (1999). "A role for the immunoglobulin-like domain of the human IL-6 receptor. Intracellular protein transport and shedding." Eur J Biochem **263**(2): 438-446.
- Vollmer, P., I. Walev, S. Rose-John and S. Bhakdi (1996). "Novel pathogenic mechanism of microbial metalloproteinases: liberation of membrane-anchored molecules in biologically active form exemplified by studies with the human interleukin-6 receptor." Infect Immun **64**(9): 3646-3651.

- Waage, A., P. Brandtzaeg, A. Halstensen, P. Kierulf and T. Espevik (1989). "The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome." J Exp Med **169**(1): 333-338.
- Walev, I., P. Vollmer, M. Palmer, S. Bhakdi and S. Rose-John (1996). "Pore-forming toxins trigger shedding of receptors for interleukin 6 and lipopolysaccharide." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7882-7887.
- Walker, F., H. H. Zhang, V. Matthews, J. Weinstock, E. C. Nice, M. Ernst, S. Rose-John and A. W. Burgess (2008). "IL6/sIL6R complex contributes to emergency granulopoietic responses in G-CSF- and GM-CSF-deficient mice." Blood **111**(8): 3978-3985.
- Wang, J., A. Platt, R. Upmanyu, S. Germer, G. Lei, C. Rabe, R. Benayed, A. Kenwright, A. Hemmings, M. Martin and O. Harari (2013). "IL-6 pathway-driven investigation of response to IL-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis." BMJ Open **3**(8): e003199.
- Wang, X. P., M. Schunck, K. J. Kallen, C. Neumann, C. Trautwein, S. Rose-John and E. Proksch (2004). "The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis." J Invest Dermatol **123**(1): 124-131.
- Wang, Y. and G. M. Fuller (1994). "Phosphorylation and internalization of gp130 occur after IL-6 activation of Jak2 kinase in hepatocytes." Mol Biol Cell **5**(7): 819-828.
- Ward, L. D., G. J. Howlett, G. Discolo, K. Yasukawa, A. Hammacher, R. L. Moritz and R. J. Simpson (1994). "High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130." J Biol Chem **269**(37): 23286-23289.
- Wätzig, G. H., A. Chalaris, P. Rosenstiel, J. Suthaus, C. Holland, N. Karl, L. Valles Uriarte, A. Till, J. Scheller, J. Grotzinger, S. Schreiber, S. Rose-John and D. Seegert (2010). "N-linked glycosylation is essential for the stability but not the signaling function of the interleukin-6 signal transducer glycoprotein 130." J Biol Chem **285**(3): 1781-1789.
- Wegenka, U. M., J. Buschmann, C. Luttkien, P. C. Heinrich and F. Horn (1993). "Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level." Mol Cell Biol **13**(1): 276-288.
- Wei, S. T., Y. H. Sun, S. H. Zong and Y. B. Xiang (2015). "Serum Levels of IL-6 and TNF-alpha May Correlate with Activity and Severity of Rheumatoid Arthritis." Med Sci Monit **21**: 4030-4038.
- Weiergraber, O., U. Hemmann, A. Kuster, G. Müller-Newen, J. Schneider, S. Rose-John, P. Kurschat, J. P. Brakenhoff, M. H. Hart, S. Stabel and et al. (1995). "Soluble human interleukin-6 receptor. Expression in insect cells, purification and characterization." Eur J Biochem **234**(2): 661-669.
- Wisniewska, M., P. Goettig, K. Maskos, E. Belouski, D. Winters, R. Hecht, R. Black and W. Bode (2008). "Structural determinants of the ADAM inhibition by TIMP-3: crystal structure of the TACE-N-TIMP-3 complex." J Mol Biol **381**(5): 1307-1319.
- Wolf, J., S. Rose-John and C. Garbers (2014). "Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system." Cytokine **70**(1): 11-20.

- Wunderlich, F. T., P. Strohle, A. C. Konner, S. Gruber, S. Tovar, H. S. Bronneke, L. Juntti-Berggren, L. S. Li, N. van Rooijen, C. Libert, P. O. Berggren and J. C. Bruning (2010). "Interleukin-6 signaling in liver-parenchymal cells suppresses hepatic inflammation and improves systemic insulin action." Cell Metab **12**(3): 237-249.
- Xu, Z., E. Bouman-Thio, C. Comisar, B. Frederick, B. Van Hartingsveldt, J. C. Marini, H. M. Davis and H. Zhou (2011). "Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of a human anti-IL-6 monoclonal antibody (sirukumab) in healthy subjects in a first-in-human study." Br J Clin Pharmacol **72**(2): 270-281.
- Yamamoto, K., H. Goto, K. Hirao, A. Nakajima, H. Origasa, K. Tanaka, M. Tomobe and K. Totsuka (2015). "Longterm Safety of Tocilizumab: Results from 3 Years of Followup Postmarketing Surveillance of 5573 Patients with Rheumatoid Arthritis in Japan." J Rheumatol **42**(8): 1368-1375.
- Yamasaki, K., T. Taga, Y. Hirata, H. Yawata, Y. Kawanishi, B. Seed, T. Taniguchi, T. Hirano and T. Kishimoto (1988). "Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor." Science **241**(4867): 825-828.
- Yan, B., J. J. Wei, Y. Yuan, R. Sun, D. Li, J. Luo, S. J. Liao, Y. H. Zhou, Y. Shu, Q. Wang, G. M. Zhang and Z. H. Feng (2013). "IL-6 cooperates with G-CSF to induce protumor function of neutrophils in bone marrow by enhancing STAT3 activation." J Immunol **190**(11): 5882-5893.
- Yan, I., J. Schwarz, K. Lucke, N. Schumacher, V. Schumacher, S. Schmidt, B. Rabe, P. Saftig, M. Donners, S. Rose-John, H. W. Mittrucker and A. Chalaris (2015). "ADAM17 controls IL-6 signaling by cleavage of the murine IL-6Ralpha from the cell surface of leukocytes during inflammatory responses." J Leukoc Biol.
- Yang, C., H. Lee, V. Jove, J. Deng, W. Zhang, X. Liu, S. Forman, T. H. Dellinger, M. Wakabayashi, H. Yu and S. Pal (2013). "Prognostic significance of B-cells and pSTAT3 in patients with ovarian cancer." PLoS One **8**(1): e54029.
- Yasukawa, K., K. Futatsugi, T. Saito, H. Yawata, M. Narazaki, H. Suzuki, T. Taga and T. Kishimoto (1992). "Association of recombinant soluble IL-6-signal transducer, gp130, with a complex of IL 6 and soluble IL-6 receptor, and establishment of an ELISA for soluble gp130." Immunol Lett **31**(2): 123-130.
- Yawata, H., K. Yasukawa, S. Natsuka, M. Murakami, K. Yamasaki, M. Hibi, T. Taga and T. Kishimoto (1993). "Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130." EMBO J **12**(4): 1705-1712.
- Yoshizaki, K., T. Matsuda, N. Nishimoto, T. Kuritani, L. Taeho, K. Aozasa, T. Nakahata, H. Kawai, H. Tagoh, T. Komori and et al. (1989). "Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease." Blood **74**(4): 1360-1367.
- Zhang, J., Y. Li, Y. Sun and B. Shen (2001). "MEK inhibitor augments IL-6-induced growth arrest and apoptosis, but antagonizes IL-6-induced macrophage differentiation of M1 cells." Immunol Lett **77**(3): 165-167.
- Zheng, T., X. Hong, J. Wang, T. Pei, Y. Liang, D. Yin, R. Song, X. Song, Z. Lu, S. Qi, J. Liu, B. Sun, C. Xie, S. Pan, Y. Li, X. Luo, S. Li, X. Fang, N. Bhatta, H. Jiang and L. Liu (2014). "Gankyrin promotes tumor growth and metastasis through activation of IL-6/STAT3 signaling in human cholangiocarcinoma." Hepatology **59**(3): 935-946.

Zhong, Z., Z. Wen and J. E. Darnell, Jr. (1994). "Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6." Science **264**(5155): 95-98.

8 ANHANG

8.1 Angehängte Abbildungen

Alignment:

```

iso1      MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTTCPGVEPEDNATVHW
iso2      MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTTCPGVEPEDNATVHW
          *****

iso1      VLRKPAAGSHPSRWAGMGRRLLLRSVQLHDSGNYSCYRAGRPAAGTVHLLVDVPPEEPQLS
iso2      VLRKPAAGSHPSRWAGMGRRLLLRSVQLHDSGNYSCYRAGRPAAGTVHLLVDVPPEEPQLS
          *****

iso1      CFRKSPLSNVVCEWGRSTPSTLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPQCYSQESQKFSQQLAV
iso2      CFRKSPLSNVVCEWGRSTPSTLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPQCYSQESQKFSQQLAV
          *****

iso1      PEGDSSFYIVSMCVASSVSGSKFSKTQTFQGCGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQD
iso2      PEGDSSFYIVSMCVASSVSGSKFSKTQTFQGCGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQD
          *****

iso1      PHSWNSSFYRLRFELRYRAERSKFTFTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ
iso2      PHSWNSSFYRLRFELRYRAERSKFTFTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ
          *****

iso1      GEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNI LFRDSANATSLPVQDSS
iso2      GEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNI LFRDSANATSLP GSRER
          *****

iso1      SVPLPTFLVAGGSLAFGTL L C I A I V L R F K K T W K L R A L K E G K T S M H P P Y S L G Q L V P E R P R P
iso2      GSCGI-----

iso1      TPVLVPLISPPVSPSS L G S D N T S S H N R P D A R D P R S P Y D I S N T D Y F F P R
iso2      -----

```

Abbildung 37: Alignment zwischen der Aminosäuresequenz der Isoform 1 und der Isoform 2 (ds-sIL-6R) des humanen IL-6R.

Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalX erstellt (Jeanmougin et al. 1998). Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*) markiert. Die rot markierte Aminosäuresequenz ist ausschließlich in der Isoform 2 des humanen IL-6R zu finden. Die Darstellung des Alignments erfolgte mit TEXshade (Beitz 2000).

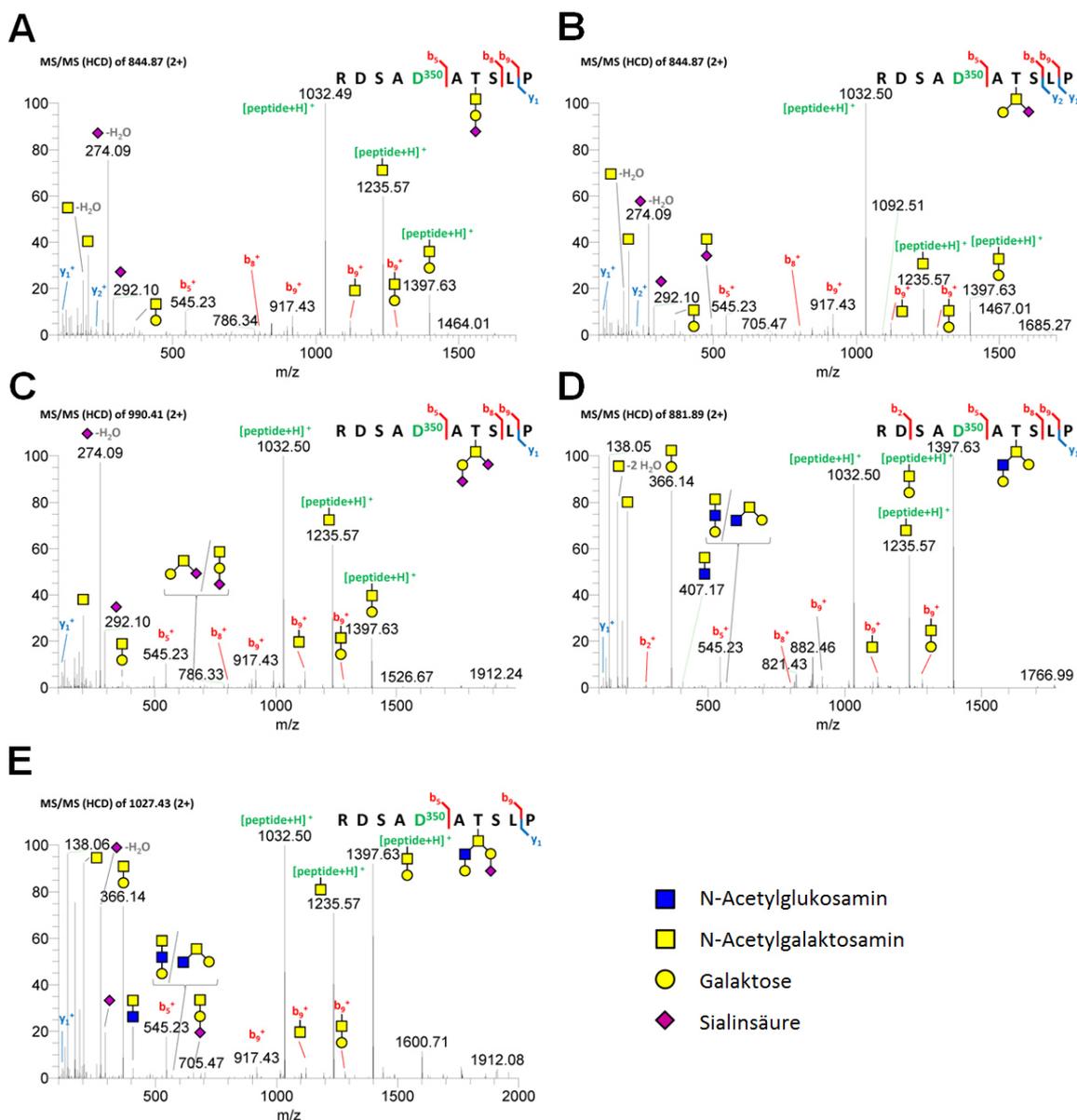


Abbildung 38: Identifizierung von verschiedenen O-Glykanstrukturen des durch ADAM17 prozessierten sIL-6R mittels Massenspektrometrie *in vitro*.

(A-E)MS/MS-Spektren (HCD) des mittels manueller Spektreninterpretation identifizierten C-terminalen Peptids des durch ADAM17-vermittelte Proteolyse entstandenen sIL-6R. Die N-Glykosylierungsstelle am N350, die aufgrund der PNGase F Behandlung zu einer Asparaginsäure modifiziert wurde, ist in grün dargestellt. Die verschiedenen identifizierten O-Glykanmotive an T352 sind dargestellt. Die Namen der Bausteine der O-Glykanmotive sind der Legende (rechts unten) zu entnehmen. Die Abbildung wurde von Prasath Somasundaram von der AG für systematische Proteomics und Bioanalytik des Instituts für Experimentelle Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt. Die dargestellten Experimente wurden ebenfalls von Prasath Somasundaram durchgeführt.

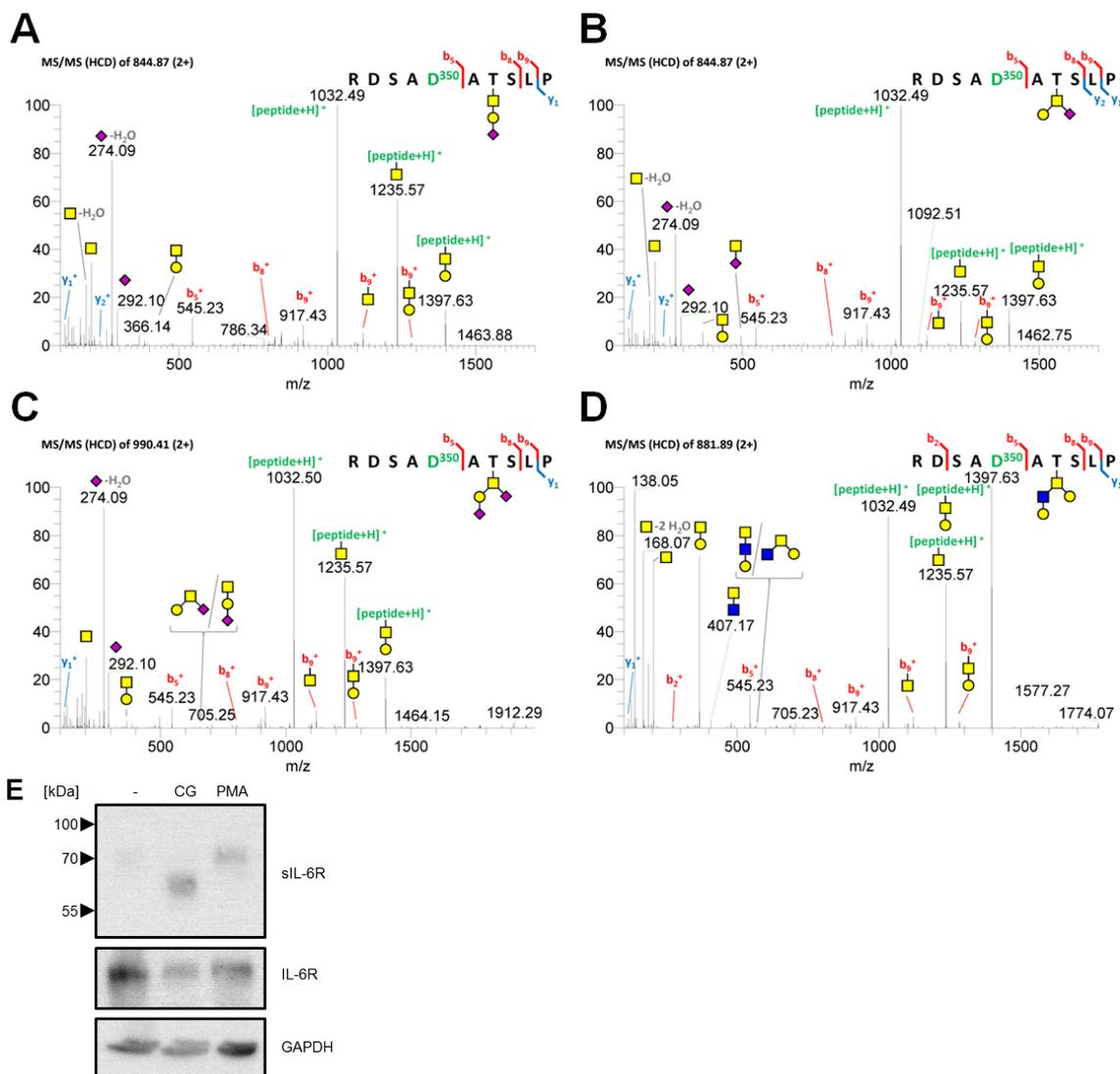


Abbildung 39: Identifizierung von verschiedenen O-Glykanstrukturen des durch ADAM10 prozessierten sIL-6R mittels Massenspektrometrie *in vitro*.

(A-D) MS/MS-Spektren (HCD) des mittels manueller Spektreninterpretation identifizierten C-terminalen Peptids des durch ADAM10-vermittelte Proteolyse entstandenen sIL-6R. Die N-Glykosylierungsstelle am N350, die aufgrund der PNGase F Behandlung zu einer Asparaginsäure modifiziert wurden, ist in grün dargestellt. Die verschiedenen identifizierten O-Glykanmotive an T352 sind dargestellt. Die Namen der Bausteine der O-Glykanmotive sind der Legende in Abbildung 38 (rechts unten) zu entnehmen. Die Abbildung wurde von Prasath Somasundaram von der AG für systematische Proteomics und Bioanalytik des Instituts für Experimentelle Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt. Die dargestellten Experimente wurden ebenfalls von Prasath Somasundaram durchgeführt. (E) HEK293-Zellen, die transient mit cDNA von dem IL-6R transfiziert wurden, wurden entweder für 2 h mit 100 nM PMA, 1 µg Cathepsin G (CG) (Athens Research, Athens, Georgia, USA) oder Kontrollpuffer behandelt. Der präzipitierte sIL-6R aus dem Überstand, als auch der IL-6R in den Zelllysaten wurden mittels Western Blot analysiert. GAPDH diente als Ladekontrolle. Es ist ein repräsentatives Experiment von 2 durchgeführten Experimenten gezeigt. Das Experiment wurde von Maria Agthe vom Biochemischen Institut an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt.

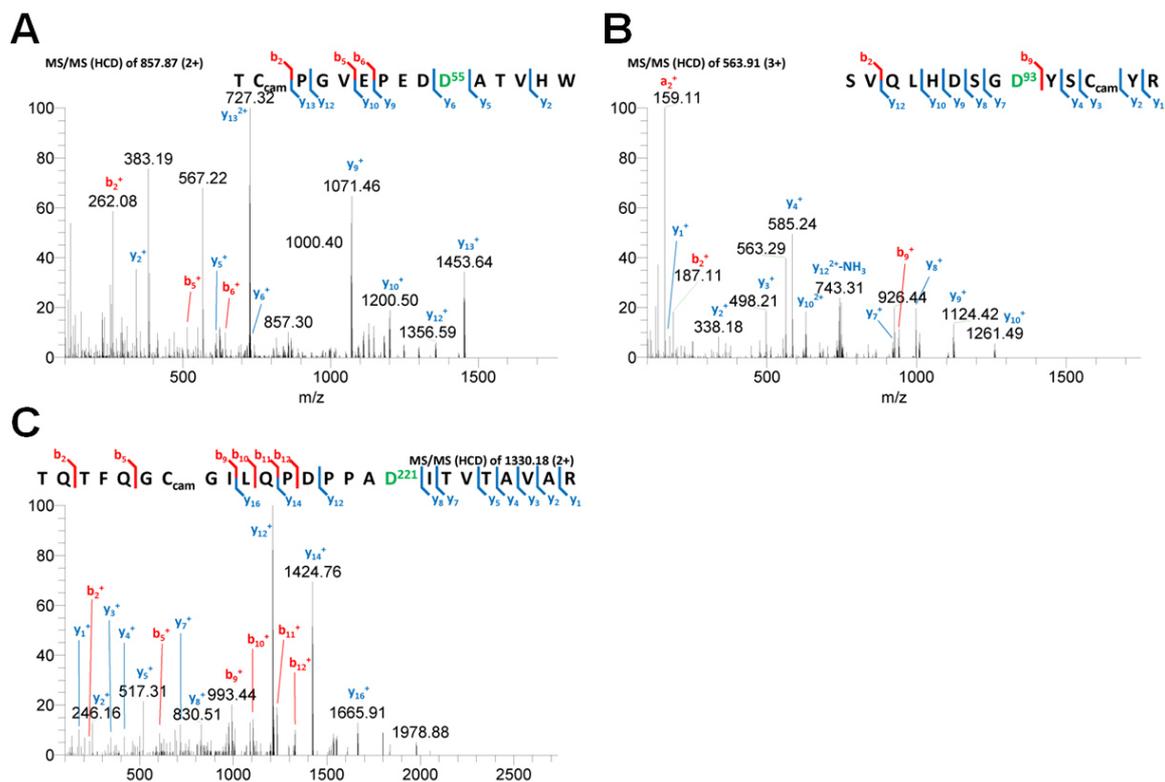


Abbildung 40: Verifizierung der N-Glykosylierungsstellen des aus humanem Serum isolierten IL-6R.

(A-C) MS/MS-Spektren (HCD) der mittels Computer-assistierter Datenbanksuche identifizierten Peptide, des aus humanem Serum isolierten sIL-6R, bei denen eine N-Glykosylierungsstelle nachgewiesen werden konnte. Die Aminosäurereste an Position N55, N93 und N221, welche aufgrund der Behandlung mit PNGase F in der Gegenwart von H₂¹⁸O zu Asparaginsäureresten modifiziert wurden, sind in grün dargestellt. Die N-Glykosylierung von N350 wurde bereits in Abbildung 25C nachgewiesen. Die Abbildung wurde von Prasath Somasundaram von der AG für systematische Proteomics und Bioanalytik des Instituts für Experimentelle Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt. Die dargestellten Experimente wurden ebenfalls von Prasath Somasundaram durchgeführt.

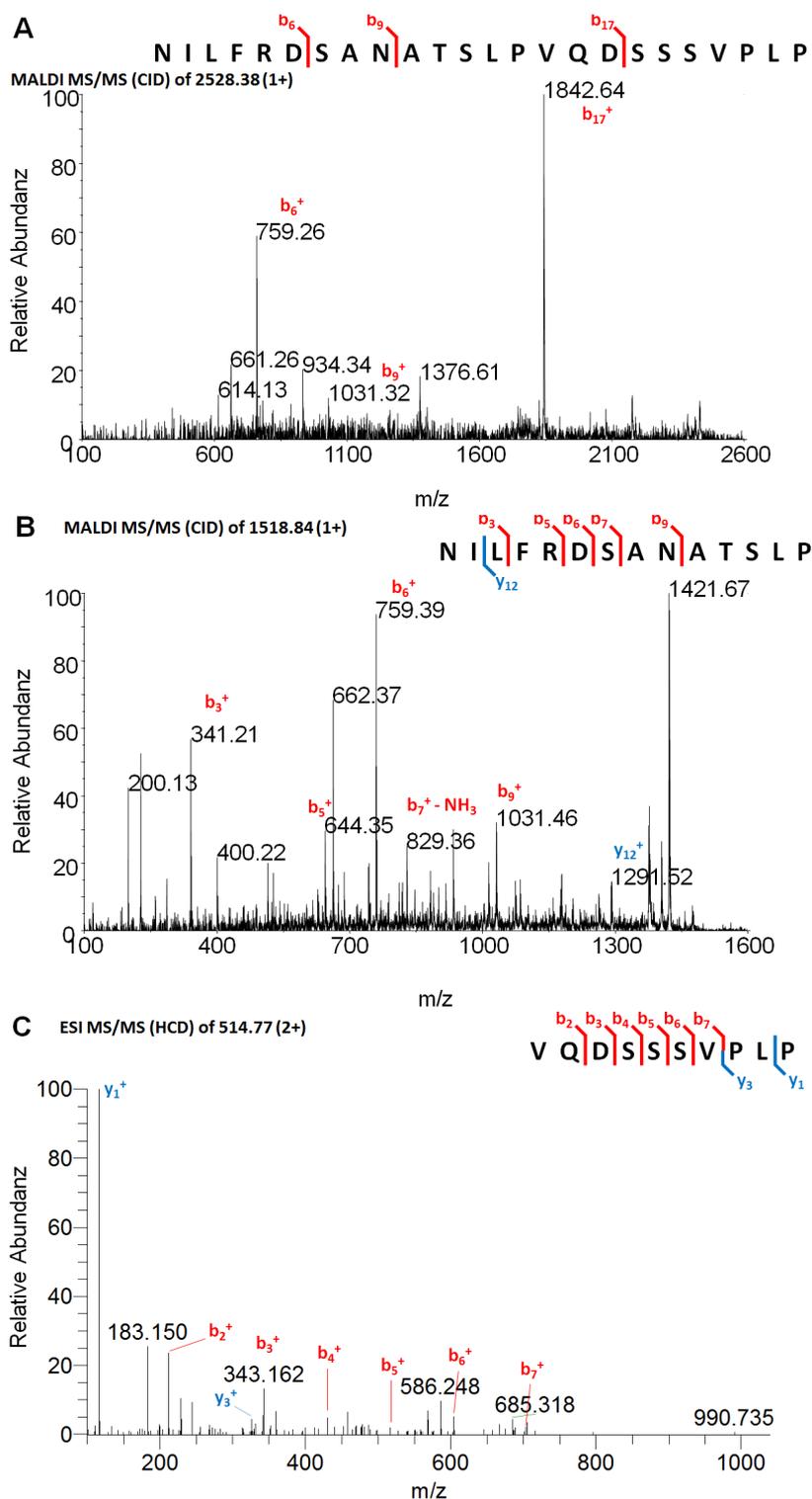
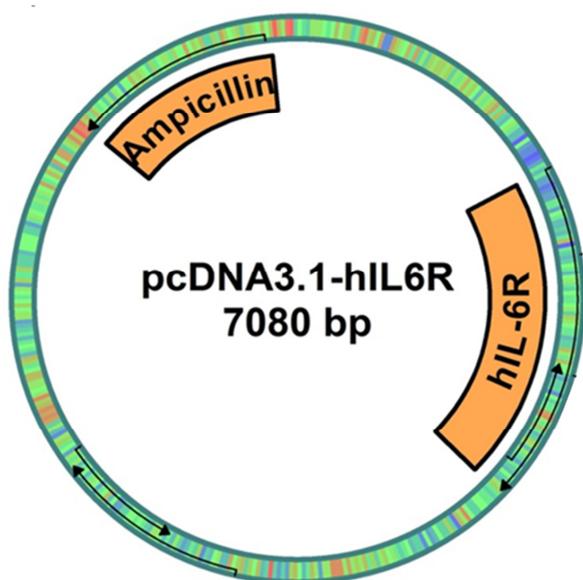


Abbildung 41: Identifizierung der ADAM17-Schnittstelle eines Peptids des IL-6R-Stalk-Bereichs.

(A) MS/MS-Spektrum des ungeschnittenen Peptids des IL-6R-Stalk-Bereichs (Peptid 1 siehe Abbildung 34). (B-C) MS/MS-Spektren des geschnittenen Peptids des IL-6R-Stalk-Bereichs (Peptid 1 siehe Abbildung 34). Die Abbildung wurde von Prasath Somasundaram von der AG für systematische Proteomics und Bioanalytik des Instituts für Experimentelle Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt. Die dargestellten Experimente wurden von Dr. Tomas Koudelka von der AG für systematische Proteomics und Bioanalytik des Instituts für Experimentelle Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt.

A



B




Abbildung 42: Plasmidkarten von pcDNA3.1-hIL-6R und von pMOWS-(puro)-hIL-6R.

(A) Plasmidkarte des pcDNA3.1-hIL-6R-Vektors. Die DNA-Sequenzen, die für den hIL-6R und die Ampicillin-Resistenz kodieren, sind in orange dargestellt. (B) Plasmidkarte des pMOWS-(puro)-hIL-6R-Vektors. Die DNA-Sequenzen, die für den hIL-6R und die Puromycin- und Ampicillin-Resistenz kodieren, sind in orange dargestellt. Die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsendonukleasen *Sbf*I und *Age*I, die für die Subklonierung der Inserts für die hIL-6R-Varianten in den pMOWS-(puro)-hIL-6R-Vektor verwendet wurden, sind in blau dargestellt.

8.2 Lebenslauf

Name: Steffen Riethmüller

Geburtstag: 25.05.1986

Geburtsort: Bremen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

05/2013 - 2016

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für Biochemie in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Christoph Garbers mit dem Titel: Die Entstehung des humanen löslichen Interleukin-6 Rezeptors.

10/2012 - 04/2013

Bayer Pharma AG, Wuppertal

Befristete Anstellung als technischer Mitarbeiter in der Qualitätskontrolle und der Abteilung Ophthalmologie.

04/2011 - 06/2012

Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme ,Magdeburg

Anfertigung der Masterarbeit im Bereich „Proteomics und DSP“ mit dem Titel: *2D-gel electrophoresis and mass spectrometry as analytical tools for DSP characterization of influenza vaccine production processes.*

03/2010 - 06/2012

Hochschule Bremen

Internationaler Studiengang für Angewandte und Technische Biologie (M.Sc.)

08/2008 - 01/2009

University of Gothenburg, Schweden

Auslandsstudiensemester

09/2006 - 01/2010

Hochschule Bremen

Internationaler Studiengang für Angewandte und Technische Biologie (B.Sc.)

07/2003 - 05/2006

Gymnasium Obervieland, Bremen

Allgemeine Hochschulreife

8.3 Publikationen

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht.

Originalbeiträge:

Riethmueller, S., J. C. Ehlers, J. Lokau, S. Düsterhöft, K. Knittler, G. Dombrowsky, J. Grötzinger, B. Rabe, S. Rose-John and C. Garbers (2016a). "Cleavage Site Localization Differentially Controls Interleukin-6 Receptor Proteolysis by ADAM10 and ADAM17." *Sci Rep* 6: 25550.

Riethmueller, S., P. Somasundaram, J. C. Ehlers, C. W. Hung, C. M. Flynn, J. Lokau, M. Agthe, S. Düsterhöft, Y. Zhu, J. Grötzinger, I. Lorenzen, T. Koudelka, K. Yamamoto, U. Pickhinke, C. Becker-Pauly, M. Rädisch, A. Albrecht, M. Hessefort, D. Stehle, C. Unverzagt, S. Rose-John, A. Tholey und C. Garbers (2016b): "Proteolytic origin of the soluble human IL-6R in vivo and a decisive role of N-glycosylation. " *PLOS Biol* (**in Revision**)

8.4 Tagungsbeiträge

09/2015: IRTG Summer School 2015: Protease & Pathophysiology; Titel: Molecular characterization of the human interleukin-6 receptor. (**Vortrag**)

03/2014: Winterschool on Proteinases and Inhibitors in Tiers (Italy); Molecular characterization of the human interleukin-6 receptor. (**Vortrag**)

02/2014: International 5th Annual Cluster Symposium of the Exzellenzcluster Inflammation at Interfaces; Titel: Molecular analysis of the human interleukin-6 receptor by ¹⁸O-labeling and LC-MS. Somasundaram, P.,*, **Riethmueller, S.***, Hung, C.-W., Koudelka, T., Rose-John, S., Tholey A. and Garbers, C. *These authors contributed equally. (**Poster**)

8.5 Eidesstattliche Erklärung

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

Diese Dissertation wurde bisher an keiner anderen Fakultät vorgelegt.

Ich erkläre, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Kiel, den 02.08.2016

Steffen Riethmüller

8.6 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Rose-John für die Möglichkeit bedanken, die vorliegende Arbeit am Institut für Biochemie anfertigen zu können, sowie für die intensive Betreuung und die vielen konstruktiven Denkanstöße.

Ein sehr großer Dank geht an meinen Arbeitsgruppenleiter PD Dr. Christoph Garbers, der mich immer fachkundig und intensiv unterstützt hat und stets ein offenes Ohr für mich hatte. Des Weiteren möchte ich meiner Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre danken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Dr. Janina Wolf, die mich in vielen Dingen tatkräftig unterstützt hat. Britta Hansen danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Reinigung und Expression des ds-sIL-6R. Dr. Athena Chalaris will ich sehr herzlich für die tolle Aufnahme am Biochemischen Instituts sowie die intensive Betreuung in meinen ersten Arbeitswochen danken. Herrn Prof. Dr. Joachim Grötzinger danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit und für die Bereitstellung der molekularen Protein-Modelle. PD Dr. Inken Lorenzen und Dr. Stefan Düsterhöft danke ich für die Hilfe bei der Bedienung der RP-HPLC.

Außerdem bedanke ich mich für die kooperative und bereichernde Zusammenarbeit mit Prasath Somasundaram, Dr. Tomas Koudelka, Prof. Dr. Andreas Tholey, Dr. Chien-Wen Hung und Prof. Dr. Carlo Unnverzagt.

Alle anderen nicht genannten Kollegen des Biochemischen Instituts, insbesondere die der Arbeitsgruppen von jun. Prof. Dr. Björn Rabe, Dr. Athena Chalaris und Dr. Dirk Schmidt-Arras und Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly, danke ich für ihr kollegiales Verhalten, ihre tatkräftige Hilfe und für die freundliche Arbeitsatmosphäre.