

Aus dem Biochemischen Institut
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Proteolytische Prozessierung von Interleukin-Rezeptoren durch Metalloproteasen

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

vorgelegt von
Martin Pascal Sammel
aus Saarlouis

Kiel 2024

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly, Biochemisches Institut
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Leypoldt, Institut für Klinische Chemie

Tag der mündlichen Prüfung: 26.09.2025
zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.06.2025

gez.: Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

URN: urn:nbn:de:gbv:8:3-2025-01750-2

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Glossarium	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1. Proteolyse	1
1.2. Metalloproteasen	2
1.3. A Disintegrin And Metalloproteinases	2
1.4. Meprin Metalloproteasen	4
1.5. Membrane-type-I matrix metalloproteinase	6
1.6. Interleukine	7
1.6.1. Interleukin-6 Familie	7
1.6.2. Interleukin-6	7
1.6.3. Interleukin-11	13
2. Fragestellung der Arbeit	16
3. Material und Methoden	17
3.1. Material	17
3.1.1. Laborgeräte	17
3.1.2. Labor- und Verbrauchsmaterialien	19
3.1.3. Kits	21
3.1.4. Puffer, Lösungen, Nährmedien	22
3.1.5. Chemikalien	25
3.1.6. Zelllinien	26
3.1.7. Marker	27
3.2. Methoden	28
3.2.1. Zellbiologische Methoden	28
3.2.1.1. Kultivieren von Zellen	28

3.2.1.2.	Passagieren von adhärenenten Zellen	28
3.2.1.3.	Passagieren von Suspensionszellen	29
3.2.1.4.	Transiente Transfektion	29
3.2.1.5.	Stimulation von <i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i> 10 und 17 ..	30
3.2.1.6.	Inhibition des <i>sheddings</i> von ADAM17 durch ADAM8	31
3.2.1.7.	Zellernte	31
3.2.1.8.	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i> <i>Phosphorylierung</i>	31
3.2.2.	Molekularbiologische Methoden	32
3.2.2.1.	Hitzeschocktransformation	32
3.2.2.2.	Selektionierung einer Bakterienkolonie	33
3.2.2.3.	Plasmidisolation aus <i>E. coli</i>	33
3.2.2.4.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
3.2.2.5.	Polymerase-Kettenreaktion	34
3.2.2.6.	Agarose-Gelelektrophorese	35
3.2.2.7.	Gelextraktion	35
3.2.2.8.	Klonierung von MT1-MMP	35
3.2.2.8.1.	<i>Overlap Extension Polymerase Chain Reaction</i>	36
3.2.2.8.2.	Restriktionsverdau	38
3.2.2.8.3.	Ligation	40
3.2.2.8.4.	Sequenzierung	41
3.2.3.	Proteinbiochemische Methoden	41
3.2.3.1.	Herstellung von Zelllysaten	41
3.2.3.2.	TCA-Fällung	42
3.2.3.3.	<i>Bicinchoninic Acid Assay</i>	42
3.2.3.4.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	43
3.2.3.5.	<i>Western Blot</i>	44
3.2.3.6.	Coimmunpräzipitation	47

3.2.3.7.	RNA-Extraktion und cDNA-Synthese	48
3.2.3.8.	<i>Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction</i>	48
4.	Ergebnisse	51
4.1.	Proteolytische Prozessierung des Interleukin-6 Rezeptors	51
4.1.1.	Der Interleukin-6 Rezeptor wird durch unterschiedliche Metalloproteasen <i>geshededet</i>	51
4.1.2.	Durch Metalloproteasen <i>gesheddeter</i> Interleukin-6 Rezeptor induziert <i>trans-signaling</i>	53
4.1.3.	Die melanomassoziierten Meprin β Varianten G45R und G89R <i>shedden</i> den Interleukin-6 Rezeptor unterschiedlich effektiv	54
4.2.	Proteolytische Prozessierung des Interleukin-11 Rezeptors	57
4.2.1.	ADAM10 und ADAM17 sind in der Lage den Interleukin-11 Rezeptor zu <i>shedden</i> 57	
4.2.2.	Der Interleukin-11 Rezeptor wird durch unterschiedliche Metalloproteasen <i>geshededet</i>	58
4.2.3.	Durch Metalloproteasen <i>gesheddeter</i> Interleukin-11 Rezeptor induziert <i>trans-signaling</i>	60
4.2.4.	Arginin 355 ist nicht essenziell für das <i>shedding</i> des Interleukin-11 Rezeptors.....	61
4.3.	Proteolytische Prozessierung des Interleukin-6 Rezeptors und des Interleukin-11 Rezeptors findet auch außerhalb der <i>stalk region</i> statt.....	64
4.4.	ADAM17 wird durch ADAM8 <i>geshededet</i>	67
4.4.1.	Das <i>shedding</i> von ADAM17 durch ADAM8 findet auf dem sekretorischen Weg statt	69
4.4.2.	Lösliches ADAM17 ist keine <i>sheddase</i> des Interleukin-6 Rezeptor	71
5.	Diskussion	74
5.1.	Physiologische Relevanz des IL-6R <i>sheddings</i>	75
5.2.	Der IL-11R wird durch ADAM10 und ADAM17 <i>geshededet</i>	76
5.3.	Beide Interleukin-Rezeptoren bieten eine gute Zugänglichkeit für Proteolyse	

5.4.	Die Substratspezifität von sADAM17	77
5.5.	Ausblick	78
6.	Zusammenfassung	80
7.	Literaturverzeichnis	81
8.	Danksagung	92
9.	Veröffentlichungen	93

Glossarium

ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
APP	<i>Amyloid-Precursor-Protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BACE1	<i>β-site of APP cleaving enzyme 1</i>
BB-94	Batimastat
<i>BCA Assay</i>	<i>Bicinchoninic Acid Assay</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CBM	<i>Cytokine Binding Module</i>
CD23	<i>Cluster of Differentiation 23</i>
cDNA	<i>complementary Deoxyribonucleic Acid, complementary DNA</i>
CLCF-1	<i>Cardiotrophin-like Cytokine Factor 1</i>
CNTF	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
CRISPR/Cas9 System	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated Proteins 9 System</i>
CT-1	<i>Cardiotrophin-1</i>
CTF	C-terminales Fragment
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycin-tert-butylester
DEPC-Wasser	Diethyldicarbonat-behandeltes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli XL 1 blue</i>	<i>Escherichia coli XL1-Blue</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
G45R	Meprin β G45R
G89R	Meprin β G89R
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gp130	Glycoprotein 130
GW	GW280623
HB-EGF	<i>Heparin-Binding-EGF-like Growth Factor</i>

HEK 293T ADAM10/17 ^{-/-} Zellen	<i>Human Embryonic Kidney 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen</i>
HEK 293T Zellen	<i>Human Embryonic Kidney 293T Zellen</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IL-6R	<i>Interleukin-6 Receptor</i>
JAK	<i>Januskinase</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>
KLK	<i>Kallikrein-related Peptidase</i>
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth-Medium</i>
LIF	<i>Leukaemia Inhibitory Factor</i>
MAM	<i>Meprin A5 Protein tyrosine phosphatase μ</i>
Meprin α	<i>Meprin A subunit alpha</i>
Meprin β	<i>Meprin A subunit beta</i>
MMP	<i>Matrix Metalloprotease</i>
MT1-MMP	<i>Membrane-Type-1 Matrix Metalloproteinase</i>
NPN	<i>Neuropoietin</i>
OSM	<i>Oncostatin M</i>
PBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEI	<i>Polyethylenimin</i>
PMA	<i>Phorbol-12-Myristat-13-Acetat</i>
PSGL-1	<i>P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1</i>
PVDF-Membran	<i>Polyvinylidendifluoridmembran</i>
qPCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
RgpB	<i>Arg-gingipain</i>
RHBDL2	<i>Rhomboid-Like 2</i>
<i>rpm</i>	<i>revolutions per minute</i>
sADAM17	<i>soluble A Disintegrin And Metalloproteinase 17</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
sgp130	<i>soluble glycoprotein 130</i>
<i>shedding</i>	<i>ectodomain shedding</i>
sIL-6R	<i>soluble Interleukin-6 Receptor</i>
<i>site</i>	<i>Rezeptorbindungsstelle</i>

STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS-Puffer	<i>TRIS-Buffered Saline-Puffer</i>
TBS-T-Puffer	<i>TRIS-Buffered Saline with Tween20-Puffer</i>
TCA	<i>Trichloroacetic Acid</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAF	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UPL	<i>Universal ProbeLibrary</i>
v/v	<i>volume by volume</i>
w/v	<i>weight by volume</i>
WT	Meprin β Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: IL-6 <i>classic-signaling</i> und IL-6 <i>trans-signaling</i>	9
Abbildung 2: IL-11 <i>classic-signaling</i> und IL-11 <i>trans-signaling</i>	13
Abbildung 3: MT1-MMP <i>mCherry</i>	36
Abbildung 4: Amplifikation des kodierenden Abschnittes von MT1-MMP <i>mCherry</i> ..	38
Abbildung 5: Restriktionsverdau und Ligation in den Zielvektor	41
Abbildung 6: Der IL-6R wird durch unterschiedliche Proteasen <i>geshedd</i> et	52
Abbildung 7: <i>Geshedd</i> eter IL-6R induziert <i>trans-signaling</i>	54
Abbildung 8: <i>Shedding</i> des IL-6R durch melanomassoziierte Varianten von Meprin β	56
Abbildung 9: <i>Shedding</i> des IL-11R durch ADAM10 und ADAM17	58
Abbildung 10: Der IL-11R wird durch unterschiedliche Proteasen <i>geshedd</i> et	59
Abbildung 11: <i>Geshedd</i> eter IL-11R induziert <i>trans-signaling</i>	61
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Variante $\Delta 353$ des IL-11R	62
Abbildung 13: Die Variante $\Delta 353$ des IL-11R wird durch unterschiedliche Proteasen <i>geshedd</i> et	63
Abbildung 14: Proteolytische Prozessierung von Interleukin-Rezeptoren außerhalb der <i>stalk region</i>	66
Abbildung 15: ADAM17 wird durch ADAM8 <i>geshedd</i> et	68
Abbildung 16: Das <i>shedding</i> von ADAM17 findet teilweise auf dem sekretorischen Weg statt	70
Abbildung 17: sADAM17 <i>shedd</i> et den IL-6R nicht	73
Abbildung 18: <i>Shedding</i> des IL-6R und des IL-11R	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte.....	17
Tabelle 2: Labor- und Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 3: Kits.....	21
Tabelle 4: Puffer, Lösungen und Nährmedien	22
Tabelle 5: Chemikalien	25
Tabelle 6: Zelllinien und Bakterienstämme.....	26
Tabelle 7: Marker.....	27
Tabelle 8: Plasmide	29
Tabelle 9: Stimulanzen	30
Tabelle 10: Inhibitoren	31
Tabelle 11: Rekombinante Proteine	32
Tabelle 12: Primer für die Klonierung von MT1-MMP.....	37
Tabelle 13: Reaktionsansatz PCR.....	37
Tabelle 14: Parameter der PCR	38
Tabelle 15: Reaktionsansatz Restriktionsverdau des Inserts	39
Tabelle 16: Reaktionsansatz Restriktionsverdau des Vektors.....	39
Tabelle 17: Kontrollansatz Restriktionsverdau.....	39
Tabelle 18: Reaktionsansatz Ligation.....	40
Tabelle 19: Kontrollansatz Ligation.....	40
Tabelle 20: Reaktionsansatz SDS-Gele	43
Tabelle 21: Primärantikörper für <i>Western Blot</i>	45
Tabelle 22: Sekundärantikörper für <i>Western Blot</i>	46
Tabelle 23: Primärantikörper für die Coimmunpräzipitation	47
Tabelle 24: Sekundärantikörper für die Coimmunpräzipitation	47
Tabelle 25: Reaktionsansatz qPCR.....	49
Tabelle 26: Kontrollansatz qPCR.....	49
Tabelle 27: Parameter der qPCR	49
Tabelle 28: Primer und UPL für qPCR.....	49

1. Einleitung

1.1. Proteolyse

Die enzymatische Hydrolyse von Proteinen durch Proteasen wird als Proteolyse bezeichnet. Dabei wird die unspezifische Proteinspaltung, beispielsweise im Rahmen des Proteinkatabolismus von der selektiven enzymatischen Trennung von Peptidbindungen unterschieden. Letzterer Vorgang wird als oder limitierte Proteolyse bezeichnet und ist essenziell für diverse biologische Prozesse. Beim sogenannten *ectodomain shedding* (*shedding*) wird ein Großteil des extrazellulären Bereichs eines membrangebundenen Proteins, die sogenannte Ektodomäne proteolytisch gelöst. Die Funktion des *gesheddeten* Proteins wird dabei beeinflusst. Je nach zellulärem Kompartiment, in dem das *shedding* stattfindet, wird die Ektodomäne entweder direkt in den Extrazellulärraum oder in das Lumen eines Zellorganells freigesetzt, von wo aus es sekundär in den Extrazellulärraum abgegeben werden kann¹. Die beteiligten Proteasen werden dabei als *sheddasen* bezeichnet. Als irreversible Veränderung des Proteins nimmt die Proteolyse unter den vielen unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen eine Sonderrolle ein. *Sheddases* wirken als Modulatoren in einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse, indem sie unter anderem die Signaltransduktion und die Zelladhäsion regulieren. Ist ihre Funktion beeinträchtigt, führt dies zu Pathologien wie chronischen Entzündungsprozessen oder Morbus Alzheimer¹.

Ein weiterer wichtiger Vorgang ist die Konversion von Vorläuferproteinen in ihre aktive Form durch proteolytische Abspaltung des Signalpeptids und der Prodomäne, genannt *signal peptide cleavage*, bzw. *prodomain cleavage*².

Durch limitierte Proteolyse können sich Proteasen in ihrer proteolytischen Aktivität gegenseitig beeinflussen und bilden zusammenhängende proteolytische Netzwerke (*protease web*). Die Gesamtheit aller Proteasen, die von einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus zur gleichen Zeit exprimiert werden, stellt das Degradom dar, welches sich wiederum durch das Substratrepertoire für jede Protease definiert³.

1.2. Metalloproteasen

Proteasen werden in der MEROPS-Datenbank (Stand: 14.01.2024), anhand der Beschaffenheit ihrer aktiven Zentren, in neun Klassen unterteilt: Aspartat-, Cystein-, Metallo-, Serin-, Glutamat-, Asparagin-, Threonin-, gemischte und unbekannte Proteasen, wobei die vier erstgenannten die mit Abstand bedeutendsten Klassen ausmachen. Im katalytischen Zentrum der Metalloproteasen polarisiert ein zweiwertiges Metallion ein Wassermolekül und führt so zum nukleophilen Angriff auf die Peptidbindung, welche dadurch gespalten wird. Die Begriffe Protease, Proteinase und Peptidase werden synonym verwendet.

Metalloproteasen können nach Art der Proteolyse in Metalloendopeptidasen und Metalloexopeptidasen unterschieden werden, abhängig davon, ob eine innerhalb des Proteins liegende oder endständige Peptidbindung gespalten wird⁴.

Die Metalloproteasen sind in der MEROPS-Datenbank in 73 Familien und diese wiederum in 16 Clans unterteilt (Stand:14.01.2024). Die in dieser Arbeit untersuchten Metalloproteasen sind Zink-Endopeptidasen, aus der Superfamilie der Metzincine. Charakteristisch für diese Proteasen ist der konservierte Sequenzabschnitt HEXXHXXGXXH, wobei H für Histidin, E für Glutamat, G für Glycin und X für eine beliebige Aminosäure steht. In diesem Motiv koordinieren die drei Histidinreste das Zink-Ion, während Glutamat durch die Wasserbindung eine katalytische Funktion übernimmt. Darüber hinaus befindet sich carboxyterminal der Konsensussequenz ein „Methionin-*turn*“, welcher für die korrekte Konformation, als auch die Stabilisierung des aktiven Zentrums von Bedeutung ist. Nach heutigem Kenntnisstand werden 12 Metzincin-Superfamilien unterschieden, darunter die Astacine, Matrixine und Adamalysine^{5,6}.

1.3. A Disintegrin And Metalloproteinases

A Disintegrin And Metalloproteinases (ADAMs) gehören zu den Adamalysinen. Sie werden als inaktive Zymogene exprimiert, bestehend aus einer N-terminalen Signalsequenz, einer Prodomäne, einer katalytischen Metalloproteinasedomäne, einer Disintegrin-Domäne, einer Cystein-reichen Domäne, einer *epidermal growth*

Einleitung

factor (EGF)-like-Domäne, gefolgt von einer Transmembrandomäne und einem zytoplasmatischen Schwanz⁷.

ADAM10 und ADAM17 sind die am besten charakterisierten Mitglieder der Familie. Sie unterscheiden sich in ihrem Aufbau vom Rest der ADAMs durch eine zusätzliche membran-proximale Domäne zur Substraterkennung an Stelle der *EGF-like*- und Cystein-reichen Domäne im extrazellulär liegenden Teil⁸.

Für beide Proteasen konnten eine Vielzahl spezifischer Substrate identifiziert werden, beispielsweise N-Cadherin und Betacellulin als Substrate für ADAM10⁹ oder Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Amphiregulin, *Heparin-binding-EGF-like growth factor* (HB-EGF) als Substrate für ADAM17^{10,11}. ADAM10 und ADAM17 haben jedoch auch ein gemeinsames Substratrepertoire, so können beide z.B. den Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R), Notch und das *Amyloid-Precursor-Protein* (APP) spalten, was auf eine gewebe- und zelltypabhängige Kompensation hindeutet^{9,10}. Die große Bandbreite an Substraten unterstreicht ihre maßgebliche Rolle in Gewebsregeneration, Entzündung bis hin zur Sepsis, neurodegenerativen Prozessen und kardiovaskulären Erkrankungen⁹⁻¹².

ADAM9 wird in vielen unterschiedlichen Zelltypen exprimiert und ist an der Tumorgenese und entzündlichen Prozessen beteiligt. Es beeinflusst die Angiogenese in Lungenkrebsgewebe und fördert so Tumorprogression und Metastasierung¹³. Außerdem unterstützt es die Differenzierung von Monozyten zu multinukleären Riesenzellen und fördert dadurch die Phagozytose von Fremdkörpern oder Bakterien¹⁴. ADAM9 und ADAM15 sind als *sheddasen* von ADAM10 beschrieben.¹⁵

ADAM8 wurde in Brust-, Pankreas- und Gehirntumoren beschrieben. Hohe Expressionslevel sind mit Invasivität assoziiert und stellen einen schlechten Prognosefaktor dar. Durch die Proteolyse von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix und dem *shedding* von Zelloberflächenproteinen werden Angiogenese und Metastasierung induziert.¹⁶

In der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 wurde gezeigt, dass ADAM8 durch die Spaltung des P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL-1) die transendotheliale Migration der Krebszellen bewirkt. Ein *knockdown* von ADAM8 hatte eine deutliche Reduktion der transendothelialen Migration im Vergleich zur Wildtyp-Zelllinie zur Folge¹⁷. Auf Grundlage dieser Erkenntnis wurde eine MDA-MB-231 Zelllinie mit

ADAM8-*knockout* entwickelt und die Freisetzung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche untersucht. Dabei fiel auf, dass die Menge von löslichem ADAM17, *soluble ADAM17* (sADAM17), in der MDA-MB-231 Zelllinie mit ADAM8-*knockout* signifikant reduziert war im Vergleich zur Wildtyp-Zelllinie¹⁸.

1.4. Meprin Metalloproteasen

Meprin Metalloproteasen zählen zu den Astacinen und werden hauptsächlich auf Enterozyten im Dünn¹⁹- und Dickdarm, sowie in den proximalen Tubuli der Niere²⁰ exprimiert. Weitere Expressionsorte sind Epidermis²¹, Lunge²², Gehirn²³ sowie diverse Krebszellen²⁴.

Meprin Metalloproteasen werden als Zymogene exprimiert und haben einen gemeinsamen Aufbau bestehend aus Signalpeptid zur Sekretion, Propeptid zur Blockade der enzymatischen Aktivität, katalytischer Domäne (Kapitel 1.2), *meprin A5 protein tyrosine phosphatase* μ (MAM) Domäne, *tumor necrosis factor receptor-associated factor* (TRAF) Domäne, *EGF-like* Domäne, Transmembrandomäne und zytosolischem Schwanz²⁵.

Meprin A subunit alpha (Meprin α) wird als Dimer in den Extrazellulärraum sezerniert, wo es zu Multimeren assoziiert²⁶. Meprin A subunit beta (Meprin β) wird membrangebunden exprimiert und bildet an der Zelloberfläche Homodimere. Alternativ dimerisiert Meprin β zum Heterodimer mit Meprin α . Dieser membrangebundene Enzymkomplex vereint die katalytischen Eigenschaften beider Proteasen²⁷.

Nach der Expression werden sie durch *prodomain cleavage* aktiviert. Unterschiedliche Serinproteasen wie Trypsin²⁸ und *kallikrein-related peptidase* (KLK) 5²⁹ sind beschriebene Aktivatoren von Meprin α und Meprin β . Plasmin³⁰ ist auf die Aktivierung von Meprin α beschränkt. KLK4²⁹, KLK8²⁹ und Matriptase-2³¹ aktivieren nur Meprin β .

Trypsin wurde als physiologischer Aktivator der Meprin Metalloproteasen im Darm beschrieben. Jedoch wird diskutiert ob es in der Lage ist die Mukusschicht zu durchdringen um das auf Enterozyten exprimierte Meprin aktivieren zu können³².

Die von *Porphyromonas gingivalis* exprimierte Protease *Arg-gingipain* (RgpB) wird

Einleitung

als weitere aktivierende Protease angesehen, da sie ebenfalls im Gastrointestinaltrakt vorkommt und in der Lage ist Meprin β an der Zelloberfläche zu aktivieren^{32,33}.

Als inaktive Enzymvorstufe kann Meprin β durch ADAM10^{34,35}, ADAM17³⁶ und MT1-MMP³⁷ von der Zelloberfläche gelöst werden. Dieser Vorgang ist vor allem im Dünndarm wichtig, damit das lösliche Meprin β Mucin-2 erreichen kann. Die Spaltung von Mucin-2 ist für eine Erneuerung der Schleimschicht notwendig, wodurch eine ausreichende Barrierefunktion gegenüber Pathogenen sichergestellt wird³³. Gleichzeitig verstärkt Meprin β die Aktivität von ADAM9, ADAM10 und ADAM17 durch *prodomain cleavage*, zusätzlich zu der kanonischen Aktivierung der genannten ADAM-Proteasen durch Furin³⁸. Dies unterstreicht die enge funktionelle Verbindung dieser Metalloproteasen.

Meprin α sowie Meprin β teilen eine Spaltspezifität im Sinne einer Präferenz für Aspartat- und Glutamat- Reste in P1' Position (Nomenklatur nach Schechter und Berger³⁹) ihrer Substrate⁴⁰. Physiologische Substrate von Meprin α und β sind unter anderem Prokollagen I⁴¹ und III⁴², wodurch beide Proteasen an der Maturierung von Kollagenfibrillen beteiligt sind. Folglich geht eine zu niedrige Aktivität der Proteasen mit einer eingeschränkten Funktion des Bindegewebes einher und eine zu hohe Aktivität ist mit Fibrose assoziiert⁴³. In der Epidermis wird Meprin β im Stratum granulosum direkt unter dem Stratum corneum exprimiert, wodurch eine Rolle in der Kornifikation der Haut angenommen werden kann²¹.

Eine Fehlregulation der proteolytischen Aktivität ist an unterschiedlichen Krankheitsprozessen beteiligt. Dazu zählen entzündliche Prozesse wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen^{27,44,45}, Sepsis¹², Alzheimererkrankung⁴⁵, aber auch pulmonale Hypertonie²² und Fibrose⁴⁵.

Durch *shedding* des Adhäsionsproteins CD99 spielt Meprin β eine Rolle bei der transendothelialen Migration von Leukozyten⁴⁶ und Krebszellen⁴⁷.

Meprin α und Meprin β *shedden* den IL-6R und induzieren IL-6 *trans-signaling*, was entscheidend zur Pathogenese von Arthritis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Sepsis und Neurodegeneration beiträgt^{12,48}.

Meprin β wurde als potentielle β -Sekretase von APP identifiziert. Durch die Bildung des A β -Peptids ist Meprin β demnach möglicherweise an der Pathogenese von Morbus Alzheimer beteiligt²³.

Meprin β wurde mit unterschiedlichen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht²⁴. In der *BioMuta* Datenbank werden unterschiedliche Mutationen im Mep1b Gen, das für Meprin β kodiert, aus unterschiedlichen Studien aufgeführt. Die meisten dieser Varianten wurden in Melanom, Uteruskarzinom und in Lungenkarzinom beschrieben^{24,49}. Anhand der Meprin β Kristallstruktur wurde für die beiden melanomassoziierten Varianten G45R und G89R eine unterschiedlich starke Aktivierung der beiden Proteasen vermutet⁴⁹. In dieser Arbeit wurde am Beispiel vom IL-6R untersucht, wie sich die unterschiedliche Aktivierung auf die proteolytische Aktivität der beiden Varianten auswirkt.

1.5. Membrane-type-I matrix metalloproteinase

Membrane-type-I matrix metalloproteinase (MT1-MMP) oder Matrix Metalloprotease (MMP) 14 gehört zur Familie der Matrixine und ist eine von sechs membrangebundenen MMPs im menschlichen Organismus⁵⁰. Durch die Proteolyse von Kollagen Typ I-III und Fibronectin^{50,51}, sowie die Aktivierung von MMP2 und der daraus resultierenden Degradation von Kollagen Typ IV⁵² kommt dieser Protease eine Schlüsselrolle im Umbau der Extrazellulärmatrix zu, was auch entscheidend die Invasion und Metastasierung von Krebszellen reguliert⁵³.

MT1-MMP kann durch Meprin β proteolytisch von der Zelloberfläche gelöst werden und kann wiederum selbst Meprin β shedden, was auf eine komplexe Interaktion dieser beiden Proteasen hindeutet³⁷. Mäuse mit einem *knockout* für MT1-MMP weisen kraniofaziale Deformitäten, Zwergwuchs, Arthritiden sowie Fibrosen des Weichgewebes auf, was auf die gestörte Kollagenhomöostase zurückzuführen ist⁵⁴. In Mäusen mit einem *knockout* für Meprin β konnten verminderte Ablagerung von Kollagen sowie eingeschränkte Zugfestigkeit der Haut nachgewiesen werden. Dies legt eine komplexe Interaktion der beiden Proteasen bei der Kollagenmaturierung nahe⁴¹.

Ein weiteres gemeinsames Substrat ist APP, wodurch eine Beteiligung beider Proteasen an der Pathogenese von Morbus Alzheimer möglich ist^{55,56}.

1.6. Interleukine

1.6.1. Interleukin-6 Familie

Interleukin (IL)-6 bildet zusammen mit IL-11, IL-27 *oncostatin M* (OSM), *leukaemia inhibitory factor* (LIF), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *cardiotrophin-1* (CT-1), *cardiotrophin-like cytokine factor 1* (CLCF-1), Neuropoietin (NPN), IL-31, IL-35 und IL-39 die Interleukin-6 Zytokinfamilie^{57–59}. Alle diese Zytokine nutzen Glycoprotein 130 (gp130) zur Signaltransduktion. Daher bezeichnet man sie auch als gp130 Rezeptorliganden oder gp130 Zytokine. Sie erfüllen Schlüsselfunktionen in unterschiedlichen Pathologien von Leber und Gastrointestinaltrakt^{60,61}. Aktuell wird ihre Rolle als therapeutischer Angriffspunkt bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen⁶⁰, Diabetes mellitus Typ 2⁶¹ und der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung⁶¹ untersucht.

1.6.2. Interleukin-6

IL-6 ist ein inflammatorisches Zytokin, das in den meisten, wenn nicht sogar in allen, inflammatorischen Prozessen involviert ist⁶².

Entzündungsvorgänge sind streng regulierte Vorgänge, die Infektionen und Gewebsschäden bekämpfen sollen. Eine fehlerhafte Regulation dieser Vorgänge trägt zur Pathogenese chronisch entzündlicher Erkrankungen bei. Auch wenn die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht komplett verstanden sind, so ist doch unumstritten, dass die Kommunikation zwischen Leukozyten und den Zellen des infizierten oder beschädigten Gewebes eine essenzielle Rolle für den Heilungsprozess spielt⁶³. Die Mediatoren, die an der Immunreaktion beteiligt sind, bestimmen im Endeffekt auch den Heilungsprozess. Als Mediator der angeborenen und erworbenen Immunabwehr spielt IL-6 in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle⁶³.

Nach seiner Entdeckung wurden IL-6 zunächst Schlüsselfunktionen bei der Aktivierung von T-Zellen⁶⁴, der Differenzierung von B-Zellen^{65,66} und der Regulation der Akut-Phase-Reaktion⁶⁷ zugeschrieben. Inzwischen werden die vielfältigen Funktionen des pleiotropen Zytokins als hormonähnlich beschrieben. Es beeinflusst Immunreaktionen, Gefäßerkrankungen, den Fettstoffwechsel, die Insulinresistenz,

Einleitung

die Mitochondrienfunktion, das neuroendokrine System sowie das neuropsychologische Verhalten^{64,68}.

IL-6 wird von nahezu allen Bindegewebszellen und Zellen des Immunsystems produziert. Die Produktion wird hauptsächlich durch TNF- α und IL-1 β induziert⁶⁸. Unter physiologischen Umständen beträgt die Serumkonzentration von IL-6 etwa 1-5 pg/ml, kann aber im Kontext von Entzündungsreaktionen und Krebserkrankungen schnell und drastisch bis in den Bereich von μ g/ml ansteigen^{57,69}. Die Serumkonzentration von IL-6 kann dabei als sensibler prognostischer und diagnostischer Marker dienen⁷⁰⁻⁷².

Der IL-6R wird nur auf wenigen Zellen, wie Hepatozyten sowie bestimmten Arten von Leukozyten und Epithelzellen exprimiert⁶⁹. Auf seinen Zielzellen bindet IL-6 an den IL-6R und wird von diesem der sekundären Rezeptoruntereinheit, gp130, präsentiert. Infolgedessen kommt es zur Dimerisierung von gp130 und zur Induktion von intrazellulären Signalkaskaden. Diese werden hauptsächlich durch die Assoziation von gp130 mit dem intrazellulären Teil einer Januskinase (JAK) vermittelt, wodurch Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)1 und 3 aktiviert werden⁶⁸. IL-6 weist nur eine messbare Affinität zum IL-6R auf, nicht jedoch zu gp130. Gleichzeitig kann der IL-6R mit gp130 nur in der Gegenwart von IL-6 interagieren. Daraus folgt, dass nur Zellen die den IL-6R exprimieren von IL-6 aktiviert werden können⁶⁹.

Der IL-6R kann jedoch durch ADAM17 proteolytisch von der Zelloberfläche gelöst werden⁷³. Der dann lösliche Rezeptor, *soluble Interleukin-6 receptor* (sIL-6R), bindet seinen Liganden IL-6 mit der gleichen Affinität wie im membrangebundenen Zustand. Der Komplex aus IL-6 und sIL-6R kann dann über gp130 Zellen aktivieren, die selbst keinen IL-6R exprimieren. Im Gegensatz zum *classic-signaling* (Abbildung 1 **A**) über den membrangebundenen Rezeptor wird dieser Vorgang über den gelösten Rezeptor als *trans-signaling* (Abbildung 1 **B**) bezeichnet. Durch die ubiquitäre Expression von gp130 und das *trans-signaling* wird das Spektrum von Zellen, die durch IL-6 aktiviert werden können drastisch erweitert⁶².

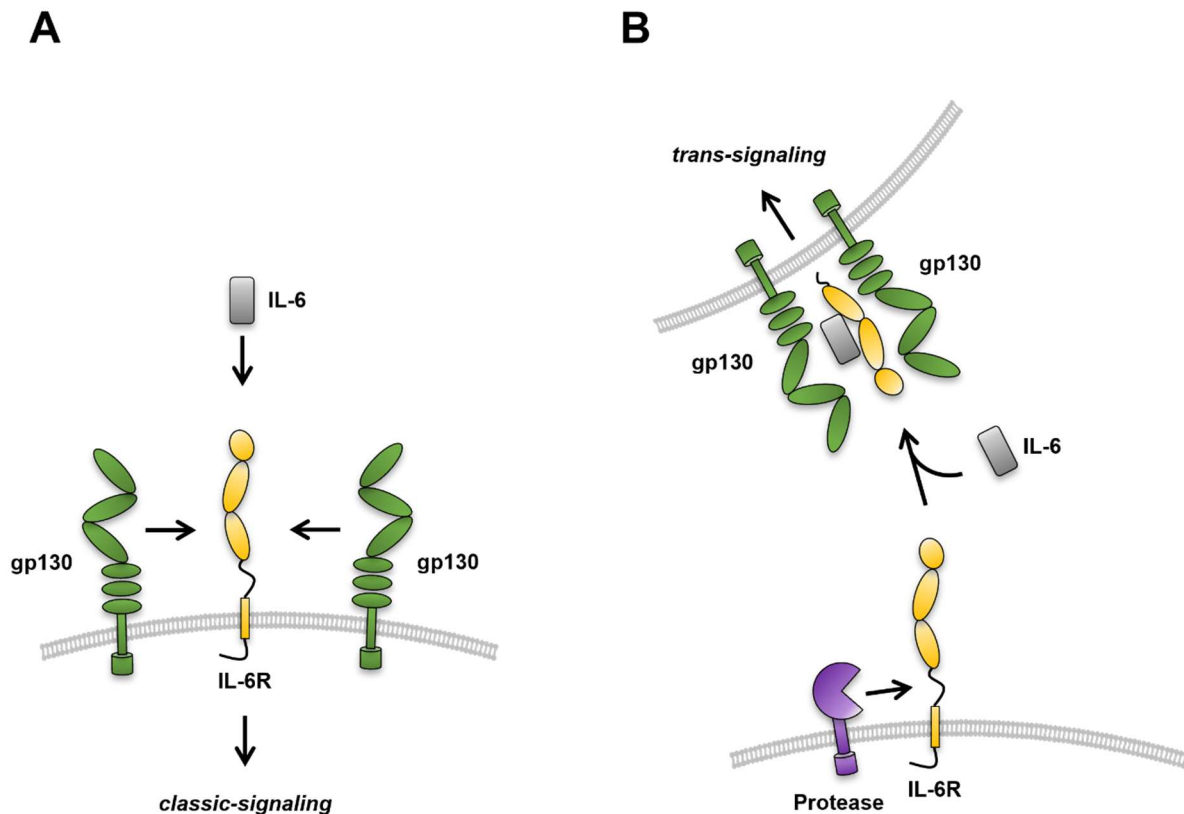


Abbildung 1: IL-6 *classic-signaling* und IL-6 *trans-signaling*

A: Schematische Darstellung des *classic-signaling*. **B:** Schematische Darstellung der Spaltung des IL-6R durch Metalloproteasen und Induktion des *trans-signaling*.

In einem Tiermodell mit deutlich reduzierter ADAM17-Aktivität in allen Geweben konnte jedoch keine signifikante Veränderung der sIL-6R Konzentration im Blut nachgewiesen werden. Das *shedding* anderer Substrate von ADAM17 wie Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR) war dagegen deutlich reduziert⁷⁴. Dies spricht dafür, dass auch andere Proteasen den IL-6R *shedden* können. Neben ADAM17⁷³ wurden auch ADAM10⁷⁵, Meprin α ⁴⁸ und Meprin β ⁴⁸ als *sheddasen* des IL-6R beschrieben.

In einem als *cluster-signaling* bezeichneten Prozess aktiviert ein Komplex aus IL-6 und membrangebundenem IL-6R auf einer Senderzelle gp130 auf einer Empfängerzelle⁷⁶. Dieser Signalkomplex ist für als *priming* bezeichnete Primärprägung von T-Helfer 17 Zellen wichtig, wobei die Aktivierung und Differenzierung von naiven T-Zellen reguliert wird⁷⁷.

Einleitung

IL-6 erfüllt wichtige homöostatische und immunologische Funktionen über das *classic-signaling*, darunter die Induktion der Akut-Phase-Reaktion, die Regeneration von Hepatozyten und Darmepithel, den Glukosemetabolismus, die Hämatopoese, die Regulation des neuroendokrinen Systems sowie von Hyperthermie, Müdigkeit und Hungergefühl^{59,68,78}.

Im Gegensatz dazu stehen die über das *trans-signaling* vermittelten Funktionen von IL-6 in einem pathologischen Kontext. In unterschiedlichen Krankheitsmodellen zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Fibrose, Arthritis, Allergie, Infektion, Neuroinflammation, koronarer Herzerkrankung und entzündungsassoziierten Krebserkrankungen wurde die Rolle des *trans-signaling* untersucht^{59,68}. Monozyten und aktivierte T-Zellen produzieren sIL-6R. Untersuchungen in neutrophilen Granulozyten konnten zudem zeigen, dass unterschiedliche Entzündungsmediatoren wie C-reaktives Protein, inflammatorische Chemokine, Bradykinin sowie Regulatoren des Komplementsystems, Plättchenaktivierender Faktor und Leukotriene das *shedding* von IL-6R aktivieren. Durch das *trans-signaling* wird die Rekrutierung und die Apoptose von Leukozyten, die Effektorfunktionen von T-Zellen sowie die Entzündungsreaktion von Binde- und Stützgewebe vermittelt. Folglich kann der sIL-6R auch als Signalmolekül verstanden werden, welches das *trans-signaling* als lokale Immunreaktion induziert, die die angeborene und erworbene Immunantwort beeinflusst.⁶⁸ In murinen Sepsismodellen verhinderte die selektive Blockade des *trans-signaling* den Tod der Versuchstiere⁵⁹. In einem Zökum-Punktionsmodell, das zur Peritonitis und Sepsis der Versuchstiere führt, war eine selektive Blockade des *trans-signaling* mit einer signifikant erhöhten Überlebensrate verbunden verglichen mit der vollständigen Blockade von IL-6. Dies wird auf den regenerativen Effekt des *classic-signaling* zurückgeführt⁷⁹.

Um die Auswirkungen des *trans-signaling* *in vitro* und *in vivo* besser untersuchen zu können wurde das Fusionsprotein *Hyper-IL-6* entwickelt. Dieses Protein besteht aus einem Molekül IL-6, das über eine flexible Peptidkette kovalent an sIL-6R gebunden ist⁸⁰.

Im Blut gesunder Menschen beträgt die Konzentration von IL-6 etwa 1-5 pg/ml. Diese kann im Rahmen von Entzündungsprozessen um das 1000-fache und während einer Sepsis um zwei Größenordnungen ansteigen. Die Konzentration von sIL-6R beträgt etwa 40-75 ng/ml und kann um das 2- bis 10-fache ansteigen. Die Konzentration von

Einleitung

löslichem Glycoprotein 130, *soluble glycoprotein 130* (sgp130), beträgt etwa 250-400 ng/ml und bleibt im Rahmen von Entzündungsprozessen unverändert.⁶⁹

IL-6 bindet am membrangebundenen IL-6R mit einer Affinität von etwa 1 nM. Dieser Komplex bindet zwei gp130 Moleküle mit einer Affinität von 50 pM. Durch sterische Hinderung kann sgp130 nicht an einen Komplex aus IL-6 und membrangebundenem IL-6R binden, der mit membrangebundenem gp130 assoziiert ist. Der Komplex aus IL-6 und sIL-6R kann jedoch sowohl membrangebundenes als auch lösliches gp130 binden. Folglich führt ein Überschuss von sgp130 zu einer selektiven und kompetitiven Inhibition des *trans-signalings*⁸¹. Sgp130 entsteht durch alternatives Spleißen⁸² oder durch *shedding* von membrangebundenem gp130 durch die Aspartatprotease *β -site of APP cleaving enzyme 1* (BACE1)⁸³.

Löslicher IL-6R und sgp130 können als Puffer verstanden werden, der vor einer Überstimulation durch IL-6 schützt. Die Kapazität dieses Puffers wird durch die Konzentration von sIL-6R bestimmt, da die Konzentration von sgp130 die von sIL-6R im molaren Bereich übersteigt⁶⁹. Eine Mutation des IL-6R⁸⁴, die mit verstärktem *shedding* einhergeht⁸⁵, führt zu einer höheren Konzentration von sIL-6R im Blut und gleichzeitig sind die Betroffenen weniger anfällig für entzündungsassoziierte Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, abdominales Aortenaneurysma und rheumatoide Arthritis^{69,86}.

Eine Störung dieses Puffersystems wurde mit Diabetes mellitus Typ 2 in Verbindung gebracht⁸⁷ und könnte zur Pathophysiologie dieser und anderer entzündungsassoziiierter Erkrankungen beitragen⁶⁹.

Basierend auf dem Prinzip der selektiven Blockierung des *trans-signalings* durch sgp130 wurde der Wirkstoff sgp130Fc entwickelt. Der Wirkstoff besteht aus zwei Molekülen der extrazellulären Domäne von gp130 die an ihrem C-Terminus über die schwere Kette des Fc-Teils von Immunglobulin G1 miteinander verbunden sind⁸¹. Die selektive Blockade des *trans-signalings* durch sgp130Fc hemmt die anti-apoptotische Wirkung von sIL-6R auf mononukleäre Zellen der Lamina propria von Morbus Crohn Erkrankten^{81,88}.

Dieses Fusionsprotein befindet sich aktuell unter dem Wirkstoffnamen *Olamkicept* zur Behandlung von Colitis Ulcerosa, einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, in Phase II der klinischen Studie^{60,89}. Der Wirkmechanismus basiert

Einleitung

zum einen auf der selektiven Blockade des *IL-6-trans-signalings*. Zum anderen wird durch die Gabe von spg130Fc die IL-6-Pufferkapazität erhöht, die in Autoimmunerkrankungen beeinträchtigt sein könnte⁶⁹.

IL-6 ist bereits als Angriffspunkt für Immunmodulatoren etabliert⁶⁸. Das Medikament Tocilizumab, das den IL-6R blockiert und damit sowohl das *classic-signaling* als auch das *trans-signaling* inhibiert⁹⁰, ist für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis⁹¹, Morbus Castleman⁹¹, Zytokin-Freisetzungssyndrom⁹¹ und *coronavirus disease 2019* (COVID-19) mit Hypoxie und systemischer Entzündungsreaktion⁹² zugelassen. Durch die vollständige Inhibition des IL-6R werden jedoch auch die protektiven Effekte durch das *classic-signaling* inhibiert. Dies wird besonders deutlich, wenn das *classic-signaling* für die Kontrolle von Barrierefunktionen wie beispielsweise der Aufrechterhaltung der Darmmukosa oder der Regeneration von Epithelien verantwortlich ist^{68,79}. Das entscheidende Problem bei allen klinischen Studien zur vollständigen Inhibition von IL-6 oder dem IL-6R ist das erhöhte Risiko von bakteriellen Infektionen⁹¹. Diese immunsuppressiven Effekte sind durch die selektive Inhibition des *trans-signalings* durch spg130Fc bisher nicht festzustellen⁶⁰.

1.6.3. Interleukin-11

IL-11 benötigt genauso wie IL-6 neben dem jeweiligen Rezeptor ein Homodimer aus zwei gp130 Molekülen zur Signaltransduktion⁹³ (Abbildung 2 **A**).

Analog zur Signaltransduktion durch den IL-6R kann der IL-11R durch ADAM10, die Serinproteasen Neutrophile-Elastase und Proteinase 3⁹⁴ und der Rhomboid-Protease Rhomboid-Like 2 (RHBDL2)⁹⁵ von der Zelloberfläche gelöst werden, seinen Liganden IL-11 binden und Zellen über gp130 aktivieren (Abbildung 2 **B**). Obwohl sIL-11R im Blut gesunder Versuchspersonen nachgewiesen wurde⁹⁴, konnte bisher noch keine biologische Funktion für das IL-11 *trans-signaling* beschrieben werden. Analog zum *IL-6 cluster signaling*, wurde gezeigt, dass auch IL-11 *trans* präsentiert werden kann. Allerdings wurde für diese IL-11 *trans-presentation* bisher ebenfalls keine biologische Funktion beschrieben⁹⁶.

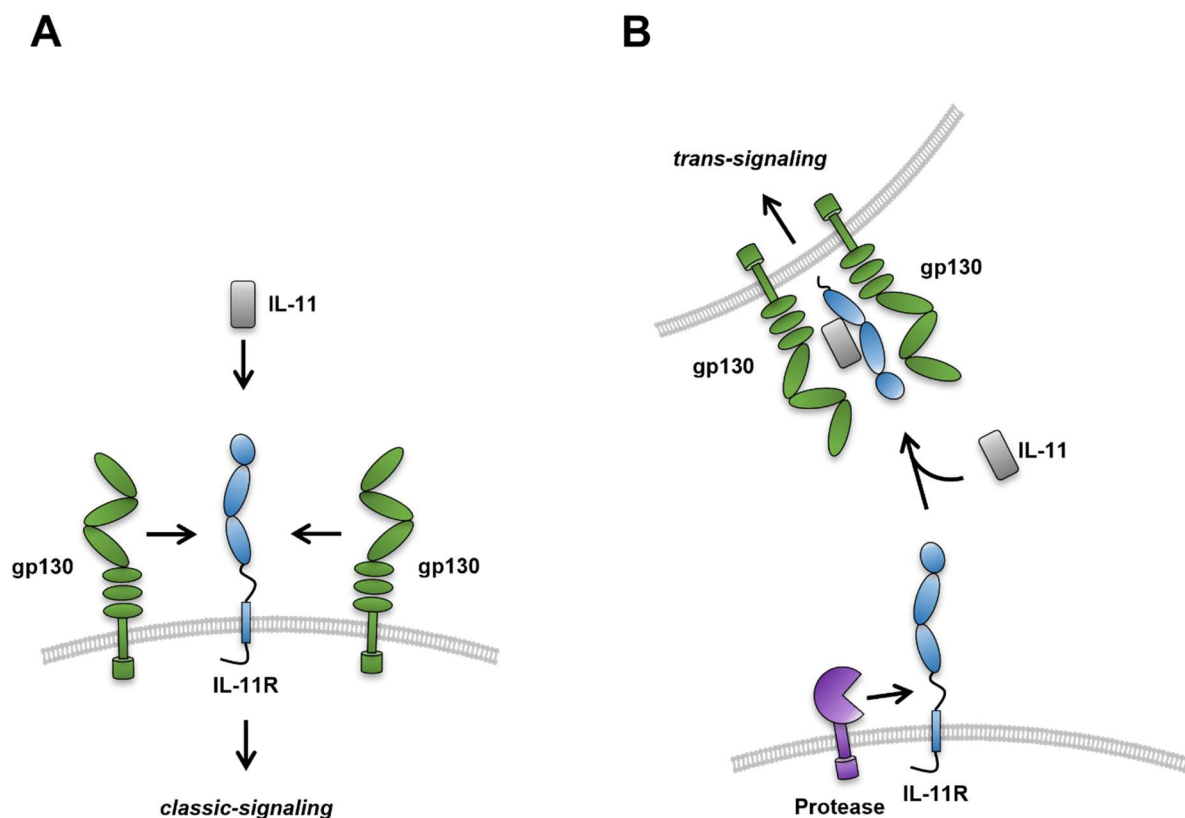


Abbildung 2: IL-11 classic-signaling und IL-11 trans-signaling

A: Schematische Darstellung des *classic-signalings*. **B:** Schematische Darstellung des *sheddings* des IL-11R durch Metalloproteasen und Induktion des *trans-signalings*.

Für IL-11 wurden bei seiner Erstbeschreibung im Jahr 1990 zunächst Funktionen in der Lymphopoese und Hämatopoese beschrieben⁹⁷. Aufgrund dessen wurde es später unter dem Namen Oprelvekin (Handelsname: NEUMEGA®) als Medikament zur Behandlung Chemotherapie-induzierter Thrombozytopenie zugelassen⁹⁸.

Spätere Studien zeigten, dass IL-11 neben dieser Funktion diverse physiologische und pathophysiologische Prozesse wie Immunreaktionen⁹⁹, Osteogenese^{100–102}, Fertilität¹⁰³, Krebsentstehung⁹⁹ und Fibrose⁹⁹ beeinflusst.

So werden IL-11 immunmodulatorische Funktionen durch die Reduktion von TNF- α und IL-1 β zugeschrieben. Dazu ist es an der Differenzierung von B- und T-Zellen sowie der Produktion von Antikörpern beteiligt⁹⁹.

Mutationen im kodierenden Gen für den IL-11R haben Fehlbildungen des Schädels, des Zahnapparates und Kraniosynostosen zur Folge^{100–102}.

Zudem wurde gezeigt, dass IL-11R-defiziente Mäuse aufgrund einer gestörten Einnistung der Blastozyste unfruchtbar sind¹⁰³.

IL-11 fördert den Progress unterschiedlicher solider Tumore wie Brust-, Magen-, Kolon- und Endometriumkarzinomen. Es spielt zudem eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Lungenfibrose⁹⁹.

IL-11 wird hauptsächlich von Fibroblasten des Gastrointestinaltrakts, des Herzens, der Leber und der Lunge produziert. Auch Epithelzellen und unterschiedliche Zellen des Immunsystems produzieren IL-11. Es wurde außerdem in Brust-, Hoden- und Endometriumgewebe sowie im zentralen Nervensystem nachgewiesen⁹⁹.

Der IL-11R wird zellspezifisch auf T-Zellen, Makrophagen, Megakaryozyten, Osteoblasten und Epithelzellen ausgebildet, wobei das Ausmaß der Expression organspezifisch und (patho-)physiologisch variiert⁹⁹.

Der IL-6R sowie der IL-11R sind Typ-I-Transmembranproteine und strukturell gleich aufgebaut. Sie bestehen jeweils aus einer extrazellulär liegenden *immunoglobulin-like domain* (D1-Domäne), gefolgt von zwei *fibronectin type III domains* (D2- und D3-Domäne), einer den extrazellulär liegenden Teil des Rezeptors mit der Transmembranregion verbindenden *stalk region*, gefolgt von einer intrazellulären Domäne. Die D2- und D3-Domänen bilden das *cytokine binding module* (CBM) das essenziell für die Signaltransduktion ist¹⁰⁴. Die Zytokine IL-6 und IL-11 weisen jeweils

Einleitung

drei Rezeptorbindestellen (*sites*) auf. Über *site I* bindet das Zytokin an das CBM in der D2-/ D3- Domäne. Über *site II* und *site III* bindet der Rezeptor an gp130. Der Signalkomplex bildet dann ein Hexamer aus, das eine Stöchiometrie von 2:2:2 aufweist^{104,105}.

2. Fragestellung der Arbeit

Das *shedding* des IL-6R spielt eine entscheidende Rolle für physiologische und pathophysiologische Prozesse^{57,62,69}. ADAM17 wurde als *major sheddase* des IL-6R beschrieben^{62,69}. Schumacher et al. zeigten jedoch, dass die Reduktion der Aktivität von ADAM17 auf ein Minimum nicht ausreicht, um die Konzentration von sIL-6R im Blut zu reduzieren⁷⁴.

Für das IL-11 *trans-signaling* wurde bis dato keine spezifische Funktion beschrieben. Die Existenz von sIL-11R im Blut gesunder Menschen spricht jedoch dafür, dass das *shedding* von IL-11R ein natürlich vorkommendes Ereignis von physiologischer Relevanz ist.

Das *shedding* beider Interleukin-Rezeptoren findet in der *stalk region* statt^{104,105}. Diese verbindet die D3-Domäne mit der Transmembrandomäne. Die beträchtliche Länge der *stalk region* von 52 Aminosäuren beim IL-6R und 54 Aminosäuren beim IL-11R¹⁰⁴ und ihre Zusammensetzung implizieren eine gute Zugänglichkeit für unterschiedliche Proteasen.

Zusammenfassend sprechen diese Punkte dafür, dass unterschiedliche Proteasen am *shedding* beider Interleukin-Rezeptoren beteiligt sind. In dieser Arbeit soll untersucht werden, welche weiteren Proteasen neben den bisher identifizierten in der Lage sind, den IL-6R und den IL-11R zu *shedden*.

In diesem Zusammenhang kommt ADAM17 eine besondere Rolle zu. Diese Metalloprotease ist durch ihr großes Substratspektrum an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt⁹⁻¹¹. Es konnte zudem gezeigt werden, dass ADAM17 selbst proteolytisch von der Zelloberfläche gelöst werden kann und dann als aktives lösliches Protein vorliegt¹⁸. In dieser Arbeit soll das *shedding* von ADAM17 durch ADAM8 untersucht werden und ob lösliches ADAM17 im Vergleich zu membrangebundenem ADAM17 noch in der Lage ist den IL-6R zu *shedden*.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Laborgeräte

Alle für diese Arbeit verwendeten Laborgeräte werden in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Laborgeräte

Bezeichnung	Charakteristik	Hersteller, Firmensitz
<i>Accu-Jet Pro</i>	Pipettierhelfer	Brand, Wertheim, Deutschland
B6060	Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
<i>Bead Bath</i>	Wärmebad mit Metallkugeln	Lab Armor, Dallas, Oklahoma, USA
<i>Biometra T3</i>	Thermozykler	Biometra, Analytik Jena, Jena, Deutschland
Bunsenbrenner	Bunsenbrenner	Karl Friedrich Usbeck KG, Radevormwald, Deutschland
<i>Centrifuge 5427 R - Mikrozentrifuge</i>	Hochgeschwindigkeites Mikrozentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Criterion™ Blotter</i>	Tank-Blot Kammer für 4 Membranen	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
Deckglaspinzette	Deckglaspinzette	Karl Friedrich Usbeck KG, Radevormwald, Deutschland
<i>Eppendorf research plus</i>	100-1000 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Eppendorf research plus</i>	20-200 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Eppendorf research plus</i>	10-100 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Eppendorf research plus</i>	2-20 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Eppendorf research plus</i>	0,5-10 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Eppendorf research plus</i>	0,1-2,5 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Flockeneisbereiter UFP 0399 A	Flockeneisbereiter	Manitowoc, Manitowoc, Wisconsin, USA

Material und Methoden

GP 1496 Premium	Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
<i>Hera cell 150</i>	Zellkulturinkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
<i>Hera freeze</i>	Gefrierschrank -80 °C	Heraeus, Hanau, Deutschland
<i>Herasafe™ KS</i>	Sicherheitswerkbank Klasse II	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
HST 4-5-6	Autoklav	Zirbus, Bad Grund, Deutschland
<i>Light Cycler 480 II</i>	Thermozykler für quantitative Echzeit-PCR	Roche, Basel, Schweiz
<i>Light Cycler® 480 System</i>	PCR-Plattform zur Genexpressionsanalyse	Roche, Basel, Schweiz
<i>Luminescent Image Analyzer LAS-3000 mini</i>	Chemilumineszenzdetektionsgerät	Fujifilm, Tokyo, Japan
Magnetstäbchen-Set ROTILABO® #1	Magnetstäbchen-Set	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Milli-Q Plus</i>	Wasseraufbereitungssystem	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
<i>Mini-PROTEAN® 2-D Cell</i>	SDS-PAGE Kammer, für 2 Gele	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
<i>Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Module</i>	Modul zum Gießen von SDS-Gelen	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
<i>Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell for Mini Precast Gels, 4- gel</i>	SDS-PAGE Kammer, für 4 Gele	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
<i>Multifuge 3 S-R</i>	Zentrifuge für Schraubröhren und Mikrotiterplatten	Heraeus, Hanau, Deutschland
<i>Multitron</i>	Inkubationsschüttler	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
<i>Neubauer Bright-Line</i>	Neubauer Zählkammer	LO Labor Optik Ltd., Lancing, UK
<i>Olympus CKX41</i>	Inverses Lichtmikroskop	Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan
<i>Optima™ Max-XP Ultracentrifuge</i>	Tisch-Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Brea, Kalifornien, USA
<i>Owl™, Easy cast™</i>	Horizontal- Gelelektrophoresesystem	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

<i>PowerPac™ Basic Power Supply</i>	Spannungsquelle 4-400 mAh, 10-300 V	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
<i>PowerPac™ HC High-Current Power Supply</i>	Spannungsquelle 10-3000 mAh 5-250 V	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
<i>Reprostar</i>	UV Lichttisch	CAMAG, Chemie- Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG, Muttensz, Schweiz
<i>Roller mixer SRT9</i>	Rollenmischer	Stuart, Cole-Parmer, Stone, Staffordshire, UK
<i>ROTILABO®</i>	Mini-Zentrifuge	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>ROTILABO® Mini Vortex</i>	Reagenzglasschüttler	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Spark®</i>	Multimode-Mikroplatten-Reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
<i>T 1410 Comfort</i>	Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
<i>Thermomixer compact</i>	Heizblock	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischabzug	Tischabzug	Köttermann, Uetze, Langlingen, Deutschland
<i>Vacusaft</i>	Absaugpumpe	Integra Bioscience, Zizers, Schweiz
<i>Varioklav®</i>	Dampfsterilisator	H + P Labortechnik AG, HP Labortechnik GmbH, München, Deutschland

3.1.2. Labor- und Verbrauchsmaterialien

Alle für diese Arbeit verwendeten Labor- und Verbrauchsmaterialien werden in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Labor- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Charakteristik	Hersteller, Firmensitz
1.5 mL, <i>Polypropylene Tube with Snap-on Cap</i> , 11 x 39mm	Mikroreaktionsgefäß für Ultrazentrifugation 1,5 ml	Beckman Coulter, Brea, California, USA

Material und Methoden

Alu-Folie	Alufolie	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Amicon® Ultra-15</i> Zentrifugeneinheit	15 ml Zentrifugeneinheit	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
BP002 58 60	Whatman-Filterpapier, 0,35 mm Dicke	Hahnemühle FineArt GmbH, Dassel, Deutschland
<i>Cell Scraper with 2- Position Blade</i>	Zellschaber mit 2-Positionen- Klinge	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Impfeschlinge	Impföse	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>Light Cycler® 480 multiwell plate 384</i>	Mikrotiterplatte, 384 Well	Roche, Basel, Schweiz
Mikrotestplatte 96 Well, Flachboden	Mikrotiterplatte, 96 Well	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>Multiply®-Pro</i> Gefäß 0,2 ml, PP	Mikroreaktionsgefäß 0,1 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischale 92x16 mm mit Nocken	Zellkulturschale für Suspensionszellen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>Pipette tip</i> 10 µl	Pipettenspitze 10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>Pipette tip</i> 1000 µl	Pipettenspitze 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>Pipette tip</i> 200 µl	Pipettenspitze 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>Protran™</i> 0,2 µm NC	Nitrocellulose Membran, 0,2 µm	Amersham, Cytiva, Amersham, Buckinghamshire, UK
<i>PVDF Transfer Membrane</i>	Polyvinylidendifluoridmembran, 0,45 µm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Reagiergefäß 0,5 ml	Mikroreaktionsgefäß 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml	Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß 2,0 ml	Mikroreaktionsgefäß 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Röhre 15ml, 120x17 mm, PP	Schraubröhre 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röhre 50ml, 114x28 mm, PP	Schraubröhre 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 10 ml	Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 25 ml	Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 5 ml	Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterilindikatorband ROTILABO® Dampfsterilisation	Sterilindikatorband	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TC-Flasche T175, Standard, Filterkappe	Zellkulturflasche für adhärente Zellen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 6 Well, Standard, Flachboden	Zellkulturschale für adhärente Zellen, 6 Well	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Schale 100, Standard	Zellkulturschale für adhärente Zellen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>Viawant® Nitrile Pro White</i>	Einmalhandschuhe Nitril	Adebo Medical, Berlin, Deutschland

3.1.3. Kits

Alle für diese Arbeit verwendeten Kits werden in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Kits

Bezeichnung	Charakteristik	Hersteller, Firmensitz
<i>GeneJET Gel Extraction Kit</i>	Gel-Extraktionskit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>GeneJET Plasmid Miniprep Kit</i>	Kit zur Plasmidpräparation	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>NucleoBond Xtra Midi Kit for transfection-grade plasmid DNA</i>	Kit zur Plasmidpräparation	Macherey Nagel, Düren, Nordrhein-Westfalen, Deutschland

<i>NucleoSpin® Isolation Kit</i>	Kit zur Extraktion von RNA aus Zellen	Macherey Nagel, Düren, Nordrhein-Westfalen, Deutschland
<i>Pierce BCA Protein Assay Kit</i>	Kit zur Bestimmung der Proteinkonzentration	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>Pierce™ Protein G Agarose</i>	Kit zur Coimmunpräzipitation	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Kit zur Synthese von cDNA aus RNA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>Super Signal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate</i>	Lumineszenzsubstrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>Super Signal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate</i>	Lumineszenzsubstrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>Universal ProbeLibrary Probes 1-165</i>	UPL Proben für qPCR	Roche, Basel, Schweiz

3.1.4. Puffer, Lösungen, Nährmedien

Alle für diese Arbeit verwendeten Puffer, Lösungen und Nährmedien werden in Tabelle 4 aufgeführt. Prozentangaben sind als *weight by volume* (w/v) oder *volume by volume* (v/v) angegeben.

Tabelle 4: Puffer, Lösungen und Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung/ Produktbezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Acrylamid 30 %	<i>ROTIPHORESE®</i> NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 (29:1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Ampicillin, Natriumsalz, bestrahlt, 10 mg/ml in H ₂ O	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
APS 10 %	Ammoniumperoxodisulfat 10 % in H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA-Lösung 3 %	Albumin Fraktion V 3 % in TBS-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	DMEM (1X), <i>high Glucose</i> , <i>GlutaMAX™ Supplement</i> , <i>pyruvate</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Material und Methoden

DNA-Ligase	T ₄ DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DNA-Ligase-Puffer	10xT ₄ DNA Ligase Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
dNTP	dNTP-Gemisch (jeweils 10 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
EBC-Lysispuffer	120 mM NaCl 50 mM TRIS 0,5 % NP-40 1 Tablette <i>cOmplete™ Tablets</i> Proteasehemmer-Cocktail pH 7,4 Ad 50 ml H ₂ O	Eigene Herstellung
EDTA	<i>UltraPure™</i> 0,5 M EDTA, pH 8,0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ethidiumbromid	<i>UltraPure™</i> Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
FCS	FBS, <i>Qualified</i> , HI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kanamycin	Kanamycin-Sulfat, 10 mg/ml in H ₂ O	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ladefarbstoff	DNA-Gel-Ladefarbstoff (6x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl in H ₂ O	Eigene Herstellung
Lysispuffer	1 % Triton X-100 1 Tablette <i>cOmplete™ Tablets</i> Proteasehemmer-Cocktail Ad 50 ml PBS	Eigene Herstellung
Magermilchlösung 10 %	Milchpulver, blotting grade 10 % in TBS-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchlösung 5 %	Milchpulver, blotting grade 5 % in TBS-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nährmedium für die Zellkultur	10 % FCS 100 I.E./L Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 50 µg/ml Gentamicin in DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Material und Methoden

PBS	DPBS (1X), no calcium, no magnesium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Penicillin-Streptomycin	<i>Pen Strep</i> 10.000 I.E./ml Penicillin 10.000 µg/ml Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Phusion DNA-Polymerase	<i>Phusion High-Fidelity DNA Polymerase</i> (2 U/µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Polyethylenimin als Transfektionsreagenz	1 mg/ml Polyethylenimin In H ₂ O	Eigene Herstellung
Polymerase-Pufferlösung	<i>5XPhusion HF-Buffer</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Probenpuffer 5-fach konzentriert	10 ml 1 M TRIS Hcl (pH 6,8) 10 ml H ₂ O 0,76 g DTT 4 g SDS 0,1 g Bromphenolblau 20 ml Glycerin Ad 40 ml	Eigene Herstellung
Puffer für Hydrolyse-Sonden 2-fach konzentriert	<i>2 x Light Cycler® 480 Probes Mastermix</i>	Roche, Basel, Schweiz
Restriktionsenzym <i>EcoR I</i>	<i>FastDigest EcoR I</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Restriktionsenzym <i>Hind III</i>	<i>FastDigest Hind III</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Restriktionsenzym-Puffer	<i>Buffer R</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS 0,4 % SDS pH 6,8 in H ₂ O	Eigene Herstellung
SDS-PAGE-Puffer	1 % SDS 0,25 M TRIS 1,92 M Glycin pH 8,3 in H ₂ O	Eigene Herstellung
SOB	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM Kaliumchlorid 10 mM Magnesiumchlorid 10 mM Magnesiumsulfat Ad 1000 ml H ₂ O	Eigene Herstellung

SOC	1 ml 2 M Glucose 1 ml 1 M MgCl ₂ Ad 100 ml SOB	Eigene Herstellung
<i>Stripping-Buffer</i>	100 mM Glycin 20 mM MgAc pH 2,2 in H ₂ O	Eigene Herstellung
TAE-Puffer	1 mM EDTA 40 mM Tris-HCL (pH 8) Ad 1000 ml dH ₂ O	Eigene Herstellung
<i>Tank-Blot-Puffer</i>	250 mM TRIS 2 M Glycin pH 8,3 in H ₂ O	Eigene Herstellung
TBS-Puffer	125 mM Tris 750 mM NaCl pH 7,5 in H ₂ O	Eigene Herstellung
TBS-T-Puffer	125 mM TRIS 750 mM NaCl 0,25 % Tween-20 pH 7,5 in H ₂ O	Eigene Herstellung
TCA	Trichloressigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED 10 %	TEMED 10 % in H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl 0,4 % SDS pH 8,8 in H ₂ O	Eigene Herstellung
Trypsin-EDTA	0,5 % Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

3.1.5. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien werden in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Firmensitz
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>cOmplete™ Tablets</i> Proteasehemmer-Cocktail	Roche, Basel, Schweiz

ddH ₂ O aus <i>Milli-Q Plus</i> Wasseraufbereitungssystem	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
DEPC-behandeltes Wasser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DTT	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 70 % (vergällt)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gentamicin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgAc	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgAc	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Polyethylenimin	Polysciences, Warrington, Pennsylvania, USA
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TERGITOL™-Lösung, NP-40	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS-HCL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.6. Zelllinien

Alle für diese Arbeit verwendet Zelllinien werden in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Zelllinien und Bakterienstämme

Bezeichnung	Charakteristik	Hersteller, Firmensitz
Ba/F3-gp130	Murine Pro-B-Zelllinie mit Oberflächenexpression des Rezeptors gp130 ¹⁰⁶	Immunex, Seattle, Washington, USA
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Chemisch kompetente Escherichia coli	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
HEK 293T	Humane Embryonale Nierenzelllinie, von der HEK 293 Zelllinie ¹⁰⁷ abstammend, die eine mutierte Form SV40 large T Antigen exprimieren ¹⁰⁸	DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland

HEK 293T ADAM10/17 ^{-/-}	HEK 293T Zellen mit <i>knockout</i> der Gene für die Proteasen ADAM10 und ADAM17 ¹⁰⁹	Zur Verfügung gestellt von Dr. Björn Rabe ¹⁰⁹
-----------------------------------	---	--

3.1.7.Marker

Alle in dieser Arbeit verwendeten Marker werden in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Marker

Bezeichnung	Charakteristik	Hersteller, Firmensitz
<i>PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder</i>	Komigrationsstandard in der Proteinelektrophorese	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>GeneRuler 100 bp DNA Ladder</i>	Komigrationsstandard in der DNA-Elektrophorese	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>GeneRuler 1 kb DNA Ladder</i>	Komigrationsstandard in der DNA-Elektrophorese	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

3.2. Methoden

3.2.1. Zellbiologische Methoden

3.2.1.1. Kultivieren von Zellen

Das Kultivieren und Passagieren der Zellen, sowie die transiente Transfektion wurde unter einer Sicherheitswerkbank Klasse II in einem dafür zertifizierten S1-Labor durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Nährmedium diente *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose*. Diesem wurde 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS), 100 I.E./L Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 µg/ml Gentamicin zugesetzt. Die genannte Zusammensetzung wurde als Nährmedium für Human Embryonic Kidney 293T Zellen (HEK 293T Zellen), sowie Human Embryonic Kidney 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen (HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen) verwendet. Zur Kultivierung der Ba/F3-gp130 Zellen wurde genanntem Nährmedium 10 ng/ml *Hyper-IL-6* zugegeben (Kapitel 3.2.1.8). Als Pufferlösung wurde phosphatgepufferte Salzlösung *Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS)* verwendet.

3.2.1.2. Passagieren von adhärenenten Zellen

Um ein optimales Nährstoff- und Platzangebot zur Proliferation und Differenzierung der Zellen gewährleisten zu können wurden die Zellen alle 2-3 Tage passagiert. Dazu wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml *PBS* gewaschen. Zum Spalten der Adhäsionsproteine wurden die Zellen mit 0,05 % Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin-EDTA) versetzt und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die so von der Zellkulturschale gelösten Zellen wurden in 5 ml Nährmedium aufgenommen und bei 500 x g für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im gewünschten Verhältnis in 10 cm Zellkulturschalen für adhärenente Zellen in 10 ml DMEM ausgesät.

3.2.1.3. Passagieren von Suspensionszellen

Im Gegensatz zu adhärenenten Zellen müssen Suspensionszellen zur Passage nicht von der Zellkulturschale gelöst werden. Die Zellen wurden in ihrem Nährmedium aufgenommen und bei 500 x g für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im gewünschten Verhältnis auf in 10 ml Nährmedium in 10 cm Zellkulturschalen für Suspensionszellen kultiviert.

3.2.1.4. Transiente Transfektion

Um die Funktion von bestimmten Proteinen gezielt zu untersuchen, können diese im Zellkulturmodell überexprimiert werden. Bei der transienten Transfektion wird die zusätzliche DNA als Plasmid eingebracht, wodurch das Genom der Zielzelle im Gegensatz zur stabilen Transfektion, nicht dauerhaft verändert wird.

Zur transienten Transfektion wurden am Vortag $2,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Als Transfektionsansatz wurden 500 µl DMEM ohne Zusatz von FCS mit je 3 µg Plasmid-DNA und 9 µg Polyethylenimin (PEI) pro verwendetem Plasmid versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zellkulturüberstand der zu transfizierenden Zellen wurde verworfen und es wurden 4,5 ml frisches Nährmedium mit dem Transfektionsansatz zugegeben. Die Zellen wurden für 5-6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand mit Nährmedium auf ein finales Volumen von 10 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde der Zellkulturüberstand verworfen, die adhärenenten Zellen mit PBS gewaschen und 5 ml DMEM ohne Zusatz von FCS als Nährmedium auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Alle verwendeten Plasmide sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Plasmide

Gen	Spezies	C-Tag	N-Tag	Vektor	Resistenz
ADAM10	Human	FLAG	/	pcDNA4/TO	Ampicillin
ADAM10	Murin		/	pcDNA 3.1	Ampicillin
ADAM17	Human	FLAG, MYC	/	pCMV6- Entry	Kanamycin, Neomycin
ADAM17	Murin		/	pcDNA 3.1	Ampicillin

ADAM17 <i>Ecto</i>	Murin	<i>FLAG</i>	<i>HA</i>	pcDNA4/TO	Ampicillin
ADAM9	Murin	/	/	pcDNA 3.1	Ampicillin
CD23	Human	/	<i>HA</i>	pIRES2-EGFP	Kanamycin, Neomycin
IL-11R	Human	<i>HA</i>	<i>MYC</i>	pcDNA 3.1	Ampicillin
IL-11R Δ H353-S362	Human	<i>HA</i>	<i>MYC</i>	pcDNA 3.1	Ampicillin
IL-6R	Human	/	/	pcDNA 3.1	Ampicillin
Leervektor	/	<i>FLAG</i>	/	pcDNA4/TO	Ampicillin
Leervektor	/	/	/	pcDNA 3.1	Ampicillin
Meprin α	Human	/	/	pSG5	Ampicillin
Meprin β	Human	/	/	pSG5	Ampicillin
Meprin β	Human	<i>FLAG</i>	/	pcDNA4/TO	Ampicillin
Meprin β G45R	Human	<i>FLAG</i>	/	pcDNA4/TO	Ampicillin
Meprin β G89R	Human	<i>FLAG</i>	/	pcDNA4/TO	Ampicillin
MT1-MMP	Human	<i>mCherry</i>	/	pcDNA 3.1	Ampicillin
MT1-MMP <i>FLAG</i>	Human	<i>FLAG</i>	/	pcDNA4/TO	Ampicillin

3.2.1.5. Stimulation von *A Disintegrin And Metalloproteinase 10* und 17

Um die Aktivität von endogenem ADAM10 und ADAM17 zu untersuchen wurden HEK 293T Zellen, sowie HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen mit Ionomycin oder Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) stimuliert.

2 x 10⁶ Zellen wurden mit einem Plasmid, das für IL-11R kodiert transfiziert und anschließend auf 4 *Wells* einer 6-*Well*-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit *PBS* gewaschen und das Nährmedium durch DMEM ohne Zusatz von FCS ersetzt. Dem Nährmedium wurde entweder 1 μ M Ionomycin für eine Stunde oder 100 nM PMA für 2 Stunden zugegeben. Beide Stoffe wurden in DMSO gelöst eingesetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle diente DMSO im gleichen Volumenverhältnis. Anschließend wurden Zellen und Zellkulturüberstand wie zuvor beschrieben geerntet. Die verwendeten Stimulanzen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Stimulanzen

Bezeichnung	Charakteristik	Hersteller, Firmensitz
Ionomycin	Stimulation von ADAM10 durch Einstrom von Calcium in die Zelle	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
PMA	Stimulation von ADAM17 durch Induktion der Proteinkinase C	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

3.2.1.6. Inhibition des *sheddings* von ADAM17 durch ADAM8

Die transiente Transfektion wurde wie zuvor beschrieben (Kapitel 3.2.1.4) durchgeführt. Direkt nach dem Mediumwechsel wurde dem frischen Zellkulturmedium 10 µM N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycin-tert-butylester (DAPT) als Inhibitor der Gamma-Sekretase zugegeben. Ebenfalls wurden 10 µM Batimastat (BB-94) als Matrix Metalloprotease Inhibitor¹¹⁰, 3 µM GW280623 (GW) als ADAM10 und ADAM17 spezifischer Inhibitor¹¹¹ oder 0,5 µM BK-1361 als ADAM8 spezifischer Inhibitor zugegeben¹¹⁰. Die verwendeten Inhibitoren sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Inhibitoren

Bezeichnung	Charakteristik	Hersteller, Firmensitz
BB-94	Inhibition der enzymatischen Aktivität von Matrix Metalloproteasen	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
BK-1361	Inhibition der enzymatischen Aktivität von ADAM8	Zur Verfügung gestellt von Prof. Jörg Bartsch ¹¹⁰
DAPT	Inhibition der enzymatischen Aktivität der Gamma-Sekretase	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
GW280623	Inhibition der enzymatischen Aktivität von ADAM10 und ADAM17	Iris Biotech GmbH, Marktrechwitz, Deutschland

3.2.1.7. Zellernte

Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und bei 500 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bei 186.000 x g für 2 Stunden bei 4 °C ultrazentrifugiert. Die Proben wurden anschließend entweder direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden von der Zellkulturschale abgeschabt und mit *PBS* gewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 500 x g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

3.2.1.8. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* *Phosphorylierung*

Die Phosphorylierung von STAT3 wurde in Ba/F3-gp130 Zellen durchgeführt. Diese murinen Pro-B-Zellen wurden mit einer für das Protein gp130 kodierenden

complementary Deoxyribonucleic Acid (cDNA) stabil transfiziert, sodass sie gp130 überexprimieren¹⁰⁶. Infolgedessen benötigen diese Zellen die Aktivierung des β -Rezeptors gp130 und die daraus resultierende Phosphorylierung von STAT3 zur Proliferation. Diese Aktivierung wurde durch Zugabe von 10 ng/ml *Hyper*-IL-6 in das Nährmedium erreicht.

Die STAT3 Phosphorylierung dient dem Nachweis von IL-6 beziehungsweise IL-11 *trans-signaling*. Dazu wurden 10^6 Zellen mit *PBS* gewaschen und anschließend für 2 Stunden in 10 ml DMEM ohne Zusatz von FCS aufgenommen und bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 500 x g für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und in 100 μ l DMEM ohne Zusatz von FCS aufgenommen. Den Zellen wurde mit sIL-6R beziehungsweise sIL-11R angereicherter Zellkulturüberstand sowie rekombinantes IL-6 oder IL-11 als Aktivatoren von gp-130 zugegeben. Es folgte ein Inkubationsschritt bei 37 °C für 15 Minuten. Die Zellen wurden bei 500 x g für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Zellkulturüberstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Probenpuffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die verwendeten rekombinanten Proteine sind in Tabelle 11 aufgeführt

Tabelle 11: Rekombinante Proteine

Bezeichnung	Charakteristik	Hersteller, Firmensitz
<i>Hyper</i> -IL-6	Komplex aus IL-6 und sIL-6R	AG Rose-John ⁸⁰
IL-6	Rekombinantes Interleukin-6	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
IL-11	Rekombinantes Interleukin-11	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland

3.2.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1. Hitzeschocktransformation

Die Hitzeschocktransformation wurde als Methode zum Gentransfer freier DNA in chemisch kompetente *Escherichia coli* XL1-Blue (*E. coli* XL 1 blue) verwandt. 30 μ l Bakteriensuspension wurden mit 2 μ g Plasmid-DNA versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Auf der Plasmid-DNA ist unter anderem die Sequenz für das entsprechende Protein sowie eine Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum

kodiert. Die Suspension wurde zunächst für 45 Sekunden bei 42 °C und anschließend für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit 900 µl SOC-Medium versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C und 600 *revolutions per minute (rpm)* auf dem Heizblock schüttelnd inkubiert. Der Hitzeschock sowie die Inkubation im SOC-Medium sollen die Effizienz der DNA-Aufnahme erhöhen.

3.2.2.2. Selektionierung einer Bakterienkolonie

Um eine weitere Kultivierung der mit Plasmid-DNA transformierten Bakterien zu ermöglichen, müssen diese selektioniert werden. Dazu wurden 50 µl der Bakteriensuspension auf einem festen Nährboden ausgestrichen. Der Nährboden besteht aus Lysogeny Broth Medium (LB-Medium), Agarose und dem Antibiotikum gegen das die auf der Plasmid-DNA kodierte Resistenz gerichtet ist. Die ausplattierte Bakterienkultur wird über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am Folgetag wurden 100 ml LB-Medium mit 1 mg des Antibiotikums versetzt, gegen das die auf der Plasmid-DNA kodierte Resistenz gerichtet ist. Anschließend wurde das Nährmedium mit der zuvor ausplattierten Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 *rpm* inkubiert.

3.2.2.3. Plasmidisolation aus E. coli

Die am Vortag angesetzte Bakterienkultur (Kapitel 3.2.2.2) wurde zu jeweils 50 ml in Schraubröhren überführt und bei 4000 *rpm* für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Plasmidaufreinigung erfolgte mit dem *NucleoBond Xtra Midi Kit for transfection-grade plasmid DNA* nach Herstellerangaben. Die Methode basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse¹¹².

3.2.2.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann photometrisch bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei

diesem Wert werden die aromatischen Ringe der DNA- und RNA-Basen durch UV-Licht angeregt. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ($E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \times c \times d$; E =Extinktion, λ = Wellenlänge, c =Konzentration, d =Schichtdicke) kann die Konzentration berechnet werden. Zur Konzentrationsbestimmung wurde das Spektrophotometer Spark® verwendet.

3.2.2.5. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*) ist eine Methode zur Amplifikation (Vervielfältigung) von DNA. Der zu vervielfältigende Bereich wird als *Amplicon* bezeichnet und dient als Vorlage (*Template*). Die Produkte der PCR werden als Amplifikate bezeichnet. Ausgehend von den an das *Template* angelagerten *Primern*, welche kurze einzelsträngige DNA-Moleküle sind, amplifiziert eine hitzestabile Polymerase den gewünschten DNA-Abschnitt.

Dazu wurde eine Lösung aus Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) mit einer hitzestabilen Polymerase und einer Polymerase-Pufferlösung, sowie dem *Template* und den *Primern* versetzt. Die angesetzte Lösung wird mit Wasser, das durch seine Behandlung mit Diethyldicarbonat frei von RNAsen ist (DEPC-Wasser), auf 30 µl Volumen aufgefüllt.

Eine PCR besteht aus 20-40 Zyklen wiederholter Temperaturänderung. In jedem Zyklus wird die Lösung auf 95 °C erhitzt, wodurch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Strängen der DNA aufgetrennt werden (Denaturierung). Um sicherzustellen, dass die DNA nur in Form von Einzelsträngen vorliegt, wird die Lösung im ersten Zyklus für längere Zeit erhitzt (Initialisierung). Im nächsten Schritt wird die Lösung auf 55-65 °C abgekühlt, wodurch eine spezifische Anlagerung der *Primer* ermöglicht wird (Primerhybridisierung). Die Temperatur ist dabei abhängig von der Länge und Sequenz der *Primer*. Anschließend wird die Lösung auf 68-72 °C erhitzt, abhängig vom Temperaturoptimum der Polymerase. Diese synthetisiert dann vom *Primer* ausgehend, einen zum *Template* komplementären Strang (Elongation). Im letzten Zyklus wird dieser Schritt verlängert, um sicherzustellen, dass alle komplementären Stränge vollständig gebildet werden (finale Elongation).

3.2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Nach der Amplifikation wurde die Größe der DNA-Abschnitte mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Durch Aufkochen in Tris(hydroxymethyl)aminomethan(TRIS)-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) wurde die Agarose gelöst. Anschließend wurde Ethidiumbromid als Farbstoff zugefügt. Durch Abkühlen härtet diese Lösung zu einem Gel aus, dessen Moleküle über Wasserstoffbrücken quervernetzt sind. Die Porengröße des Gels ist dabei abhängig von der Konzentration der Agarose. In dieser Arbeit wurde eine Agarosekonzentration von 1,5 % gewählt. Die Proben werden vor der Elektrophorese mit einem Ladefarbstoff versetzt, der die Proben mit anionischen Farbstoffen anfärbt und so die Lauffront im Gel sichtbar macht. Parallel zu den Proben wird das Gel mit einer Markerlösung beladen und es wird eine elektrische Spannung angelegt, die eine Migration der negativ geladenen DNA-Moleküle zum positiven Pol bewirkt. Durch die netzartige Struktur des Gels werden die DNA-Moleküle dabei nach ihrer Größe aufgetrennt. Als Kontrolle dient eine Markerlösung, bestehend aus DNA-Molekülen bekannter Größe. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA und macht diese durch Beleuchtung mit ultraviolettem Licht sichtbar.

3.2.2.7. Gelextraktion

Die Banden mit den amplifizierten DNA-Abschnitten wurden ausgeschnitten und die DNA mit dem *GeneJET Gel Extraction Kit* nach Herstellerangaben extrahiert.

3.2.2.8. Klonierung von MT1-MMP

Das Plasmid MT1-MMP *mCherry*¹¹³ im Expressionsvektor pcDNA 3.1 wurde freundlicherweise von Prof. Linder, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, zur Verfügung gestellt.

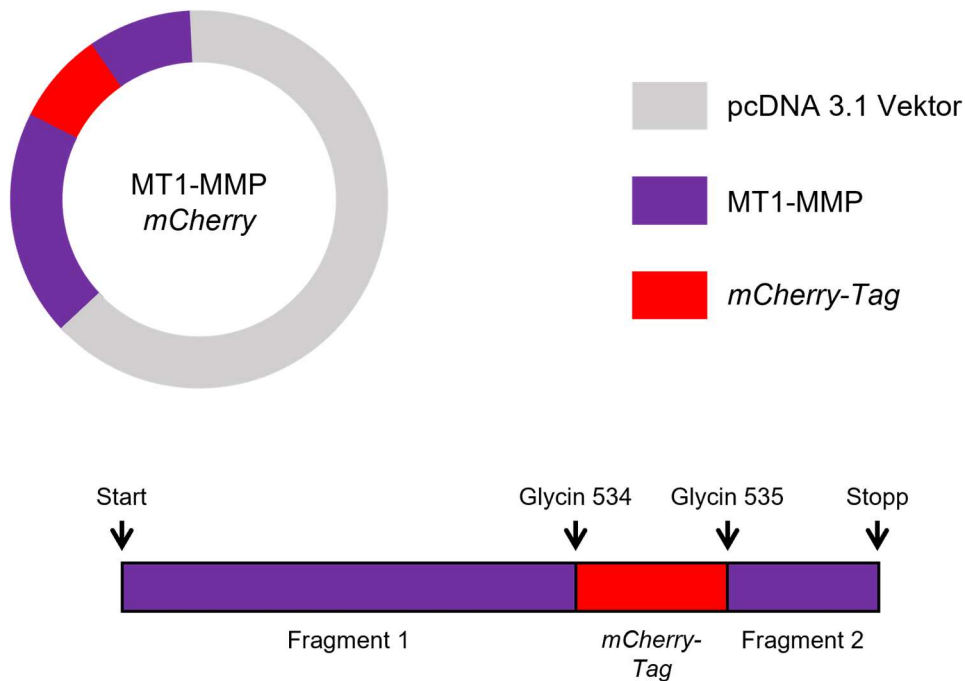


Abbildung 3: MT1-MMP mCherry

Der *mCherry-Tag* liegt innerhalb der proteinkodierenden Sequenz zwischen Glycin an Position 534 und Glycin an Position 535 des Konstrukts, wodurch eine Beeinträchtigung der Aktivität der Protease vermutet wurde. Aus diesem Grund wurde der *mCherry-Tag* entfernt und die kodierende Sequenz in den Expressionsvektor pcDNA4/TO kloniert. Der Expressionsvektor pcDNA4/TO verfügt über einen *FLAG-Tag* gefolgt von einem Stopp-Codon in seiner *multiple cloning site*. Die Position, an der die proteinkodierende Sequenz für MT1-MMP eingefügt wurde, liegt N-terminal des im Expressionsvektor befindlichen *FLAG-Tags*. Die Primer wurden so konzipiert, dass das Stopp-Codon am Ende der proteinkodierenden Sequenz für MT1-MMP deletiert wurde und damit der *FLAG-Tag* Teil der proteinkodierenden Sequenz wird.

3.2.2.8.1. *Overlap Extension Polymerase Chain Reaction*

Die kodierende Sequenz für das Protein MT1-MMP wurde mittels PCR amplifiziert. Dabei diente das Plasmid MT1-MMP mCherry als *Template*. Unter Verwendung von *Forward Primer 1* und *Reverse Primer 4* wurde die N-terminal des *mCherry-Tags*

liegende Sequenz amplifiziert. Unter Verwendung von *Forward Primer 3* und *Reverse Primer 2* wurde die C-terminal liegende Sequenz des *mCherry-Tags* amplifiziert. Anschließend wurden beide Abschnitte nach Größe aufgetrennt (Kapitel 3.2.2.6) und extrahiert (Kapitel 3.2.2.7).

Die beiden DNA-Abschnitte verfügen aufgrund der komplementären Sequenz von *Reverse Primer 4* und *Forward Primer 3* über jeweils ein zum anderen DNA-Abschnitt komplementäres Ende. In einer weiteren PCR lagern sich diese beiden komplementären Enden aneinander und bilden ein zusammenhängendes Konstrukt. Unter Verwendung von *Forward Primer 1* und *Reverse Primer 2* wurden beide DNA-Abschnitte zu einem zusammenhängenden Konstrukt amplifiziert. Das Amplifikat wurde anschließend nach Größe aufgetrennt (Kapitel 3.2.2.6) und extrahiert (Kapitel 3.2.2.7). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 12, der Reaktionsansatz in Tabelle 13 und die Parameter der PCR in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 12: Primer für die Klonierung von MT1-MMP

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Hersteller
<i>Forward Primer 1</i>	AACCAAGCTTATGTCTCCCGCCCCAA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<i>Reverse Primer 2</i>	CCTCGAATTCGACCTTGTCCAGCAG	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<i>Forward Primer 3</i>	ACGAGGAGGGCGGCGGGGCGGTGAG	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<i>Reverse Primer 4</i>	CTCACCGCCCCGCCGCCCTCCTCGT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 13: Reaktionsansatz PCR

Bezeichnung	Charakteristik	Menge
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	5 µl, 2 mM
<i>5xPhusion HF-Puffer</i>	Polymerase-Pufferlösung	6 µl
<i>Phusion DNA-Polymerase</i>	Hitzestabile DNA-Polymerase	0,5 µl, 2 U/µl
<i>Template</i>		50 ng
<i>Forward Primer</i>		1 µl, 10 µM
<i>Reverse Primer</i>		1 µl, 10 µM
DEPC-Wasser	RNAse freies Wasser	Ad 30 µl

Tabelle 14: Parameter der PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initialisierung	95 °C	5 Minuten	
Denaturierung	95 °C	1 Minute	} x 30
Primer Hybridisierung	65 °C	1 Minute	
Elongation	72 °C	1:30 Minute	
Finale Elongation	72 °C	5 Minuten	
Lagerung	4 °C	∞	

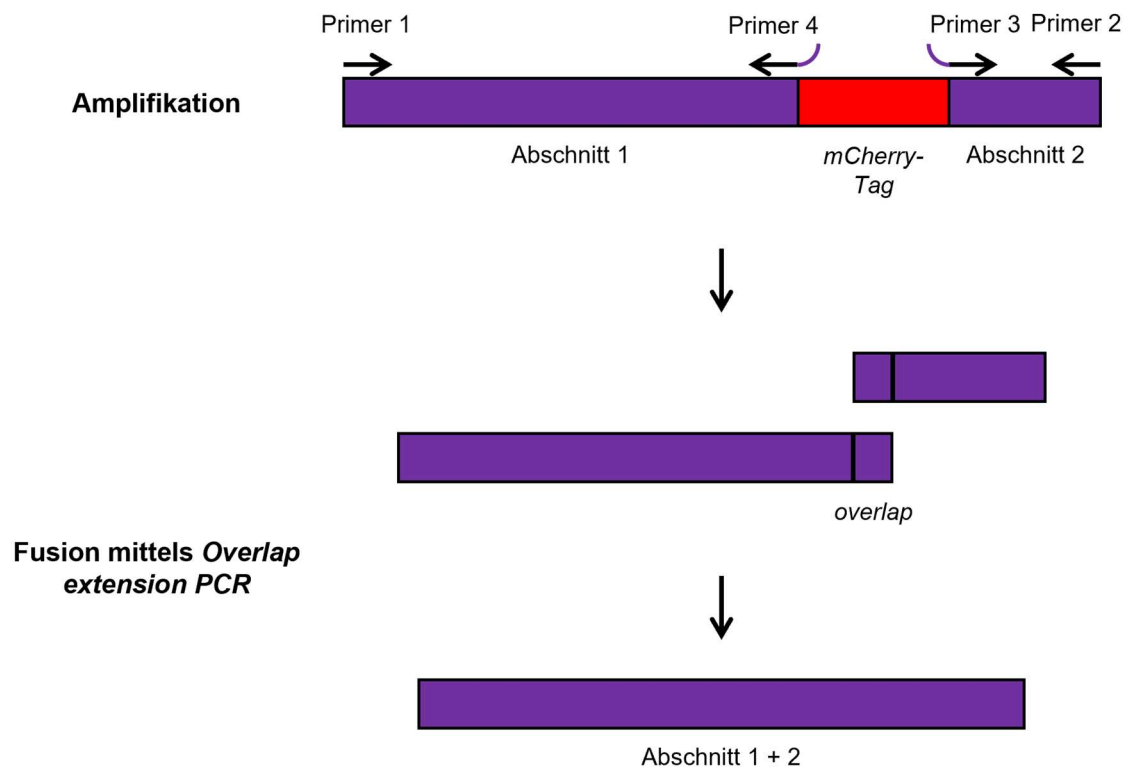


Abbildung 4: Amplifikation des kodierenden Abschnittes von MT1-MMP *mCherry*

Die kodierenden Abschnitte (lila) C-terminal und N-terminal des *mCherry-Tags* (rot) wurden amplifiziert. Anschließend wurden beide kodierenden Abschnitte (lila) mittels *Overlap Extension Polymerase Chain Reaction* als zusammenhängender Abschnitt amplifiziert.

3.2.2.8.2. Restriktionsverdau

Vor der Ligation wurden der amplifizierte DNA-Abschnitt (*Insert*) und der Expressionsvektor mit Restriktionsenzymen inkubiert. Diese binden an enzymespezifische Erkennungssequenzen in der DNA. Die Endonuklease katalysiert eine sequenzspezifische Hydrolyse der DNA. Je nach Restriktionsenzym entstehen

dabei *sticky ends*, also Enden mit Überhang eines Einzelstranges, oder *blunt ends*, also Enden ohne Überhang eines Einzelstranges. Die Erkennungssequenzen sind palindromisch wodurch die beiden entstehenden *sticky ends* identisch sind. Mit dem *Forward Primer 1* wurde dem *Insert* N-terminal eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Hind III*: 5' AAGCTT 3' und mit dem *Reverse Primer 2* C-terminal eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *EcoR I*: 5' GAATTC 3' hinzugefügt. Expressionsvektor und *Insert* wurden jeweils mit den Restriktionsenzymen, einem Restriktionsenzym-Puffer und DEPC-Wasser für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. In einem Kontrollansatz wurden Puffer und Restriktionsenzyme durch DEPC-Wasser ersetzt. Die Zusammensetzung der jeweiligen Ansätze sind in Tabelle 15, Tabelle 16 und Tabelle 17 aufgeführt. Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde die verdaut DNA zunächst nach Größe aufgetrennt (Kapitel 3.2.2.6) und anschließend extrahiert (Kapitel 3.2.2.7).

Tabelle 15: Reaktionsansatz Restriktionsverdau des Inserts

Bezeichnung	Charakteristik	Menge
<i>Insert</i>	Amplifizierter DNA-Abschnitt	1 µg
R-Puffer	Restriktionsenzym-Puffer	3 µl
<i>EcoR I</i>	Restriktionsenzym	1 µl, 10 U/µl
<i>Hind III</i>	Restriktionsenzym	1 µl, 10 U/µl
DEPC-Wasser	RNAse freies Wasser	Ad 34 µl

Tabelle 16: Reaktionsansatz Restriktionsverdau des Vektors

Bezeichnung	Charakteristik	Menge
pcDNA4/TO	Expressionsvektor	1 µg
R-Puffer	Restriktionsenzym-Puffer	3 µl
<i>EcoR I</i>	Restriktionsenzym	1 µl, 10 U/µl
<i>Hind III</i>	Restriktionsenzym	1 µl, 10 U/µl
DEPC-Wasser	RNAse freies Wasser	Ad 34 µl

Tabelle 17: Kontrollansatz Restriktionsverdau

Bezeichnung	Charakteristik	Menge
pcDNA4/TO	Expressionsvektor	1 µg
DEPC-Wasser	RNAse freies Wasser	Ad 34 µl

3.2.2.8.3. Ligation

Zur Insertion des *Inserts* in den Expressionsvektor, wurde die T₄-DNA-Ligase verwandt. Diese verbindet DNA-Sequenzen über Phosphodiesterasebindungen. Dabei werden *sticky ends* schneller ligiert als *blunt ends*. Zur Ligation wurden das verdaute *Insert* und der verdaute Expressionsvektor mit T₄-DNA-Ligase und T₄-DNA-Ligase-Puffer versetzt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert, um die Aktivität der T₄-DNA-Ligase zu stoppen. Als Kontrolle wurde in einem Ansatz das *Insert* durch DEPC-Wasser ersetzt. Die Zusammensetzungen des Reaktions- und Kontrollansatzes sind in Tabelle 18 und Tabelle 19 aufgeführt. In Abbildung 5 wird der Vorgang schematisch dargestellt. Nach der Ligation wurde das Konstrukt in *E.coli* XL 1-Blue transformiert (Kapitel 3.2.2.1), die transformierte Bakterienkolonie selektiert, kultiviert (Kapitel 3.2.2.2) und das Plasmid isoliert (Kapitel 3.2.2.3).

Tabelle 18: Reaktionsansatz Ligation

Bezeichnung	Charakteristik	Menge
<i>Insert</i> (verdaut)	Verdauter amplifizierter DNA-Abschnitt	9 µl, ca. 300 ng
pcDNA4/TO (verdaut)	Verdauter Expressionsvektor	3 µl, ca. 100 ng
T ₄ -DNA-Ligase	DNA-Ligase	1 µl, 5 U/µl
10xT ₄ -DNA-Ligase-Puffer	DNA-Ligase-Puffer	1,5 µl

Tabelle 19: Kontrollansatz Ligation

Bezeichnung	Charakteristik	Menge
DEPC-Wasser	RNase freies Wasser	9 µl
pcDNA4/TO (verdaut)	Verdauter Expressionsvektor	3 µl, ca. 100 ng
T ₄ -DNA-Ligase	DNA-Ligase	1 µl, 5 U/µl
10xT ₄ -DNA-Ligase-Puffer	DNA-Ligase-Puffer	1,5 µl



Abbildung 5: Restriktionsverdau und Ligation in den Zielvektor

Die kodierende Sequenz von MT1-MMP (lila) und der Zielvektor pcDNA4/TO (grau) wurden mit Restriktionsenzymen verdaut und N-terminal des *FLAG-Tags* (grün) in den Zielvektor pcDNA4/TO per Ligation eingefügt.

3.2.2.8.4. Sequenzierung

Nach der Präparation wurde das Plasmid sequenziert, um die korrekte Durchführung der Klonierung zu kontrollieren. Die Sequenzierung wurde von der Firma Eurofins nach der Sanger-Sequenzierungsmethode¹¹⁴ durchgeführt.

3.2.3. Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1. Herstellung von Zelllysaten

Das nach dem Waschen verbliebene Zellpellet wurde in 200 µl Lysispuffer resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 15.000 x g für 15 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration des Lysats wurde mittels *Bicinchoninic Acid Assay* (BCA Assay)

bestimmt (Kapitel 3.2.3.3) und das Lysat in Probenpuffer für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert.

3.2.3.2. TCA-Fällung

Um die Proteinkonzentration zu erhöhen wurden die ultrazentrifugierten Zellkulturüberstände (Kapitel 3.2.1.7) mithilfe von Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dazu wurden jeweils 900 µl des Zellkulturüberstands mit 100 µl einer 100 % (w/v) Lösung TCA in einem Mikroreaktionsgefäß versetzt und anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde bei 15.000 x g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und -20 °C kaltes Aceton auf das Pellet aus ausgefallenem Protein gegeben um verbliebenes TCA auszuwaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 15.000 x g für 8 Minuten bei 4 °C. Das Aceton wurde verworfen und das Mikroreaktionsgefäß für eine Stunde bei geöffnetem Deckel unter den Abzug gestellt, damit verbliebenes Aceton verdampft. Das Proteinpellet wurde in Probenpuffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 95 °C gelöst.

3.2.3.3. *Bicinchoninic Acid Assay*

Durch einen *BCA Assay* kann die Proteinkonzentration einer Lösung unter Verwendung der Bicinchoninsäure bestimmt werden¹¹⁵. Dabei werden zweiwertige Kupferionen durch die Peptidbindungen der in Lösung befindlichen Proteine zu einwertigen Kupferionen reduziert. Diese bilden mit je zwei Molekülen Bicinchoninsäure violette Komplexe, die Licht der Wellenlänge 562 nm absorbieren. Die Menge der reduzierten Kupferionen ist dabei proportional zur Proteinkonzentration der Lösung. Die Proteinkonzentration kann somit indirekt photometrisch indirekt bestimmt werden. Der Nachweis erfolgte mit dem *Pierce BCA Protein Assay Kit* nach Herstellerangaben.

3.2.3.4. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) aufgetrennt¹¹⁶. Die benötigten Polyacrylamidgele wurden durch Zugabe von Acrylamid zu Trenngel- oder Sammelgelpuffer hergestellt. Durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter wurde die radikalische Kettenpolymerisation des Acrylamides in wässriger Lösung, und dadurch die Bildung eines Gels, eingeleitet und durch Zugabe von Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert. In dieser Arbeit wurden Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 7,5 %, 10 % oder 12 % verwendet. Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 3 %. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 20 aufgeführt. Die Proben, sowie eine Markerlösung aus angefärbten Proteinen bekannter Größe, wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Das im Probenpuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) maskiert die Eigenladung der Proteine mit negativer Ladung. Eine an das Gel angelegte Spannung bewirkte so eine Migration der durch das SDS negativ geladenen Proteine zur Anode und dadurch eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse unabhängig von der Eigenladung. Das Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Durch den Unterschied in pH-Wert und Acrylamidkonzentration konzentrieren sich die Proteine zunächst an der Grenze zum Trenngel, in dem dann die eigentliche Auftrennung stattfindet. Vor dem Beladen wird das Gel in eine Elektrophoreseapparatur eingespannt und in eine mit SDS-PAGE-Puffer gefüllte Kammer überführt, über die die elektrische Spannung angelegt wird.

Tabelle 20: Reaktionsansatz SDS-Gele

Bezeichnung	Trenngel 7,5 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %	Sammelgel 3 %
Trenngelpuffer	2 ml	2 ml	2 ml	
Sammelgelpuffer				1 ml
ddH ₂ O	3,88 ml	3,21 ml	2,68 ml	2,44 ml
Acrylamid 30 %	2 ml	2,67 ml	3,2 ml	0,51 ml
TEMED 10 %	80 µl	80 µl	80 µl	50 µl
APS 10 %	80 µl	80 µl	80 µl	50 µl

3.2.3.5. Western Blot

3.2.3.5.1. Proteintransfer

Nach der Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse wurden diese von dem Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen, um die Detektion durch Antikörper zu ermöglichen. Dabei wurden Nitrocellulose- oder Polyvinylidendifluoridmembranen (PVDF-Membran) verwendet. Die Anlage einer elektrischen Spannung bewirkte die Migration der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die anodenseitig anliegende Membran. In dieser Arbeit wurde das Tank-Blot Verfahren angewendet. Dabei werden Gel und Membran zwischen sechs Lagen Filterpapier und zwei Kunststoffschwämmen in eine Kassette eingespannt. Diese Kassette wird in einen mit *Tank-Blot*-Puffer gefüllten Tank eingelegt, über den die elektrische Spannung angelegt wird.

3.2.3.5.2. Blockierung

Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern, wurden nach dem Proteintransfer die freien Stellen auf der Membran mit einer Proteinlösung blockiert, an die der Antikörper nicht binden kann. In dieser Arbeit wurde entweder eine Lösung aus 10 % Magermilchpulver oder 3 % bovines Serumalbumin (BSA) in *TRIS-buffered saline*-Puffer (TBS-Puffer) verwendet. Die Membran wurde in einem Schraubröhrchen mit 10 ml der Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer inkubiert.

3.2.3.5.3. Immunmarkierung

Zur Detektion des gesuchten Proteins wurde die Membran in 5 ml einer Primärantikörperlösung über Nacht bei 4 °C auf einem Rollenmischer inkubiert. Die Lösung besteht aus Primärantikörperstammlösung und 5 % Magermilchpulver oder 3 % BSA in TBS-Puffer. Das Verhältnis wurde den Herstellerangaben des jeweiligen Primärantikörpers entnommen. Am Folgetag wurde die Membran gewaschen, um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Dazu wurde sie 3-mal in *TRIS*-

buffered saline with Tween20-Puffer (TBS-T-Puffer) und 3-mal in TBS-Puffer für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer inkubiert. Anschließend wurde die Membran in 10 ml einer Sekundärantikörperlösung für eine Stunde auf einem Rollenmischer inkubiert. Die Lösung besteht aus der Sekundärantikörperstammlösung und TBS-Puffer im Verhältnis 1:20.000. Der Sekundärantikörper richtet sich gegen den speziespezifischen FC-Teil des Primärantikörpers und ist an ein Reporterenzym gekoppelt. In dieser Arbeit wurden polyklonale Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelte Antikörper verwendet. Nach der Inkubation wurde die Membran gleichermaßen 3-mal in TBS-T-Puffer und 3-mal in TBS-Puffer gewaschen. Die indirekte Detektion der Proteinsignale erfolgte durch Zugabe eines Lumineszenzsubstrates auf die Membran. Die durch das Reporterenzym katalysierte Oxidationsreaktion des Lumineszenzsubstrates führt zur Emission von Licht, das durch ein Chemilumineszenzdetektionsgerät aufgenommen werden kann. In dieser Arbeit wurde das *Super Signal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate*, sowie das *Super Signal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* nach Herstellerangaben mit einem *Luminescent Image Analyzer LAS-3000 mini* verwendet. Alle verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 21, alle Sekundärantikörper in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 21: Primärantikörper für Western Blot

Epitop	Bezeichnung	Spezies	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
ADAM10	Ab124695	Kaninchen	1:1000 in BSA 3 %	abcam, Cambridge, UK
ADAM17 C-Terminus	AB 19027	Kaninchen	1:1000 in Magermilchlösung 5 %	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
ADAM17 N-Terminus human	A300E	Maus	1:1000 in Magermilchlösung 5 %	AG Rose-John ^{117,118}
ADAM17 N-Terminus murin	10.3	Kaninchen	1:1000 in Magermilchlösung 5 %	Pineda, Berlin, Deutschland
ADAM8	PA5-47047	Ziege	1:1000 in BSA 3 %	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ADAM9	Polyklonaler Antikörper	Kaninchen	1:1000 in BSA 3 %	Zur Verfügung gestellt von Prof. Carl Blobel

Material und Methoden

Aktin	A2066	Kaninchen	1:1000 in Magermilchlösung 5 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<i>FLAG-Tag</i>	F1804	Maus	1:1000 in Magermilchlösung 5 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
GAPDH	14C10	Kaninchen	1:1000 in Magermilchlösung 5 %	Cell Signaling Technology, Inc., Cambridge, UK
HA-Tag	C29F4	Kaninchen	1:1000 in Magermilchlösung 5 %	Cell Signaling Technology, Inc., Cambridge, UK
IL-6R	4-11	Maus	1:1000 in Magermilchlösung 5 %	AG Rose-John ¹¹⁹
Meprin α	Tier 1	Kaninchen	1:1000 in Magermilchlösung 5 %	Pineda, Berlin, Deutschland
Meprin β	Tier 1	Kaninchen	1:1000 in Magermilchlösung 5 %	Pineda, Berlin, Deutschland
<i>MYC-Tag</i>	9B11	Maus	1:1000 in Magermilchlösung 5 %	Cell Signaling Technology, Inc., Cambridge, UK
pSTAT3	9131 (Tyr705)	Kaninchen	1:1000 in BSA 3 %	Cell Signaling Technology, Inc., Cambridge, UK
STAT3	9139 (124H6)	Maus	1:1000 in BSA 3 %	Cell Signaling Technology, Inc., Cambridge, UK

Tabelle 22: Sekundärantikörper für *Western Blot*

Epitop	Bezeichnung	Spezies	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
Kaninchen IgG	Sekundärantikörper für <i>Western Blotting</i> , peroxidasekonjugiert, anti-Kaninchen	Ziege	1:10000 in TBS	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, Pennsylvania, USA
Maus IgG	Sekundärantikörper für <i>Western Blotting</i> , peroxidasekonjugiert, anti-Maus	Schaf	1:10000 in TBS	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, Pennsylvania, USA
Ziege IgG	Sekundärantikörper für <i>Western Blotting</i> , peroxidasekonjugiert,	Kaninchen	1:10000 in TBS	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.,

	anti-Ziege			West Grove, Pennsylvania, USA
--	------------	--	--	-------------------------------------

3.2.3.6. Coimmunpräzipitation

Mittels Coimmunpräzipitation wurde untersucht ob zwei Proteine miteinander interagieren. Für die Coimmunpräzipitation wurde *Pierce™ Protein G Agarose* nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach der Zellernte wurden die transfizierten Zellen in 450 µl EBC-Lysispuffer für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 25000 x g für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und von diesem wiederum 50 µl für einen *BCA-Assay* (Kapitel 3.2.3.3) und eine Kontrolle der Expression der transfizierten Proteine mittels *Western Blot* (Kapitel 3.2.3.5) separiert. Das Lysat wurde mit 1 µg *MYC-Tag* Antikörper versetzt, mit *PBS* auf 1 ml Volumen aufgefüllt und über Nacht bei 4 °C rollend inkubiert. Die *beads* wurden 3-mal mit *PBS* gewaschen und in 3 % BSA über Nacht bei 4 °C rollend inkubiert. Am nächsten Tag wurden die *beads* erneut 3-mal in *PBS* gewaschen, in 50 µl EBC-Lysispuffer aufgenommen und mit dem Lysat versetzt. Diese Mischung wurde für 30 Minuten bei 4 °C rollend inkubiert. Das Lysat wurde verworfen und die *beads* 3-mal in *PBS* gewaschen. Das *PBS* wurde verworfen und die *beads* wurden für 30 Minuten bei 65 °C in Probenpuffer denaturiert. Die Probe wurde mittels *Western Blot* (Kapitel 3.2.3.5) analysiert. Alle verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 23, alle Sekundärantikörper in Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 23: Primärantikörper für die Coimmunpräzipitation

Epitop	Bezeichnung	Spezies	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
ADAM17 C-Terminus	AB 19027	Kaninchen	1:1000 in Magermilchlösung 5 %	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
<i>MYC-Tag</i>	9B11	Maus	1:1000 in Magermilchlösung 5 %	Cell Signaling Technology, Inc., Cambridge, UK

Tabelle 24: Sekundärantikörper für die Coimmunpräzipitation

Epitop	Bezeichnung	Spezies	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
--------	-------------	---------	---------------------------	------------

Kaninchen IgG	Sekundärantikörper für <i>Western Blotting</i> , peroxidasekonjugiert, anti-Kaninchen	Ziege	1:10000 in TBS	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, Pennsylvania, USA
Maus IgG	Sekundärantikörper für <i>Western Blotting</i> , peroxidasekonjugiert, anti-Maus	Schaf	1:10000 in TBS	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, Pennsylvania, USA

3.2.3.7. RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Zur Extraktion von RNA aus HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen am Vortag ausgesät. Die Zellen wurden bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde der Zellkulturüberstand verworfen, die adhärenen Zellen mit *PBS* gewaschen und 5 ml DMEM ohne Zusatz von FCS als Nährmedium auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (Kapitel 3.2.1.7) und die RNA mit Hilfe des *NucleoSpin® Isolation Kits* nach Herstellerangaben extrahiert. Von der extrahierten RNA wurde 1 µg als *Input* zur Herstellung komplementärer DNA (cDNA) verwendet. Zur Herstellung der cDNA wurde das *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.3.8. Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction

Um die endogene Expression bestimmter Proteine gezielt zu untersuchen, wurde mit der aus HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen gewonnenen cDNA (Kapitel 3.2.3.7) eine *quantitative real-time* PCR (qPCR) Analyse durchgeführt. Die qPCR wurde mit den Hydrolyse-Sonden der *Universal ProbeLibrary* (UPL) mit Hilfe des *2 x Light Cycler® 480 Probes Mastermixes* nach Herstellerangaben an einem *Light Cycler® 480 System* durchgeführt. Diese *TaqMan*- oder Hydrolyse-Sonden sind an einem Ende mit einem *Quencher* und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert. Der *Quencher* reduziert in direkter Nähe die Intensität der Fluoreszenz des Fluorophors. Durch die zusätzliche 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase wird

die Sonde im Rahmen der Amplifikation während der PCR an ihrem 5'-Ende abgebaut. Infolgedessen entfernen sich *Quencher* und Fluorophor voneinander und die dadurch steigende Fluoreszenz kann gemessen werden. Sie dient als Maß für die Menge der amplifizierten DNA. Die qPCR wurde mit den in Tabelle 25 und Tabelle 27 aufgeführten Parametern durchgeführt. In einem Kontrollansatz wurde die *Template-DNA* durch DEPC-Wasser ersetzt, siehe Tabelle 26. Die verwendeten Primer und UPL sind in Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 25: Reaktionsansatz qPCR

Bezeichnung	Charakteristik	Menge
2 x <i>Light Cycler® 480 Probes Mastermix</i>	Puffer für Hydrolyse-Sonden 2-fach konzentriert	4,5 µl
<i>Template-cDNA</i>		0,5 µl
UPL	Hydrolyse-Sonde	0,1 µl
<i>Forward Primer</i>		0,03 µl, 1 µM
<i>Reverse Primer</i>		0,03 µl, 1 µM
DEPC-Wasser	RNAse freies Wasser	4,84 µl

Tabelle 26: Kontrollansatz qPCR

Bezeichnung	Charakteristik	Menge
2 x <i>Light Cycler® 480 Probes mastermix</i>	Puffer für Hydrolyse-Sonden 2-fach konzentriert	4,5 µl
UPL	Hydrolyse-Sonde	0,1 µl
<i>Forward Primer</i>		0,03 µl, 1 µM
<i>Reverse Primer</i>		0,03 µl, 1 µM
DEPC-Wasser	RNAse freies Wasser	5,34 µl

Tabelle 27: Parameter der qPCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initialisierung	95 °C	10 Minuten	
Denaturierung	95 °C	10 Sekunden	} x 45
Amplifikation	60 °C	30 Sekunden	
Abkühlen	40 °C	30 Sekunden	
Lagerung	4 C	∞	

Tabelle 28: Primer und UPL für qPCR

Primer (UPL-Probe)	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Hersteller
ADAM8 <i>Forward Primer</i> (#48)	TGCTCCTCCGGTCACTGT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
ADAM8 <i>Reverse Primer</i> (#48)	GAACGTTGGCTTGATGACCT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Material und Methoden

<i>ADAM9 Forward Primer (#48)</i>	TCCCCCAAATTGTGAGACTAA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<i>ADAM9 Reverse Primer (#68)</i>	TCCGTCCCTCAATGCAGTAT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<i>ADAM15 Forward Primer (#48)</i>	GCCGCTCCCAAATATAGGT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<i>ADAM15 Reverse Primer (#68)</i>	ATTGGGAGATCGTCCTGAAG	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<i>GAPDH Forward Primer (#60)</i>	AGCCACATCGCTCAGACAC	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<i>GAPDH Reverse Primer (#60)</i>	GCCCAATACGACCAAATCC	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

4. Ergebnisse

Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse wurden in den Fachjournalen *International Journal of Molecular Sciences* (Sammel et al. 2019¹²⁰), *Frontiers in Molecular Biosciences* (Gellrich et al. 2021⁴⁹) und *Cellular and Molecular Life Sciences* (Scharfenberg et al. 2020¹⁸) publiziert (Kapitel 9) und werden zusammenfassend dargestellt.

4.1. Proteolytische Prozessierung des Interleukin-6 Rezeptors

Die Signaltransduktion des Zytokins IL-6 wird sowohl über den membrangebundenen IL-6R, *classic-signaling*, als auch über den gelösten sIL-6R, *trans-signaling*, induziert. Bisher wurde gezeigt, dass die Metalloproteasen ADAM10⁷⁵ und ADAM17^{73,121} sowie Meprin α^{48} und Meprin β^{48} den IL-6R durch Proteolyse von der Zelloberfläche lösen und damit IL-6 *trans-signaling* induzieren können. Es sollte die Hypothese untersucht werden ob weitere Metalloproteasen in der Lage sind den IL-6R zu *shedden* und IL-6 *trans-signaling* zu induzieren.

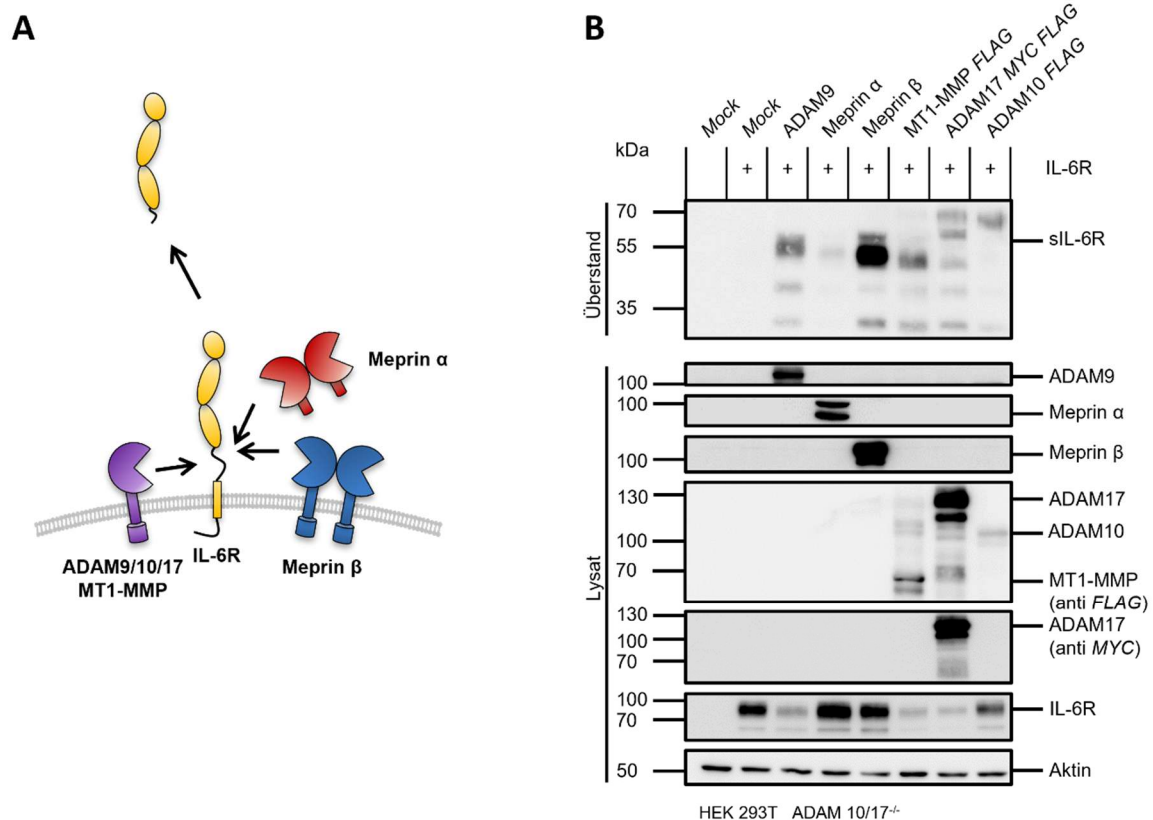
4.1.1. Der Interleukin-6 Rezeptor wird durch unterschiedliche Metalloproteasen *gesheded*

Für die folgenden Experimente wurden HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen verwendet. In diesen HEK 293T Zellen wurde mit Hilfe des *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated Proteins 9 Systems* (CRISPR/Cas9 System) jeweils das Gen für ADAM10 und ADAM17 deletiert, so dass beide Proteine nicht mehr exprimiert werden¹⁰⁹. Dieses Zellsystem schließt ein endogenes *shedding* des IL-6R durch die bereits charakterisierten *sheddasen* ADAM10 und ADAM17 aus. Mittels transienter Transfektion (Kapitel 3.2.1.4) wurde der IL-6R zusammen mit unterschiedlichen Metalloproteasen in HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen überexprimiert. Der Zellkulturüberstand wurde anschließend per SDS-PAGE (Kapitel 3.2.3.4) und *Western-Blot* (Kapitel 3.2.3.4) auf das Vorhandensein von sIL-6R untersucht. Im Lysat der Zellen wurden die überexprimierten Proteine als

Ergebnisse

Expressionskontrolle, sowie endogen exprimiertes Aktin als Ladekontrolle nachgewiesen.

Wie erwartet konnte mehr sIL-6R im Zellkulturüberstand der Cotransfektion mit ADAM10, ADAM17, Meprin α und Meprin β nachgewiesen werden als in der Cotransfektion mit der Leervektorkontrolle (*Mock*). Jedoch zeigte sich auch eine Erhöhung der sIL-6R Menge in der Cotransfektion mit ADAM9 und MT1-MMP (Abbildung 6 **B**). Dadurch wurde gezeigt, dass ADAM9 und MT1-MMP in der Lage sind den IL-6R zu *shedden* (Abbildung 6 **A**).



Modifiziert nach Sammel et al., 2019

Abbildung 6: Der IL-6R wird durch unterschiedliche Proteasen *geshедdet*

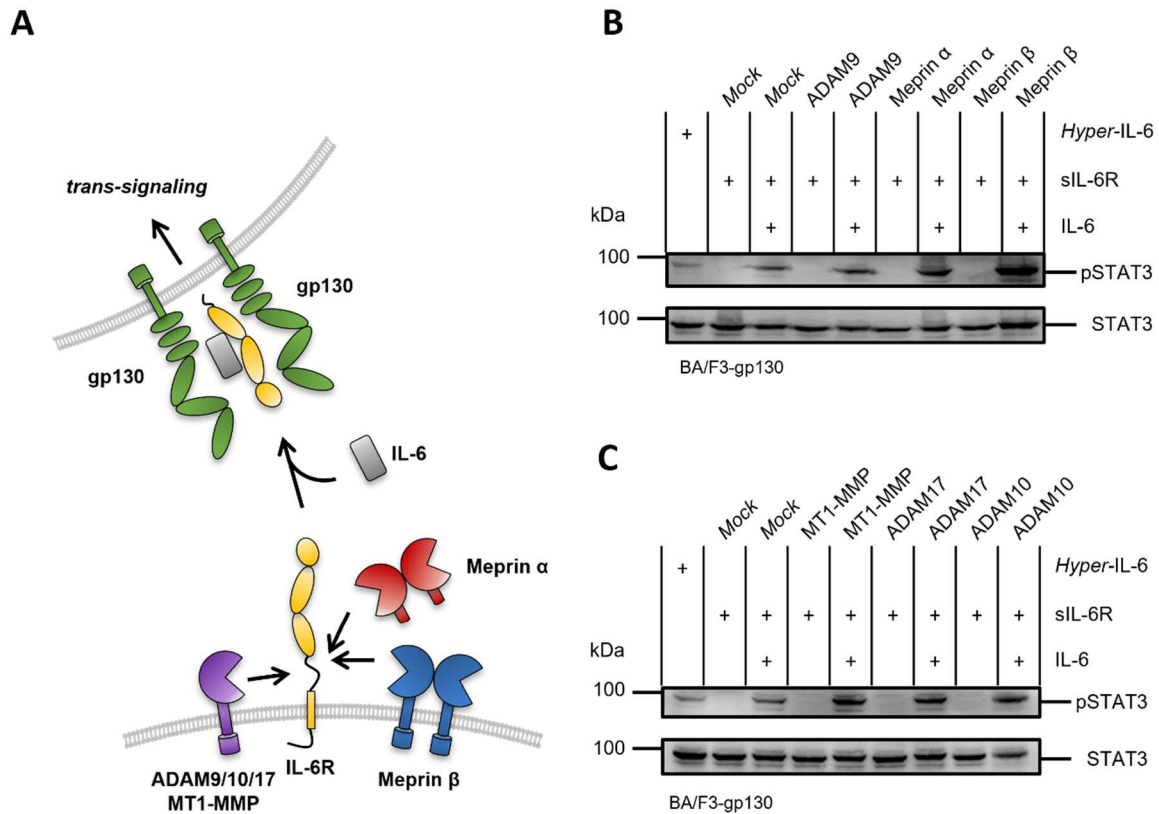
A: Schematische Darstellung des *sheddings* des IL-6R durch Metalloproteasen. **B:** HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden nach dem dargestellten Schema transient transfiziert. pcDNA 3.1 diente als Leervektorkontrolle (*Mock*). Die Überstände wurden anhand der Lysate mittels BCA-Assay normalisiert. Die Lysate und Überstände wurden durch einen Immunoblot analysiert. In den Lysaten wurde die Expression von ADAM9, Meprin α , Meprin β und IL-6R mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Der Antikörper für

IL-6R besitzt eine Bindungsstelle für die D1-Region und kann so auch sIL-6R im Überstand detektieren. Die Expression von ADAM10 und MT1-MMP wurde mit einem Antikörper gegen *FLAG-Tag* nachgewiesen, die Expression von ADAM17 mittels *FLAG-* und *MYC-Tag*. Endogen exprimiertes Aktin diente als Ladekontrolle.

4.1.2. Durch Metalloproteasen *geshreddeter* Interleukin-6 Rezeptor induziert *trans-signaling*

Es wurde der durch Proteolyse von der Zelloberfläche gelöste sIL-6R auf biologische Aktivität untersucht. Dazu wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit dem konditionierten Überstand aus dem Cotransfektionsexperiment (Kapitel 4.1.1) und rekombinantem IL-6 behandelt (Kapitel 3.2.1.8). Diese Zellen sind genetisch so verändert, dass sie gp130 überexprimieren. Das rekombinante IL-6 bindet an den durch Proteolyse gelösten sIL-6R. Dieser Komplex induziert die Dimerisierung von zwei gp130 Molekülen auf der Zelloberfläche der Ba/F3-gp130 Zellen und damit die Aktivierung der Zellen durch IL-6 *trans-signaling* (Kapitel 1.6.2). Dies lässt sich durch die Phosphorylierung von STAT3 im Lysat der Zellen nachweisen. Die Zugabe von *Hyper-IL-6* diente als Positivkontrolle. In der Negativkontrolle wurde kein IL-6 zugegeben.

Wie erwartet konnte eine Phosphorylierung von STAT3 mit dem Zellkulturüberstand aus der Cotransfektion mit ADAM10, ADAM17, Meprin α und Meprin β nachgewiesen werden (Abbildung 7 **B** und **C**). Eine Phosphorylierung konnte ebenfalls in der Cotransfektion mit ADAM9 (Abbildung 7 **B**) und MT1-MMP (Abbildung 7 **C**) nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass ADAM9 und MT1-MMP ebenfalls in der Lage sind IL-6 *trans-signaling* zu induzieren (Abbildung 7 **A**).



Modifiziert nach Sammel et al., 2019

Abbildung 7: Gesheddeter IL-6R induziert *trans-signaling*

A: Schematische Darstellung des *sheddings* des IL-6R durch Metalloproteasen und Induktion des *trans-signaling*s. **B:** STAT3-Phosphorylierung in Ba/F3-gp130 Zellen. Die Zellen wurden mit den Überständen aus Kapitel 4.1.1 und rekombinantem IL-6 behandelt. *Hyper-IL-6*, ein Fusionsprotein aus löslichem IL-6R und IL-6 diente als Positivkontrolle. Die Leerkontrolle (*Mock*) aus Kapitel 4.1.1 diente als Negativkontrolle. Die Phosphorylierung aus der Cotransfektion mit ADAM9, Meprin α und Meprin β wurde im Lysat mit Hilfe eines Antikörpers gegen phosphoryliertes STAT3 (pSTAT3) nachgewiesen. STAT3 diente als Ladekontrolle. **C:** Gleicher Aufbau des Experimentes wie in **B** jedoch mit den Überständen aus der Cotransfektion mit MT1-MMP, ADAM17 und ADAM10.

4.1.3. Die melanomassoziierten Meprin β Varianten G45R und G89R *shedden* den Interleukin-6 Rezeptor unterschiedlich effektiv

Es wurde untersucht in welchem Ausmaß sich die melanomassoziierten Mutationen G45R und G89R von Meprin β auf das *shedding* des IL-6R auswirken.

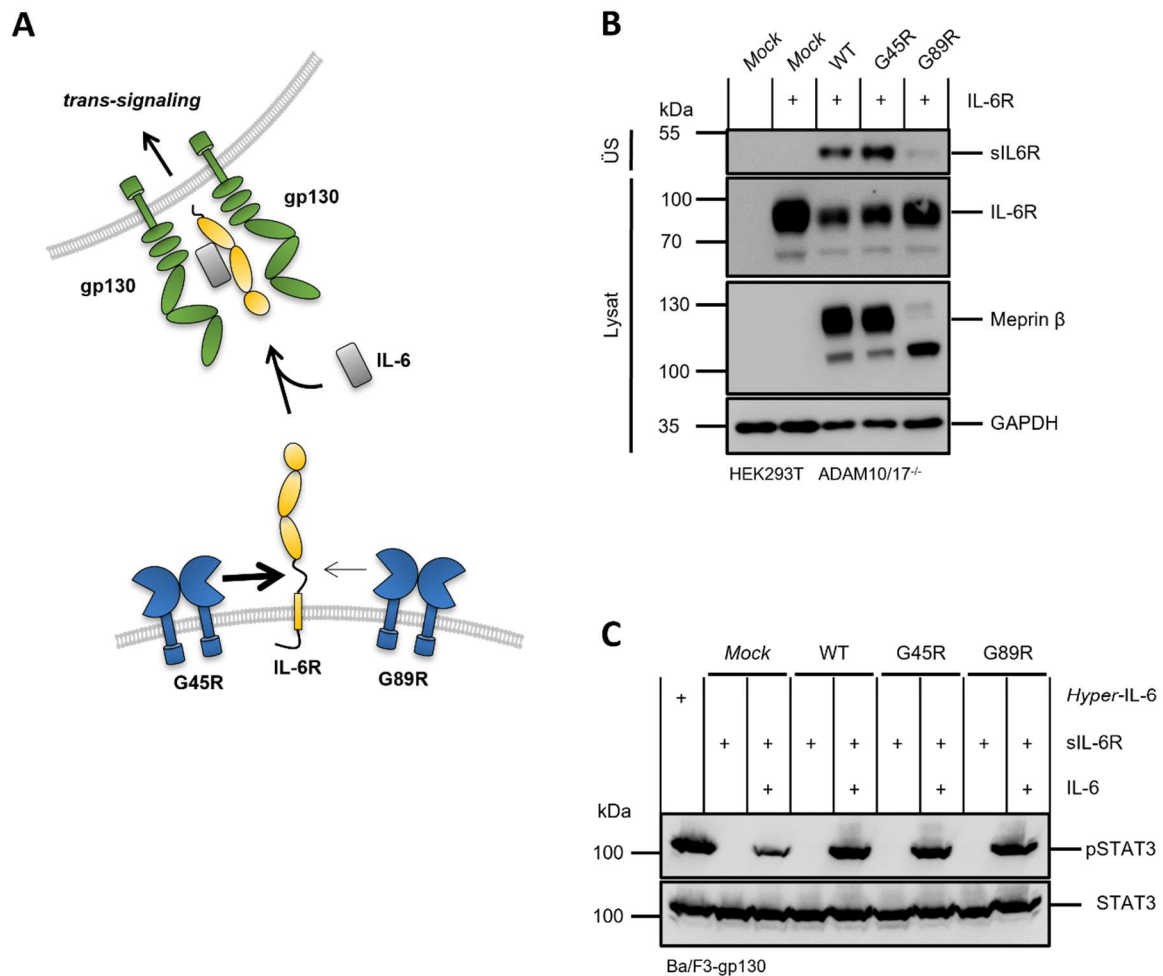
Ergebnisse

Durch den Austausch von Glycin zu Arginin an Position 45 verfügt Meprin β G45R über eine weitere potenzielle Spaltstelle im Propeptid. Da die Abspaltung des Propeptids C-terminal des Arginins an Position 61 stattfindet³¹, konnte angenommen werden, dass ein weiteres Arginin in direkter Nähe zu dieser Spaltstelle die Aktivierung verstärken würde. Meprin β G89R verfügt über ein zusätzliches Arginin in der katalytischen Domäne, das die korrekte Faltung des Proteins behindern könnte. Analog zum vorherigen experimentellen Ansatz (Kapitel 4.1.1 und 4.1.2) wurde der IL-6R mit Meprin β G45R (G45R) und Meprin β G89R (G89R) sowie Meprin β Wildtyp (WT) in HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen überexprimiert. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente als Ladekontrolle. Anschließend wurde die biologische Aktivität des sIL-6R in Ba/F3-gp130 Zellen überprüft.

In der Cotransfektion mit Meprin β G45R konnte im Vergleich zum Wildtyp deutlich mehr, bei Meprin β G89R weniger sIL-6R im Zellkulturüberstand (ÜS) nachgewiesen werden (Abbildung 8 **B**).

Eine Phosphorylierung von STAT3 konnte mit dem Zellkulturüberstand aus der Cotransfektion mit Meprin β Wildtyp sowie den beiden Varianten G45R und G89R induziert werden (Abbildung 8 **C**).

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass Meprin β G45R den IL-6R deutlich effektiver, die G89R Variante hingegen in deutlich geringerem Ausmaß *sheddet*. Beide Proteasen sind in der Lage IL-6 *trans-signaling* zu induzieren (Abbildung 8 **A**).



Modifiziert nach Gellrich et al., 2021

Abbildung 8: *Shedding* des IL-6R durch melanomassoziierte Varianten von Meprin β

A: Schematische Darstellung des *sheddings* des IL-6R durch Meprin β G45R und Meprin β G89R. **B:** HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden nach dem dargestellten Schema transient transfiziert. pcDNA 3.1 diente als Leervektorkontrolle (*Mock*). Die Überstände wurden anhand der Lysate mittels *BCA*-Assay normalisiert. Die Lysate und Überstände wurden durch einen Immunoblot analysiert. Der Antikörper für IL-6R besitzt eine Bindungsstelle für die D1-Region und kann so auch sIL-6R im Überstand detektieren. Endogen exprimiertes GAPDH diente als Ladekontrolle. **C:** STAT3-Phosphorylierung in Ba/F3-gp130 Zellen. Die Zellen wurden mit den Überständen aus **B** und rekombinantem IL-6 behandelt. *Hyper*-IL-6, ein Fusionsprotein aus löslichem IL-6R und IL-6 diente als Positivkontrolle. Die Leerkontrolle (*Mock*) aus **B** diente als Negativkontrolle. Die Phosphorylierung wurde im Lysat mit Hilfe eines Antikörpers gegen phosphoryliertes STAT3 (pSTAT3) nachgewiesen. STAT3 diente als Ladekontrolle.

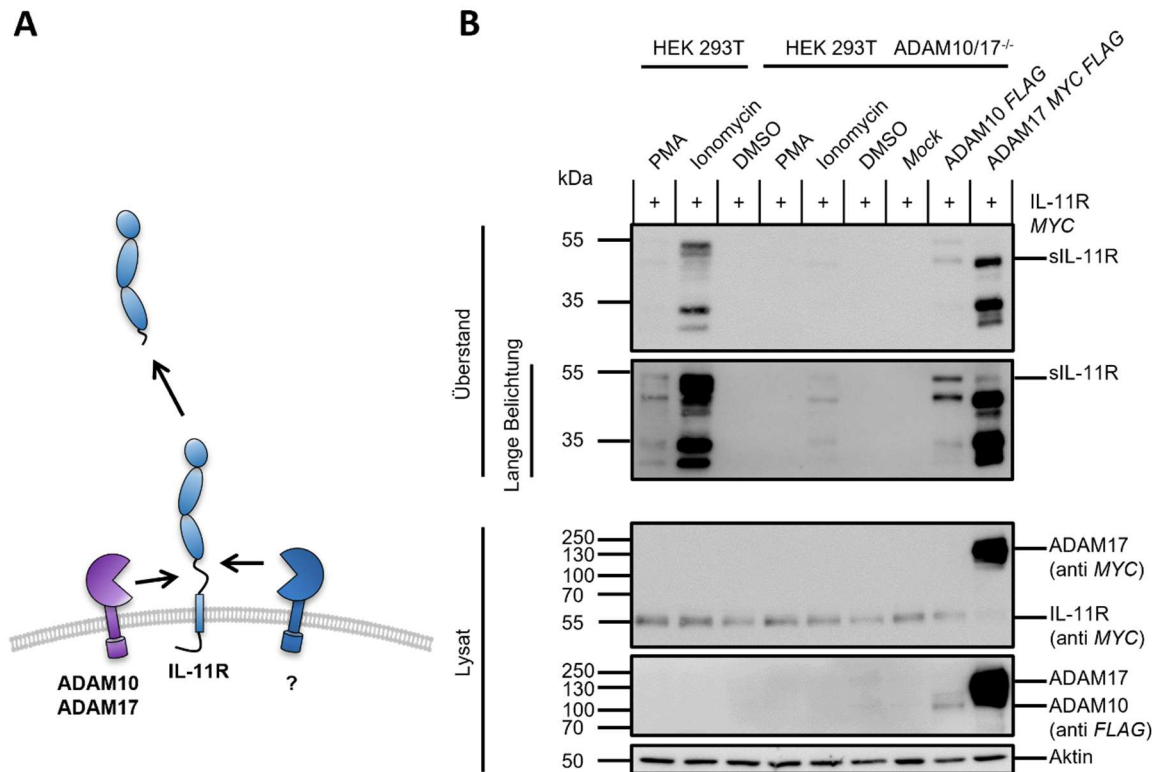
4.2. Proteolytische Prozessierung des Interleukin-11 Rezeptors

Analog zu IL-6 wird die Signaltransduktion des Zytokins IL-11 sowohl über den membrangebundenen IL-11R, *classic-signaling*, als auch über einen löslichen sIL-11R, *trans-signaling*, induziert⁹⁴. ADAM10⁹⁴, sowie die Serinproteasen Neutrophile-Elastase und Proteinase 3⁹⁴ und die Rhomboid-Protease RHBDL2⁹⁵ sind bereits als sheddasen des IL-11R und damit als Induktoren des IL-11 *trans-signaling*s beschrieben. Es sollte untersucht werden ob noch weitere Proteasen in der Lage sind den IL-11R zu *shedden* und IL-11 *trans-signaling* zu induzieren.

4.2.1. ADAM10 und ADAM17 sind in der Lage den Interleukin-11 Rezeptor zu *shedden*

Um das *shedding* des IL-11R durch ADAM10 und ADAM17 zu untersuchen wurden ADAM10 und ADAM17 jeweils mit dem IL-11R in HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen überexprimiert (Kapitel 4.2.3). Ebenfalls wurde der IL-11R in HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen sowie in HEK 293T Zellen überexprimiert und die Zellen anschließend mit Ionomycin oder PMA stimuliert. Ionomycin induziert die Aktivität von endogenem ADAM10 durch einen Einstrom von Calcium in die Zelle¹²². PMA aktiviert die Proteinkinase C und induziert dadurch unter anderem die Aktivität von ADAM17¹²¹. Eine Behandlung mit DMSO als Kontrollexperiment.

Die Stimulation mit PMA steigerte das *shedding* des IL-11R in HEK 293T Zellen geringfügig und in HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen überhaupt nicht. Durch eine Stimulation mit Ionomycin wurde das *shedding* des IL-11R in HEK 293T Zellen deutlich gesteigert. Dieses Ergebnis legt nahe, dass das *shedding* des IL-11R in HEK 293T Zellen hauptsächlich durch ADAM10 erfolgt. Eine Retransfektion der HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen mit für ADAM10 beziehungsweise ADAM17 kodierender cDNA führte zum *shedding* des IL-11R. Jedoch wurde durch Stimulation mit Ionomycin das *shedding* des IL-11R in HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen auch geringfügig gesteigert, ohne dass eine der beiden Proteasen in das Zellsystem retransfiziert wurde (Abbildung 9 **B**). Dies zeigt, dass sowohl ADAM10 als auch ADAM17 in der Lage sind den IL11R zu *shedden*. Weiterhin deutet dies darauf hin, dass weitere Proteasen in der Lage sind den IL-11R zu *shedden* (Abbildung 9 **A**).



Modifiziert nach Sammel et al., 2019

Abbildung 9: *Shedding* des IL-11R durch ADAM10 und ADAM17

A: Schematische Darstellung des *sheddings* des IL-11R durch Metalloproteasen. **B:** HEK 293T Wildtyp Zellen (Spalten 1-3) und HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen (Spalten 4-6) wurden mit IL-11R transfiziert und mit PMA oder Ionomycin stimuliert. DMSO diente als Negativkontrolle. HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen (Spalten 7-9) wurden mit IL-11R und ADAM10 oder ADAM17 cotransfiziert. pcDNA 3.1 diente als Leervektorkontrolle (*Mock*). Die Lysate und Überstände wurden durch einen Immunoblot analysiert. Die Expression von *FLAG-Tag* markiertem ADAM10, *MYC-Tag* markiertem IL-11R und *FLAG/MYC-Tag* markiertem ADAM17 wurden jeweils mit Antikörpern gegen *FLAG-Tag* oder *MYC-Tag* nachgewiesen. Durch den N-terminal gelegenen *MYC-Tag* konnte auch gelöster IL-11R (sIL-11R) im Überstand durch einen Antikörper gegen *MYC-Tag* nachgewiesen werden. Endogen exprimiertes Aktin diente als Ladekontrolle.

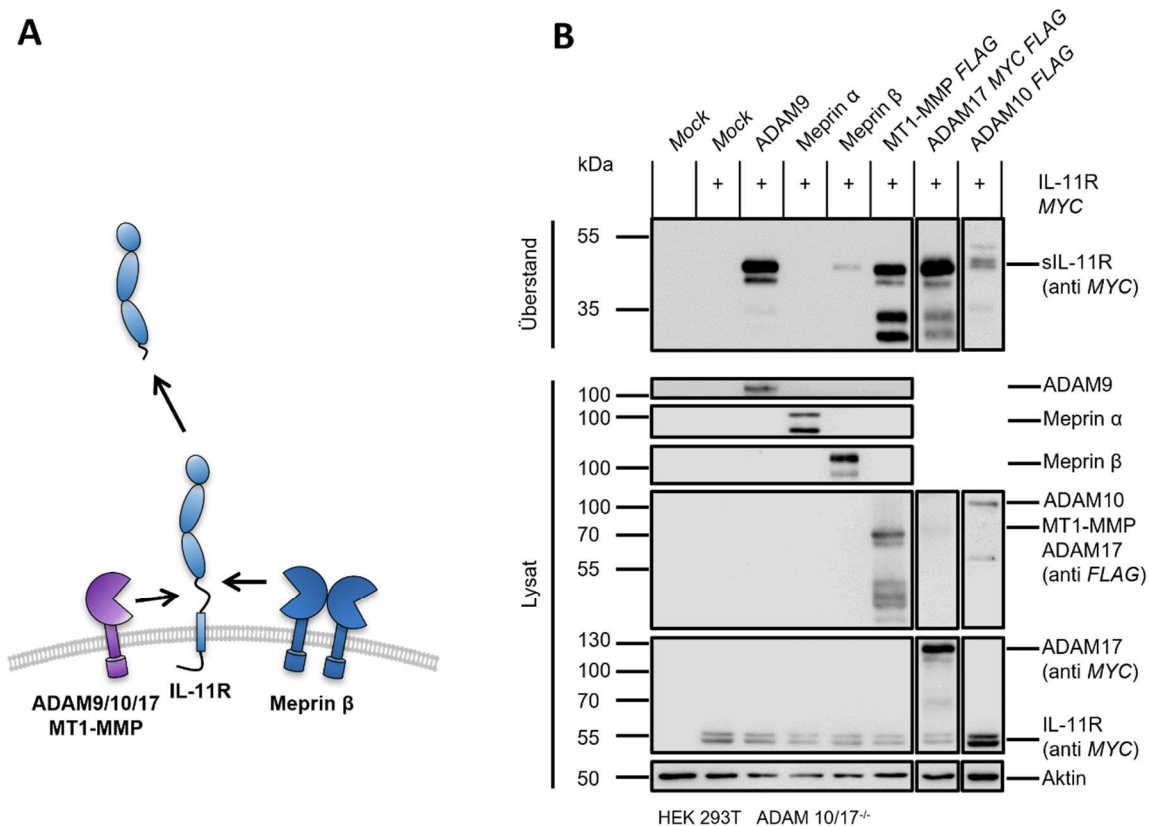
4.2.2. Der Interleukin-11 Rezeptor wird durch unterschiedliche Metalloproteasen *geshededet*

Analog zum experimentellen Ansatz zum *shedding* des IL-6R (Kapitel 4.1) wurde in diesem Ansatz der IL-11R zusammen mit unterschiedlichen Metalloproteasen in

Ergebnisse

HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen überexprimiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand auf das Vorhandensein von sIL-11R untersucht. Wie erwartet konnte im Zellkulturüberstand der Cotransfektion mit ADAM10 sIL-11R nachgewiesen werden. Zudem konnte sIL-11R im Zellkulturüberstand der Cotransfektion mit ADAM9, Meprin β und MT1-MMP nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte sIL-11R im Zellkulturüberstand der Cotransfektion mit ADAM17 nachgewiesen werden (Abbildung 10 **B**).

Dadurch wurde gezeigt, dass neben ADAM10⁹⁴ auch ADAM9, Meprin β , MT1-MMP und ADAM17 in der Lage sind den IL-11R zu *shedden* (Abbildung 10 **A**).



Modifiziert nach Sammel et al., 2019

Abbildung 10: Der IL-11R wird durch unterschiedliche Proteasen *gesheddet*

A: Schematische Darstellung des *sheddings* des IL-11R durch Metalloproteasen. **B:** HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden nach dem dargestellten Schema transient transfiziert. pcDNA 3.1 diente als Leervektorkontrolle (*Mock*). Die Überstände wurden anhand der Lysate mittels *BCA*-Assay normalisiert. Die Lysate und Überstände wurden durch einen Immunoblot analysiert. In den Lysaten wurde die Expression von ADAM9, Meprin α und Meprin β mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Expression von ADAM10 und MT1-MMP wurde mit einem Antikörper gegen *FLAG-Tag* nachgewiesen, die

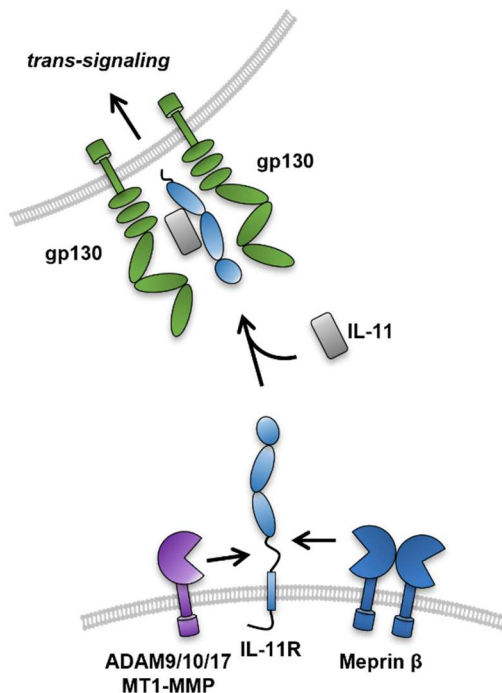
Ergebnisse

Expression von ADAM17 mittels *FLAG*- und *MYC-Tag*. Über den N-terminalen *MYC-Tag* wurde IL-11R sowohl im Lysat als auch im Überstand mit einem Antikörper gegen *MYC-Tag* nachgewiesen. Endogen exprimiertes Aktin diene als Ladekontrolle.

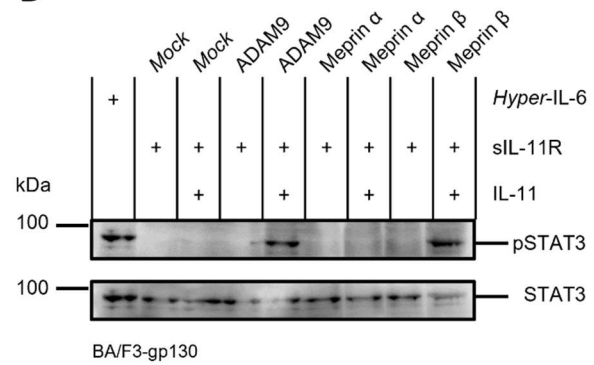
4.2.3. Durch Metalloproteasen *gesheddeter* Interleukin-11 Rezeptor induziert *trans-signaling*

Analog zum experimentellen Ansatz zum Nachweis der biologischen Aktivität des sIL-6R (Kapitel 4.1.2) wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit konditioniertem Überstand aus dem Cotransfektionsexperiment (Kapitel 4.2.2) und rekombinantem IL-11 behandelt. *Hyper-IL-6* diene als Positivkontrolle. Wie erwartet konnte mit dem Zellkulturüberstand der Cotransfektion mit ADAM10 eine Phosphorylierung von STAT3 induziert werden. Ebenfalls konnte mit den Zellkulturüberständen der Cotransfektion mit ADAM9, Meprin β , MT1-MMP und ADAM17 eine Phosphorylierung von STAT3 induziert werden (Abbildung 11 **B** und **C**). Dadurch konnte gezeigt werden, dass alle der genannten Proteasen in der Lage sind IL-11 *trans-signaling* zu induzieren (Abbildung 11 **A**).

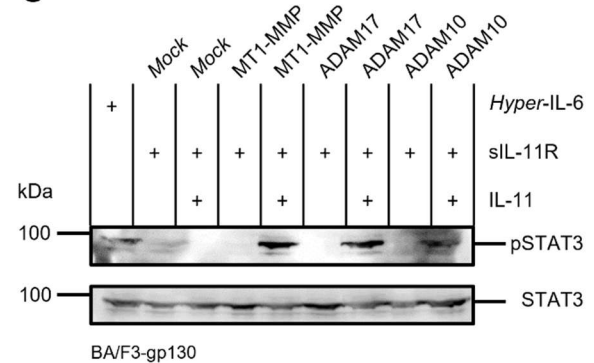
A



B



C



Modifiziert nach Sammel et al., 2019

Abbildung 11: Gesheddeter IL-11R induziert *trans-signaling*

A: Schematische Darstellung des *sheddings* des IL-11R durch Metalloproteasen und Induktion des *trans-signaling*s. **B:** STAT3-Phosphorylierung in Ba/F3-gp130 Zellen. Die Zellen wurden mit den Überständen aus Kapitel 4.2.2 und rekombinantem IL-11 behandelt. Hyper-IL-6, ein Fusionsprotein aus löslichem IL-6R und IL-6 diente als Positivkontrolle. Die Leerkontrolle (*Mock*) aus Kapitel 4.2.2 diente als Negativkontrolle. Die Phosphorylierung aus der Cotransfektion mit ADAM9, Meprin α und Meprin β wurde im Lysat mit Hilfe eines Antikörpers gegen phosphoryliertes STAT3 (pSTAT3) nachgewiesen. STAT3 diente als Ladekontrolle. **C:** Gleicher Aufbau des Experimentes wie in **B** jedoch mit den Überständen aus der Cotransfektion mit MT1-MMP, ADAM17 und ADAM10.

4.2.4. Arginin 355 ist nicht essenziell für das *shedding* des Interleukin-11 Rezeptors

Arginin an Position 355 wurde aufgrund seiner Position in der *stalk region* und der Spezifität von ADAM10 für diese Aminosäure, als essenziell für das ADAM10

Ergebnisse

vermittelte *shedding* des IL-11R beschrieben⁹⁴. Es sollte untersucht werden, ob das Arginin an Position 355 der *stalk region* des IL-11R auch essenziell für das *shedding* durch die anderen identifizierten *sheddasen* des Rezeptors ist. Um dieser Frage nachzugehen wurde der bereits beschriebene experimentelle Ansatz aus Cotransfektion (Kapitel 4.2.2) des Rezeptors und der unterschiedlichen Proteasen mit nachfolgender Überprüfung der biologischen Aktivität (Kapitel 4.2.3) mit der Deletionsvariante IL-11R Δ 353 durchgeführt. In dieser Variante ist der Abschnitt von Histidin an Position 353 bis Serin an Position 362 deletiert (Abbildung 12). Die Cotransfektion der Deletionsvariante IL-11R Δ 353 mit ADAM9, Meprin β , MT1-MMP, ADAM17 und ADAM10 führte zum *shedding* von IL-11R Δ 353 (Abbildung 13 **B**). Ebenfalls war sIL-11R Δ 353 biologisch aktiv (Abbildung 13 **C** und **D**). Diese Ergebnisse zeigen, dass zumindest in der Überexpression Arginin an Position 355 der *stalk region* des IL-11R keine essenzielle Rolle für das *shedding* hat (Abbildung 13 **A**).

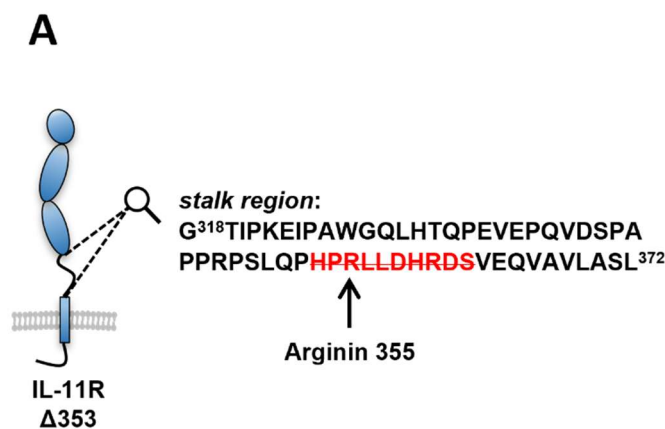
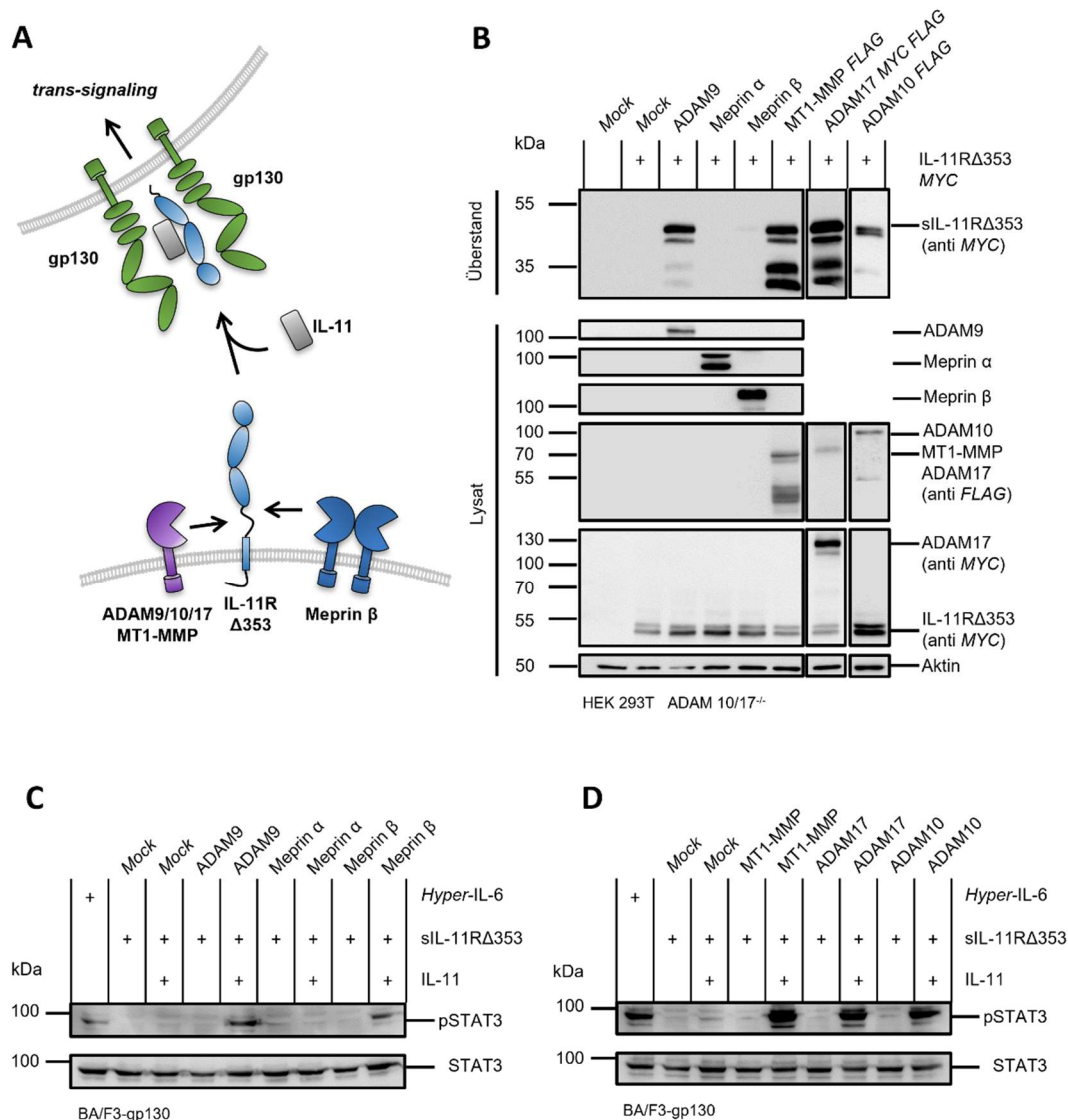


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Variante Δ 353 des IL-11R

Die Aminosäuren Histidin 353 bis Serin 362, und damit das Arginin an Position 355, wurden aus der *stalk region* des IL-11R deletiert.



Modifiziert nach Sammel et al., 2019

Abbildung 13: Die Variante Δ353 des IL-11R wird durch unterschiedliche Proteasen gescheddert

A: Schematische Darstellung des *sheddings* des IL-11RΔ353 durch Metalloproteasen. **B:** HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden nach dem dargestellten Schema transient transfiziert. pcDNA 3.1 diente als Leervektorkontrolle (*Mock*). Die Überstände wurden anhand der Lysate mittels *BCA-Assay* normalisiert. Die Lysate und Überstände wurden durch einen Immunoblot analysiert. In den Lysaten wurde die Expression von ADAM9, Meprin α und Meprin β mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Expression von ADAM10 und MT1-MMP wurde mit einem Antikörper gegen *FLAG-Tag* nachgewiesen, die Expression von ADAM17 mittels *FLAG-* und *MYC-Tag*. Über den N-terminalen *MYC-Tag* wurde IL-11RΔ353 sowohl im Lysat als auch im Überstand mit einem Antikörper gegen *MYC-Tag* nachgewiesen. Endogen exprimiertes Aktin diente als Ladekontrolle. **C:** STAT3-Phosphorylierung in Ba/F3-gp130 Zellen. Die Zellen wurden mit den Überständen aus **B** und

Ergebnisse

rekombinantem IL-11 behandelt. *Hyper*-IL-6, ein Fusionsprotein aus löslichem IL-6R und IL-6 diente als Positivkontrolle. Die Leerkontrolle (*Mock*) aus **B** diente als Negativkontrolle. Die Phosphorylierung aus der Cotransfektion mit ADAM9, Meprin α und Meprin β wurde im Lysat mit Hilfe eines Antikörpers gegen phosphoryliertes STAT3 nachgewiesen. STAT3 diente als Ladekontrolle. **D**: Gleicher Aufbau des Experimentes wie in **C** jedoch mit den Überständen aus der Kotransfektion mit MT1-MMP, ADAM17 und ADAM10.

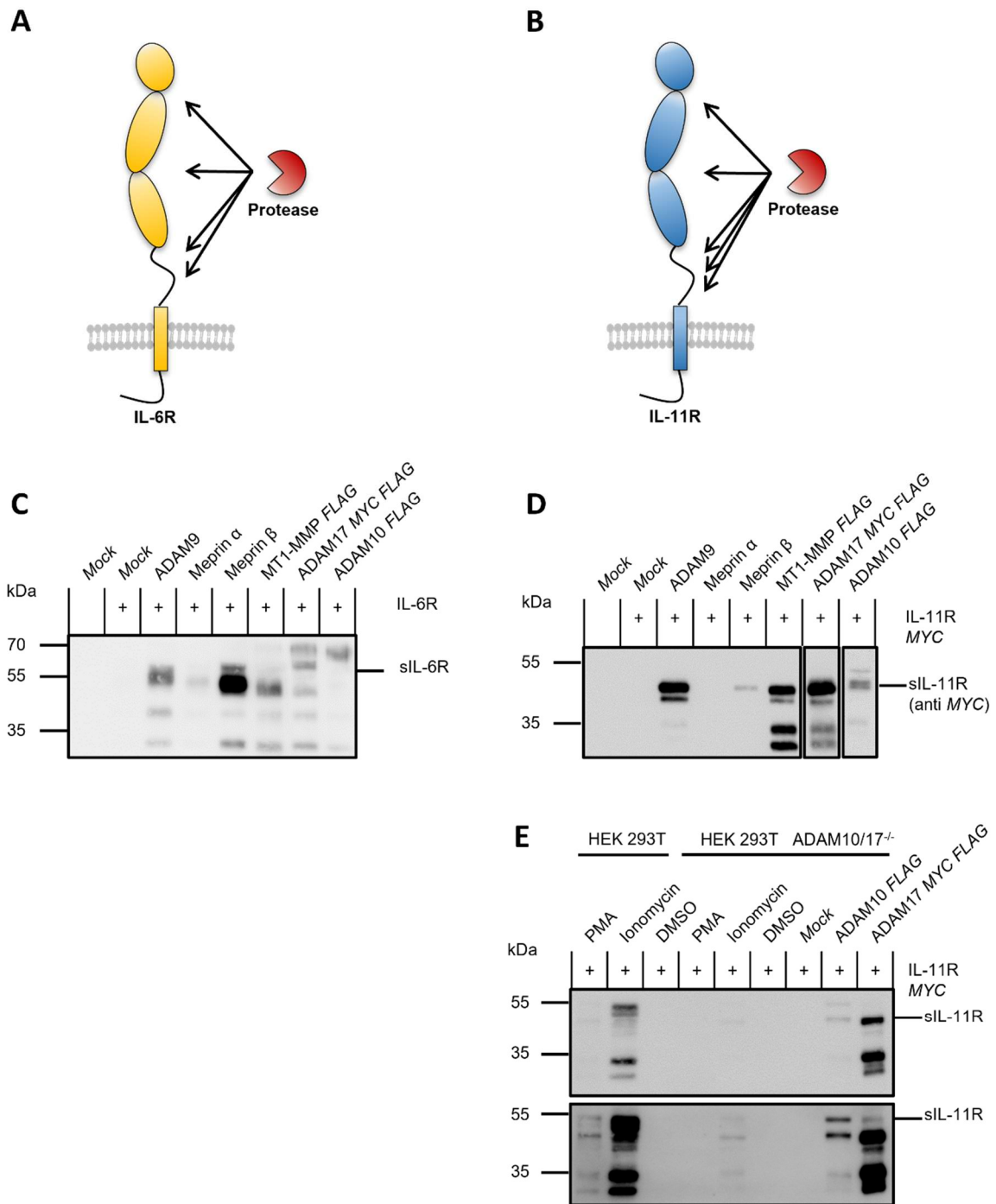
4.3. Proteolytische Prozessierung des Interleukin-6 Rezeptors und des Interleukin-11 Rezeptors findet auch außerhalb der *stalk region* statt

Die Ergebnisse der Cotransfektionsexperimente (Kapitel 4.1.1 und 4.2.2) zeigen, dass der Rezeptor von IL-6 sowie der von IL-11 an mehreren Stellen proteolytisch gespalten werden kann. Im Überstand der Cotransfektion des IL-6R mit ADAM10 und ADAM17 wird ein Fragment mit einem Molekulargewicht von 70 Kilodalton (kDa) detektiert. In der Cotransfektion mit ADAM9, Meprin α , Meprin β , MT1-MMP und ADAM17 wird ein Fragment von etwa 50 kDa detektiert (Abbildung 14 **C**). Diese Ergebnisse zeigen, dass der IL-6R an mindestens zwei Stellen in der *stalk region* gespalten wird (Abbildung 14 **A**). Weiterhin können in der Cotransfektion mit ADAM9, Meprin β , MT1-MMP, ADAM10 und ADAM17 Spaltprodukte bei 30 kDa und 40 kDa detektiert werden (Abbildung 14 **C**). Da der verwendete Antikörper gegen die D-1 Region des IL-6R gerichtet ist, spricht dieses Ergebnis für eine Spaltung des Rezeptors in den Linkerregionen zwischen den Domänen D3 und D2, sowie D2 und D1 (Abbildung 14 **A**).

Sowohl in der Stimulation von endogenem ADAM10 und ADAM17 in HEK 293T Zellen (Kapitel 4.2.1) als auch bei der Transfektion der unterschiedlichen Proteasen in HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen (4.2.2) zeigt sich ein charakteristisches Bandenmuster. Im Bereich zwischen 35 kDa und 55 kDa können in der Cotransfektion mit ADAM9, MT1-MMP und ADAM17 zwei Fragmente detektiert werden. In der Cotransfektion mit Meprin β entsteht nur das größere der beiden Fragmente. In der Cotransfektion mit ADAM10 ist ein zusätzliches Fragment bei 55 kDa erkennbar (Abbildung 14 **D**). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass auch der IL-11R an mindestens drei Stellen in der *stalk region* gespalten wird (Abbildung 14 **B**).

Ergebnisse

Ein vergleichbares Ergebnis ist auch im Stimulationsexperiment erkennbar. Die Stimulation mit Ionomycin führt zu einem diffusen Bandenmuster zwischen 35 und 55 kDa mit einem überwiegenden Fragment von 55 kDa, das auch bei der Retransfektion von ADAM10 auftritt und daher wahrscheinlich die Aktivierung dieser Protease widerspiegelt. Die Stimulation mit PMA hat, vergleichbar mit dem Cotransfektionsexperiment, zwei Fragmente zwischen 35 kDa und 55 kDa zur Folge (Abbildung 14 **E**). Im Stimulationsexperiment sowie in der Cotransfektion mit ADAM9, MT1-MMP und ADAM17 können Fragmente von 35 kDa und etwa 30 kDa detektiert werden. In der Cotransfektion mit Meprin β entsteht ebenfalls das 35 kDa Fragment (Abbildung 14 **D** und **E**). Analog zur Spaltung des IL-6R spricht dieses Ergebnis für eine Spaltung des IL-11R in den Linkerregionen zwischen den Domänen D1 und D3 (Abbildung 14 **B**).



Modifiziert nach Sammel et al., 2019

Abbildung 14: Proteolytische Prozessierung von Interleukin-Rezeptoren außerhalb der stalk region

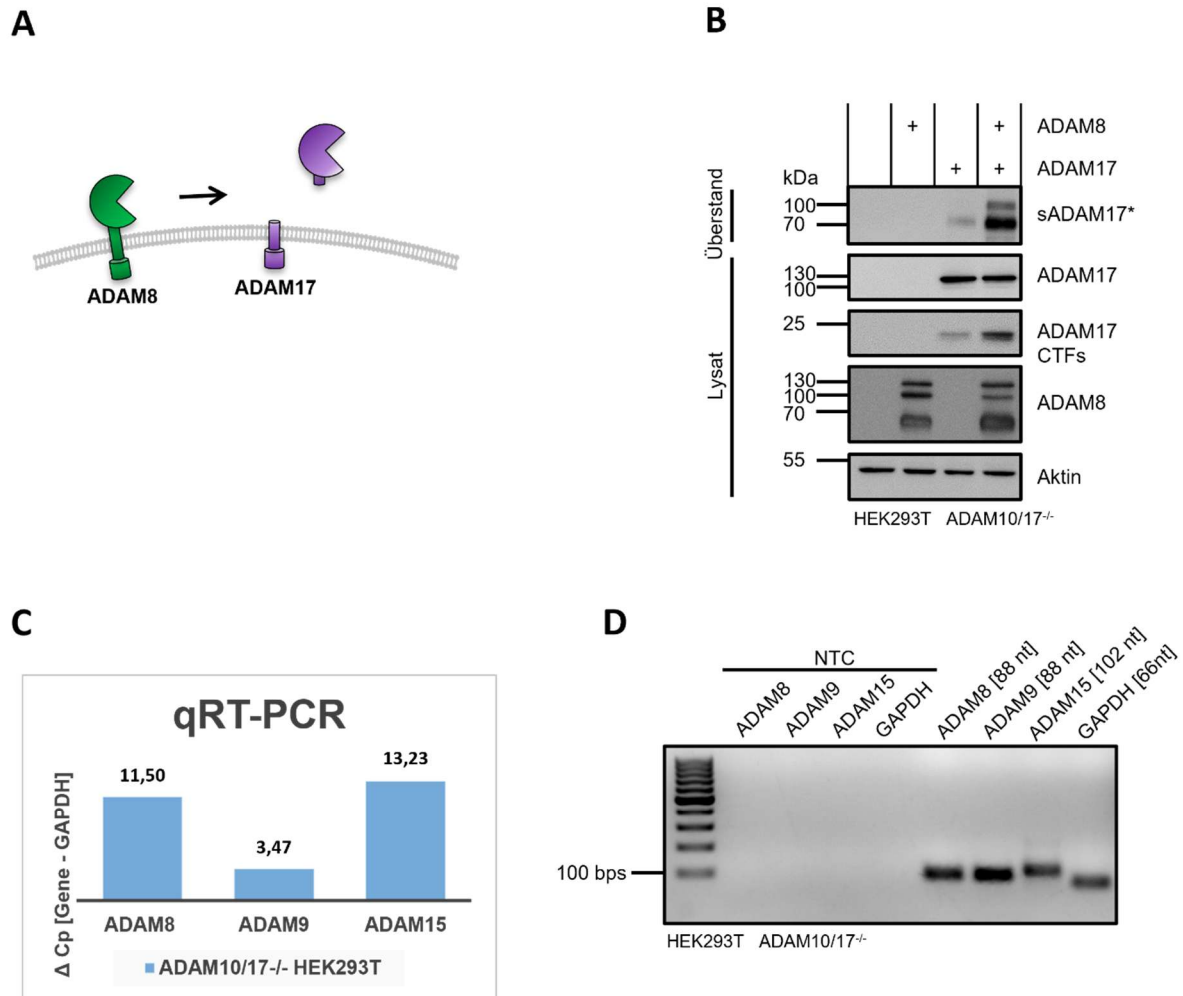
A/B: Schematische Darstellung des *sheddings* der Interleukin-Rezeptoren innerhalb der *stalk region* und in den Linkerregionen zwischen D3 und D2 sowie D2 und D1. **C/D:** Überstände aus den Cotransfektionsexperimenten (Kapitel 4.1.1 und 4.2.2). **E:** Überstände aus dem Stimulationsexperiment (Kapitel 4.2.1).

4.4. ADAM17 wird durch ADAM8 *gesheddet*

Es sollte die Hypothese untersucht werden, ob membrangebundenes ADAM17 durch ADAM8 *gesheddet* wird.

In vorangegangenen Studien wurde mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems eine ADAM8-*knockout* Zelllinie generiert und diese mit einem kommerziell erhältlichen *receptor array Kit* auf die Freisetzung von Zelloberflächen-Rezeptoren untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Menge von *soluble* ADAM17 (sADAM17) im Zellkulturüberstand der MDA-MB-231 Zellen mit ADAM8-*knockout* im Vergleich zur Wildtyp-Zelllinie deutlich reduziert war. Eine Coimmunpräzipitation von ADAM8 und ADAM17 in mit ADAM8 und ADAM17 transient transfizierten MDA-MB-231 Zellen zeigte außerdem eine direkte Protein-Protein-Interaktion¹⁸.

Um das *shedding* von ADAM8 durch ADAM17 näher zu untersuchen, wurde ADAM8 zusammen mit ADAM17 in HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen überexprimiert. Bereits in der Einzeltransfektion von ADAM17 kann sADAM17 im Zellkulturüberstand detektiert werden. Gleichzeitig können C-terminale Fragmente (CTF) im Lysat nachgewiesen werden (Abbildung 15 **B**). Beides spricht für ein *shedding* von ADAM17 durch endogene Proteasen in den verwendeten Zellen (Abbildung 15 **A**). Durch qPCR konnte die endogene Expression von ADAM8 in HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 15 **C** und **D**). Diese könnte als endogene Protease für das *shedding* von ADAM17 in der Einzeltransfektion verantwortlich sein. In der Cotransfektion mit ADAM8 wurde mehr sADAM17 im Zellkulturüberstand sowie eine stärkere Akkumulation der CTF im Lysat detektiert (Abbildung 15 **B**). Dies spricht dafür, dass ADAM17 durch ADAM8 *gesheddet* wird (Abbildung 15 **A**).



Modifiziert nach Scharfenberg et al., 2020

Abbildung 15: ADAM17 wird durch ADAM8 *geshededet*

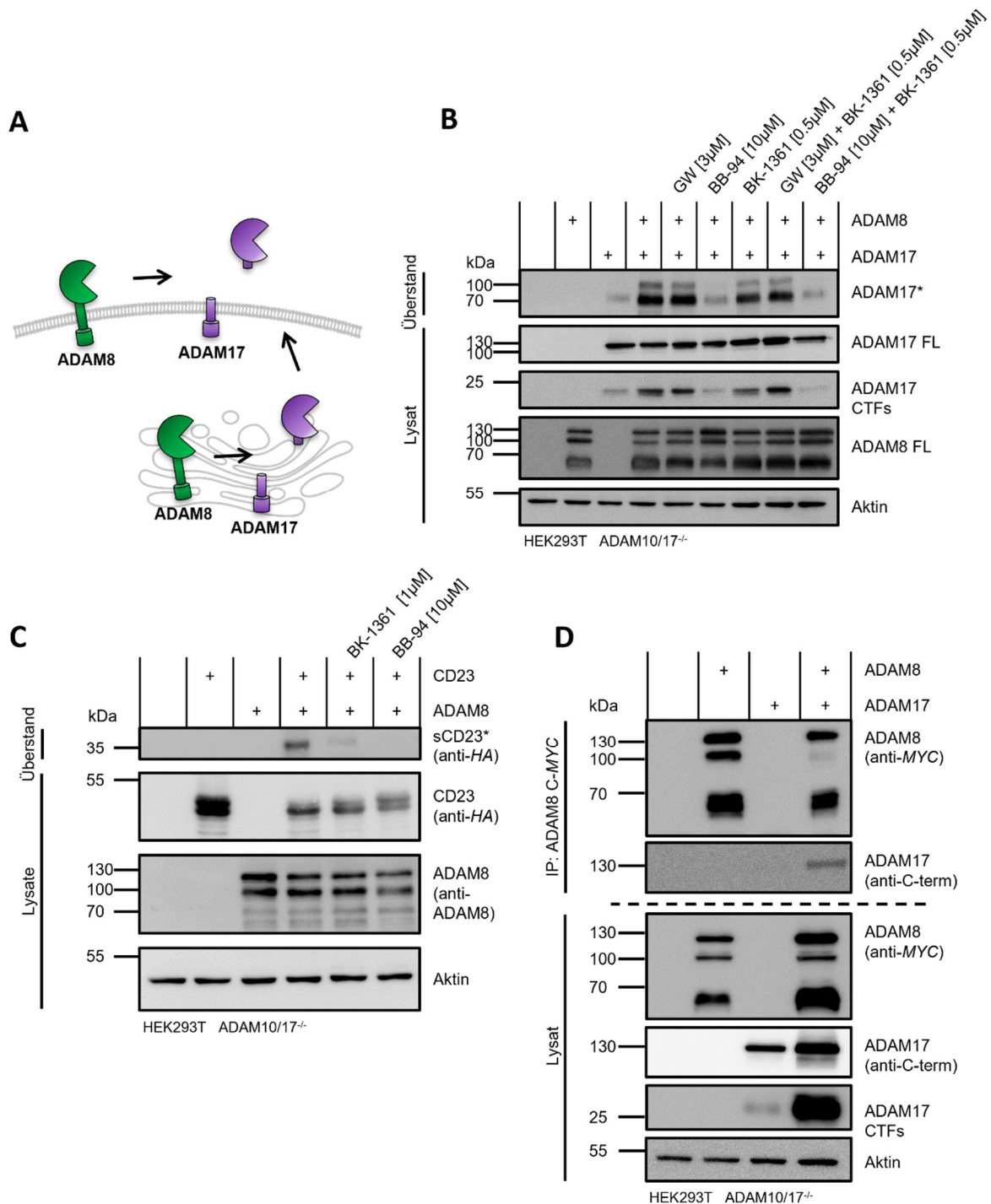
A: Schematische Darstellung des *sheddings* von ADAM17 durch ADAM8 **B:** HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden nach dem dargestellten Schema transient transfiziert, pcDNA 3.1 diente als Leervektorkontrolle. Die Überstände wurden anhand der Lysate mittels *BCA*-Assay normalisiert. Die Lysate und Überstände wurden durch einen Immunoblot analysiert. In den Lysaten wurde die Expression von ADAM8 mit einem Antikörper gegen *MYC-Tag* nachgewiesen. C-terminale Fragmente von ADAM17 wurden mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von ADAM17 nachgewiesen. Über einen Antikörper gegen die Ektodomäne von ADAM17 wurde die Expression von ADAM17 in Lysat und Überstand nachgewiesen. Endogen exprimiertes Aktin diente als Ladekontrolle. **C:** qPCR Analyse von ADAM8, ADAM9 und ADAM15 in HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen. Die mRNA-Konzentration der einzelnen Proteasen wurde in ihrem Verhältnis zur mRNA-Konzentration von GAPDH aufgetragen. Die Cp-Werte aus drei Wiederholungen des Experimentes wurden berechnet um die Expressionslevel der gesuchten Gene anzunähern. Je niedriger das Cp/ Δ Cp Verhältnis, desto höher die Expression des entsprechenden Gens. **D:** Validierung

der Spezifität der qPCR. Die erwartete Größe der untersuchten Gene wurde mittels 2% Agarose-Gelelektrophorese bestätigt. In der Leerkontrolle wurden keine Banden festgestellt.

4.4.1. Das *shedding* von ADAM17 durch ADAM8 findet auf dem sekretorischen Weg statt

Nach der Transfektion wurden die Zellen mit unterschiedlichen Inhibitoren behandelt. Die Behandlung mit DAPT inhibierte die Gamma-Sekretase¹²³ und reduzierte dadurch den proteolytischen Abbau der CTFs, was deren Analyse ermöglichte. Unter Behandlung mit dem ADAM10/ADAM17 spezifischen Inhibitor GW¹¹¹ wurde die Spaltung von ADAM17 bei Cotransfektion mit ADAM8 nicht reduziert. Der Matrix Metalloprotease Inhibitor BB-94¹¹⁰, sowie der ADAM8 spezifische Inhibitor BK-1361¹¹⁰ wurden eingesetzt um ADAM8 zu inhibieren. Durch BB-94 wurde die Spaltung von ADAM17 deutlich reduziert. BK-1361 inhibierte die Spaltung von ADAM17 nur teilweise (Abbildung 16 **B**). In einem Kontrollexperiment mit dem für ADAM8 beschriebenen Substrat *cluster of differentiation 23* (CD23) konnte die Aktivität von ADAM8 erfolgreich inhibiert und damit die Wirkung der beiden Inhibitoren bestätigt werden (Abbildung 16 **C**). Die Ergebnisse der Coimmunpräzipitation von ADAM8 und ADAM17 zeigen wiederum eine starke Interaktion der beiden Proteasen (Abbildung 16 **D**). Eine vollständige Inhibition der Spaltung von ADAM17 durch ADAM8 konnte nur durch den membrangängigen Hydroxamatinhibitor BB-94 erreicht werden. BK-1361 ist als zyklisches Peptid nicht membrangängig und inhibierte die Spaltung von ADAM17 nur teilweise.

Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse dafür, dass ADAM8 in der Lage ist ADAM17 zu spalten und dass die Spaltung teilweise auf dem sekretorischen Weg stattfindet (Abbildung 16 **A**).



Modifiziert nach Scharfenberg et al., 2020

Abbildung 16: Das *shedding* von ADAM17 findet teilweise auf dem sekretorischen Weg statt

A: Schematische Darstellung des *sheddings* von ADAM17 durch ADAM8 **B:** HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden nach dem dargestellten Schema transient transfiziert. pcDNA 3.1 diente als Leervektorkontrolle. Die Überstände wurden anhand der Lysate mittels BCA-Assay normalisiert. Die Lysate und Überstände wurden durch einen Immunoblot analysiert. In den Lysaten wurde die Expression von ADAM8 mit einem

Ergebnisse

Antikörper gegen *MYC-Tag* nachgewiesen. C-terminale Fragmente von ADAM17 wurden mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von ADAM17 nachgewiesen. Über einen Antikörper gegen die Ektodomäne von ADAM17 wurde die Expression von ADAM17 in Lysat und Überstand nachgewiesen. Endogen exprimiertes Aktin diente als Ladekontrolle. **C:** HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden nach dem dargestellten Schema transient transfiziert. pcDNA 3.1 diente als Leervektorkontrolle. Die Überstände wurden anhand der Lysate mittels *BCA-Assay* normalisiert. Die Lysate und Überstände wurden durch einen Immunoblot analysiert. In den Lysaten wurde die Expression von ADAM8 mit einem Antikörper gegen ADAM8 nachgewiesen. CD23 ist N-terminal mit einem *HA-Tag* markiert und wurde im Lysat sowie im Überstand mittels Antikörper gegen *HA-Tag* nachgewiesen. Endogen exprimiertes Aktin diente als Ladekontrolle. **D:** Coimmunpräzipitation von ADAM8 und ADAM17. HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden mit ADAM8 und/oder ADAM17 transient transfiziert. Über einen Antikörper gegen *MYC-Tag* wurden die ADAMs präzipitiert und per Immunoblot analysiert.

4.4.2. Lösliches ADAM17 ist keine *shed*dase des Interleukin-6

Rezeptor

Erste Untersuchungen zur Funktion von löslichem ADAM17 unter Verwendung von rekombinant hergestelltem sADAM17 zeigten, dass dieses sowohl lösliche Proteine im Extrazellulärraum prozessieren, als auch möglicherweise weiterhin als *shed*dase fungieren kann. Letzteres wurde am Beispiel von APP695 gezeigt, das ein beschriebenes Substrat von membrangebundenem ADAM17 ist¹⁸. Im Folgenden sollte untersucht werden ob endogen *gesheddetes* ADAM17 als lösliche Protease weiterhin in der Lage ist den IL-6R zu *shed*den. Dazu wurde der IL-6R in HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen überexprimiert (Abbildung 17 **B**). In einem zweiten Ansatz wurde ADAM17 sowie Leervektor als Negativkontrolle in HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen überexprimiert (Abbildung 17 **C**). Es wurden die Überstände von drei und fünf 10 cm Zellkulturschalen mit Hilfe von *Amicon® Ultra-15* Zentrifugenfiltereinheiten nach Herstellerangaben konzentriert. Der so mit sADAM17 konditionierte Zellkulturüberstand wurde in steigender Konzentration auf die IL-6R überexprimierenden Zellen gegeben. Nach 24 Stunden Inkubation wurde der Zellkulturüberstand auf das Vorhandensein von sIL-6R sowie sADAM17 untersucht. In einem weiteren Ansatz wurde der IL-6R zusammen mit der Ektodomäne von

Ergebnisse

ADAM17 in HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen coexprimiert. Als Positivkontrolle wurde der IL-6R zusammen mit membranständigem ADAM17 in HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen überexprimiert. Im Lysat der Zellen wurden die überexprimierten Proteine als Expressionskontrolle und endogen exprimiertes GAPDH als Ladekontrolle nachgewiesen. Im Zellkulturüberstand der mit sADAM17 konditionierten Zellen konnte sADAM17 konzentrationsabhängig nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte sADAM17 im Zellkulturüberstand der Cotransfektion von IL-6R mit der Ektodomäne von ADAM17 nachgewiesen werden. Deutlich geringer, aber immer noch nachweisbar, war sADAM17 im Zellkulturüberstand der Cotransfektion von IL-6R und membranständigem ADAM17. Einen Nachweis des sIL-6R konnte im Zellkulturüberstand der Cotransfektion von IL-6R und membranständigem ADAM17, wie zuvor bereits gezeigt (Kapitel 4.1.1), erbracht werden. Im Zellkulturüberstand der Cotransfektion von IL-6R mit der Ektodomäne von ADAM17 konnte kein sIL-6R nachgewiesen werden. Im Zellkulturüberstand der Zellen, die mit sADAM17 konditioniertem Überstand behandelt wurden, konnte ebenfalls kein sIL-6R nachgewiesen werden (Abbildung 17 **B**).

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass der IL-6R durch membranständiges ADAM17, aber nicht durch sADAM17 gespalten wird (Abbildung 17 **A**).

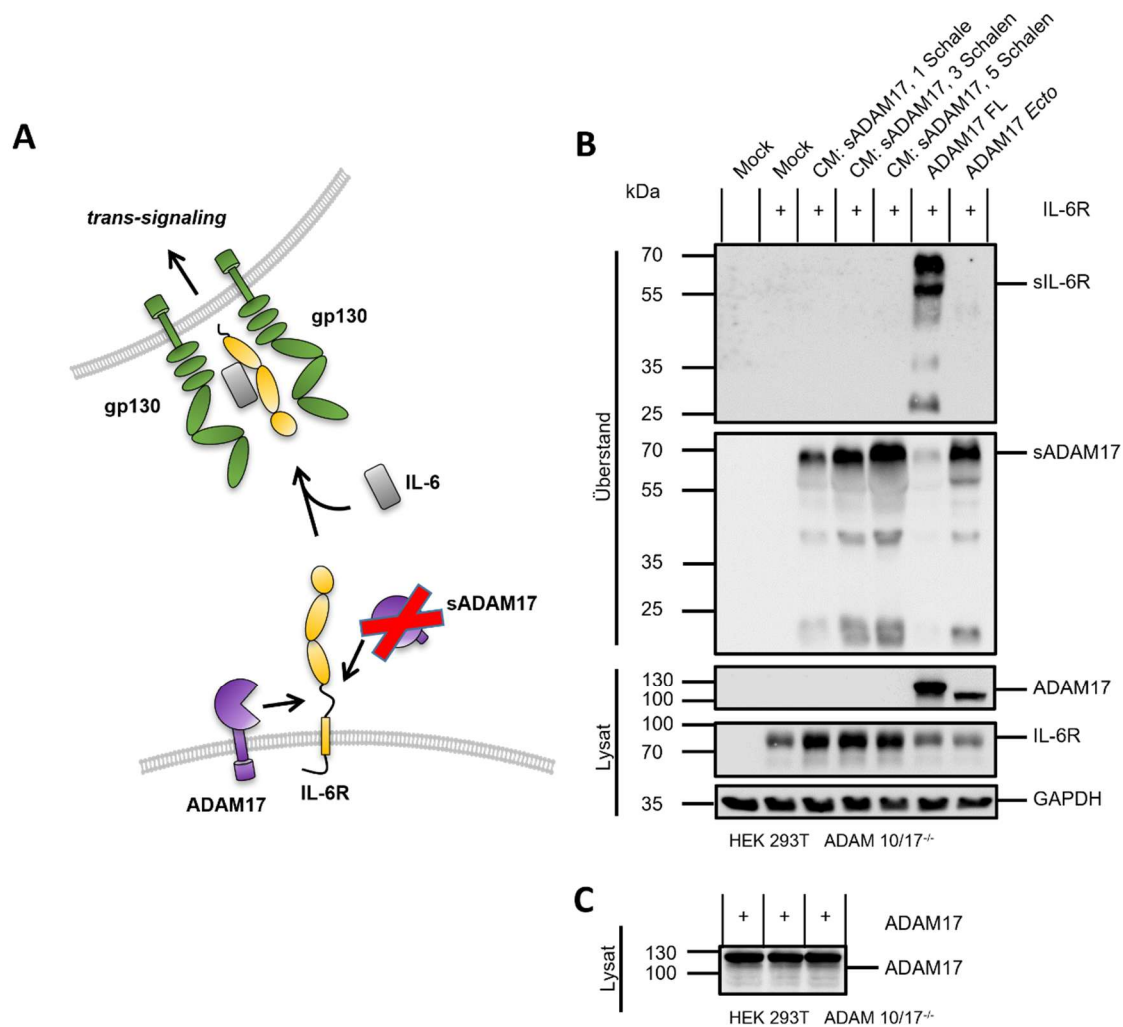


Abbildung 17: sADAM17 *sheddet* den IL-6R nicht

A: Schematische Darstellung des *sheddings* des IL-6R durch ADAM17 **B, C:** HEK 293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden nach dem dargestellten Schema transient transfiziert. pcDNA 3.1 diente als Leervektorkontrolle (*Mock*).

Spalten 3-5: Die mit IL-6R transfizierten Zellen wurden mit dem Überstand von ADAM17 transfizierten Zellen in steigender Konzentration (CM: sADAM17 x Schalen, **C**) inkubiert.

Spalten 6-7: Cotransfektion mit membrangebundenem ADAM17 (ADAM17FL) oder der Ektodomäne von ADAM17 (ADAM17 *Ecto*).

Die Überstände wurden anhand der Lysate mittels *BCA*-Assay normalisiert. Die Lysate und Überstände wurden durch einen Immunoblot analysiert. Über Antikörper gegen die entsprechenden Ektodomänen konnten ADAM17 sowie IL-6R in Lysat und Überstand nachgewiesen werden. Endogen exprimiertes GAPDH diente als Ladekontrolle.

C: Spalten 1-3: Lysate von 1, 3 und 5 Schalen transfizierter Zellen zusammengeführt und per Immunoblot analysiert.

5. Diskussion

Die Zytokine IL-6 und IL-11 erfüllen wichtige Aufgaben in unterschiedlichen Stoffwechselfunktionen^{69,105}. IL-6 ist als inflammatorisches Zytokin an den meisten, wenn nicht sogar an allen inflammatorischen Prozessen beteiligt⁶². Diese umfassen unter anderem die Aktivierung von T-Zellen⁶⁴, die Differenzierung von B-Zellen^{65,66} und die Regulation der Akut-Phase-Reaktion⁶⁷. Zudem erfüllt IL-6 zentrale Funktionen in der Homöostase wie die Regeneration von Hepatozyten und Darmepithel, den Glukosemetabolismus, die Hämatopoese, die Regulation des neuroendokrinen Systems sowie von Hyperthermie, Müdigkeit und Hungergefühl^{59,68,78}.

Im Kontext von Entzündungsreaktionen und Krebserkrankungen steigt die Konzentration von IL-6 im Blut schnell und drastisch bis in den Bereich von µg/ml an^{57,69}. Die Serumkonzentration von IL-6 kann daher als prognostischer und diagnostischer Marker von Entzündungsreaktionen und entzündungsassoziierten Pathologien dienen^{70–72}.

Während die protektiven und homöostatischen Funktionen von IL-6 hauptsächlich über das *classic-signaling* ausgeführt werden, ist das *trans-signaling* mit den proinflammatorischen Funktionen sowie unterschiedlichen Krankheitsbildern wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen, rheumatoide Arthritis, Sepsis und Krebs assoziiert^{59,68}. Gleichzeitig bilden sgp130 und der durch *shedding* produzierte sIL-6R einen Puffer, der vor einer Überstimulation durch IL-6 schützt. Die Kapazität dieses Puffers wird durch die Konzentration von sIL-6R bestimmt, da die Konzentration von sgp130 die von sIL-6R im molaren Bereich übersteigt⁶⁹. Der Wirkstoff sgp130Fc blockiert selektiv das IL-6 *trans-signaling* und befindet sich aktuell unter dem Namen *Olamkicept* in Phase II der klinischen Studie zur Behandlung der Colitis Ulcerosa^{60,89}.

IL-11 ist an der Hämatopoese beteiligt und spielt vor allem bei der Bildung von Thrombozyten eine entscheidende Rolle, weshalb es als Medikament zur Behandlung von Chemotherapie-induzierter Thrombozytopenie zugelassen ist⁹⁸. Daneben erfüllt es Funktionen in Immunreaktionen⁹⁹, Osteogenese^{100–102}, Fertilität¹⁰³, Krebsentstehung⁹⁹ und Fibrose⁹⁹.

Alle diese Funktionen werden dem IL-11 *classic-signaling* zugeschrieben und bis dato wurde keine Funktion für das IL-11 *trans-signaling* entdeckt⁹⁴.

In dieser Arbeit wurde untersucht welche weiteren, neben den bereits beschriebenen, Proteasen in der Lage sind den IL-6R bzw. den IL-11R zu *shedden* und das *trans-signaling* zu induzieren. Ebenfalls wurde das durch ADAM17 induzierte IL-6 *trans-signaling* genauer charakterisiert.

Bisher wurden neue *sheddasen* durch Stimulationsexperimente entdeckt⁹⁴. Die Stimulation durch Ionomycin oder PMA induziert aber möglicherweise weitere Proteasen als ADAM10 und ADAM17 (Kapitel 4.2.1). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die zu untersuchenden Proteasen per transienter Transfektion in ADAM10- und ADAM17- defizienten Zellen überexprimiert. Dadurch wurde zwar eine höhere Expression der Proteasen erzielt als im Wildtyp, jedoch war das Ziel zu überprüfen ob die untersuchten Proteasen generell in der Lage sind, den IL-6R bzw. IL-11R zu *shedden* und nicht in welchem Ausmaß.

5.1. Physiologische Relevanz des IL-6R *sheddings*

Das *shedding* des IL-6R spielt eine entscheidende Rolle für ein funktionierendes Immunsystem. Einerseits ist es essenziell für die Bildung des beschriebenen Puffers⁶⁹, andererseits für die Induktion des IL-6 *trans-signaling*s⁶⁹, durch welches das Ausmaß der durch IL-6 ausgelösten Immunreaktion drastisch erweitert wird. Die Aktivität der *sheddasen* bildet dabei die Balance zwischen protektiven und pathologischen Funktionen von IL-6.

Schumacher et al. zeigten, dass die deutliche Reduktion der Aktivität von ADAM17, welche als *major sheddase*^{62,69} beschrieben wurde, keine signifikante Veränderung der sIL-6R Konzentration im Blut zur Folge hatte⁷⁴. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass auch weitere Proteasen wie ADAM10⁷⁵, Meprin α ⁴⁸ und Meprin β ⁴⁸ den IL-6R *shedden*. In dieser Arbeit wurden zudem ADAM9¹²⁰ und MT1-MMP¹²⁰ als *sheddasen* des IL-6R identifiziert. Daraus kann geschlossen werden, dass die genannten Proteasen ein Netzwerk bilden, in dem sie sich gegenseitig kompensieren um das *shedding* des IL-6R als unerlässliches Ereignis sicherzustellen.

MMPs spielen eine komplexe Rolle in der Pathogenese von Krebserkrankungen. Eine Fehlregulation von Proteasen, insbesondere der MMPs, ist häufig mit

Tumorprogression und Metastasierung assoziiert¹²⁴. Gleichzeitig haben einige MMPs auch antitumorale Effekte¹²⁴.

Hier wurden die melanomassoziierten Varianten Meprin β G45R und G89R untersucht. In beiden Varianten wurde jeweils ein Glycin durch ein Arginin ersetzt. Meprin β wird durch das *shedding* des Propeptids C-terminal des Arginins an Position 61 aktiviert³¹. Ein weiteres Arginin in direkter Nähe könnte die Aktivierung von Meprin β verstärken⁴⁹. Für G45R konnte eine erhöhte basale Aktivität festgestellt werden, jedoch konnte keine erhöhte proteolytische Aktivität nach Inkubation mit Trypsin festgestellt werden⁴⁹.

Nichtsdestotrotz war das *shedding* des IL-6R durch G45R erhöht, wodurch die Proliferation von Immun- und Krebszellen beeinflusst werden könnte⁴⁹.

Im Fall von G89R könnte die Einführung der großen, positiv geladenen Argininseitenkette in den schmalen Bereich zwischen der katalytischen Domäne und der TRAF-Domäne die korrekte Faltung des Proteins behindern und damit die proteolytische Aktivität einschränken⁴⁹. In der Tat wurde G89R in geringerem Ausmaß auf der Zelloberfläche exprimiert als Meprin β WT. Das *shedding* des IL-6R durch G89R war ebenfalls verringert. Allerdings scheint G89R durch Substratbindung auf dem sekretorischen Weg ausreichend stabilisiert zu werden um aktiviert werden zu können und anschließend, wenn auch in geringerem Maß, auf der Zelloberfläche proteolytisch aktiv zu sein⁴⁹. Dies spricht eher für antitumorale Effekte dieser Variante⁴⁹.

5.2. Der IL-11R wird durch ADAM10 und ADAM17 *gesheddet*

In Kapitel 4.2.1 wurde das *shedding* des IL-11R durch ADAM10 und ADAM17 untersucht. Dazu wurde die endogene Aktivität von ADAM10 mit Ionomycin und die von ADAM17 mit PMA stimuliert. Vergleichend dazu wurden beide Proteasen in ADAM10- und ADAM17- defizienten Zellen überexprimiert. Sowohl mit Ionomycin als auch mit PMA konnte das *shedding* des IL-11R induziert werden. Ebenso konnte durch die Retransfektion beider Proteasen in ADAM10- und ADAM17- defizienten Zellen *shedding* des IL-11R festgestellt werden. Die Annahme, dass ADAM17 nicht in der Lage ist den IL-11R zu *shedden*⁹⁴ konnte somit nicht bestätigt werden.

Durch die Stimulation von ADAM10- und ADAM17- defizienten Zellen durch

Ionomycin konnte ebenfalls *shedding* des IL-11R induziert werden ohne dass ADAM10 retransfiziert wurde. Eine mögliche Erklärung dafür ist, wie bereits vorstehend für den IL-6R erläutert, dass weitere endogene Proteasen dieses Zellsystems durch Ionomycin aktiviert werden und diese den IL-11R *shedden*.

5.3. Beide Interleukin-Rezeptoren bieten eine gute Zugänglichkeit für Proteolyse

Das *shedding* des IL-6R und des IL-11R findet an mehreren Stellen innerhalb des Moleküls statt. Für den IL-6R wurden bereits zwei unterschiedliche *shedding sites* beschrieben⁴⁸. Jedoch wurden in der Cotransfektion mit ADAM9, Meprin β , MT1-MMP und ADAM17 zwei weitere Fragmente detektiert, die wahrscheinlich *shedding* zwischen den Domänen D3 und D2, bzw. D2 und D1 darstellen.

Das *shedding* durch Meprin α beschränkt sich auf die *stalk region*, während ADAM10 den Rezeptor zusätzlich in der Linkerregion zwischen D2- und D1-Domäne spalten kann.

Ein vergleichbares Bandenmuster konnte auch beim *shedding* des IL-11R festgestellt werden. Die Fragmente mit den Molekulargewichten von 30 kDa und 35 kDa sind wahrscheinlich das Ergebnis von *shedding* in den Linkerregionen zwischen den Domänen D3 und D1.

Dieses heterogene Bandenmuster spiegelt die unterschiedlichen Spaltspezifitäten der untersuchten Proteasen wider. Länge und Aminosäurekomposition sowie die multiplen Spaltstellen in der *stalk region* unterstreichen die gute Zugänglichkeit der Rezeptoren für die entsprechenden Proteasen sowie die Unerlässlichkeit des *sheddings*.

5.4. Die Substratspezifität von sADAM17

Das *Shedding* von Membranproteinen ist ein wichtiges regulatorisches Ereignis in vielen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen^{1,18,23,125}. Insbesondere ADAM17 spielt eine besonders wichtige Rolle in diesem Zusammenhang. Allerdings wurden Abbau und Neubildung dieses Enzyms an der Zelloberfläche bisher wenig

untersucht. Internalisierung und Exozytose wurden als Mechanismen dieser Vorgänge untersucht^{126–128}, jedoch noch nicht das *shedding*. Bisher wurde ADAM17 in Plasma^{129,130}, Liquor^{131,132}, in Gingivaflüssigkeit¹³³ und in Nierenzysten¹³⁴ beschrieben ohne zu adressieren, ob es sich dabei um membrangebundenes ADAM17 extrazellulärer Vesikel oder gesheddetes sADAM17 handelt. In dieser Arbeit konnte ADAM8 als *sheddase* von ADAM17 identifiziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das *shedding* teilweise auf dem sekretorischen Weg stattfindet, obwohl *ectodomain shedding* klassischerweise mehrheitlich an der Zelloberfläche beschrieben wird.

Weitere unveröffentlichte Daten zeigen, dass sADAM17 ebenso wie *gesheddetes* Meprin β in Abhängigkeit vom Substrat tatsächlich als *sheddase* fungieren kann, jedoch wahrscheinlich primär proteolytisch andere lösliche Proteine des Extrazellulärraums prozessiert. Basierend darauf, kann sADAM17, wie von Lichtenthaler et al. klassifiziert, ebenso wie Meprin β als *part-time sheddase* angesehen werden¹. Sowohl lösliches Meprin β ⁴⁸, als auch sADAM17 sind jedoch beide nicht mehr in der Lage den IL-6R zu *shedden*. Dies deutet darauf hin, dass gerade das *shedding* vom IL-6R durch die Membranverankerung der Proteasen und entsprechende Wechselwirkungen mit dem Substrat sowie gegebenenfalls weiteren assoziierten Adapterproteinen reguliert wird.

5.5. Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das *shedding* des IL-6R durch ein Netzwerk unterschiedlicher Proteasen gewährleistet wird, die sich gegenseitig kompensieren (Abbildung 18). Dies legt den Schluss nahe, dass der Verlust der Aktivität einzelner Proteasen in diesem Zusammenhang eine untergeordnete Rolle spielt.

Die vermehrte Aktivität einer einzelnen Protease kann jedoch durchaus die Konzentration von sIL-6R erhöhen. In zukünftigen Studien könnte also mit *knock-in* Modellen *in vivo* untersucht werden, ob eine verstärkte Aktivität einzelner *sheddasen* des IL-6R mit Pathologien assoziiert ist. Dies könnte einen gezielten Ansatzpunkt für eine individuelle Therapie IL-6 *trans-signaling* assoziierter Erkrankungen ermöglichen. Außerdem könnten so neue standardisierte Tiermodelle für Entzündungs- oder Krebserkrankungen etabliert werden.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Proteasen in der Lage sind den IL-11R zu *shedden*. Zudem konnte in früheren Studien sIL-11R im Plasma gesunder Menschen detektiert werden. Spätere Studien werden zeigen, welche physiologische Relevanz das IL-11 *trans-signaling* hat.

Frühere Studien haben das Vorkommen von sADAM17 in verschiedenen Körperflüssigkeiten gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit ADAM8 erstmals eine *sheddase* von ADAM17 identifiziert. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass das *shedding* von ADAM17 nicht einfach eine Herunterregulierung seiner Funktion als membrangebundene Protease darstellt, sondern, dass sADAM17 weitere, bisher vernachlässigte Funktionen als lösliches Enzym im extrazellulären Raum hat. Die zugrundeliegenden Mechanismen, die das *shedding* dieser essentiellen Protease regulieren, sind jedoch nur unzureichend verstanden. Daher sind weitere umfassendere Untersuchungen notwendig, um zu verstehen, wie und wann sADAM17 zur zellulären Homöostase und/ oder zu pathophysiologischen Bedingungen beiträgt.

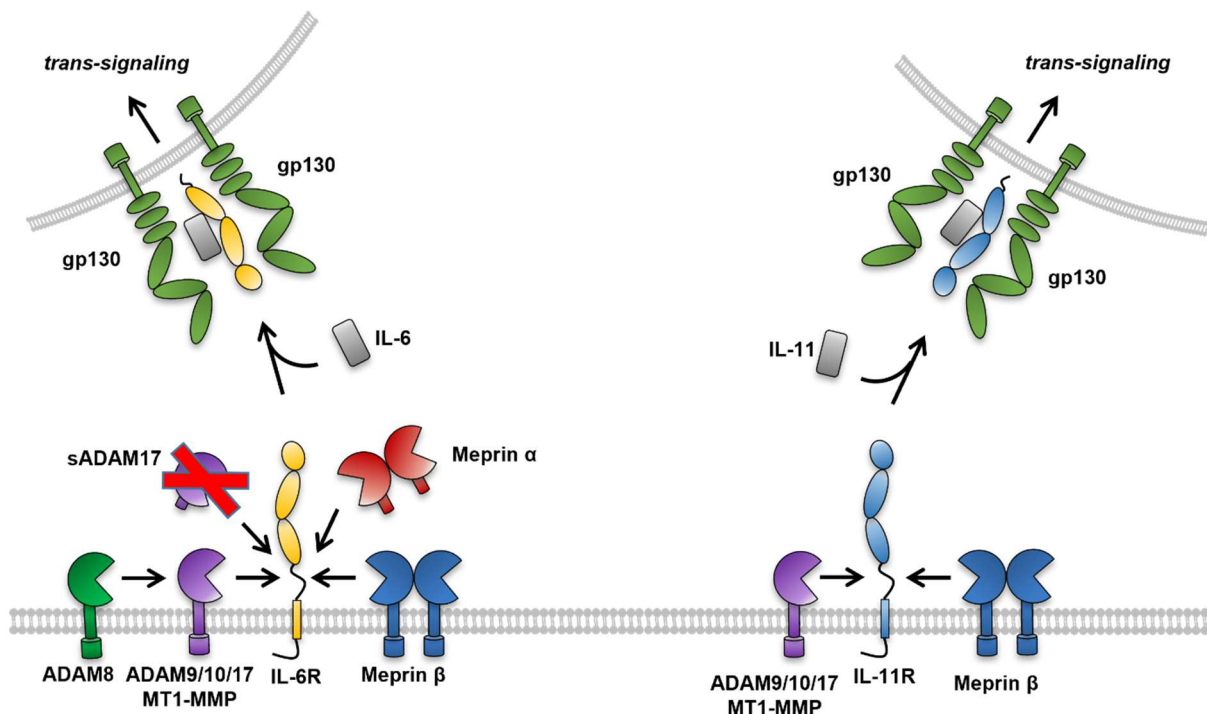


Abbildung 18: Shedding des IL-6R und des IL-11R

Schematische Übersichtsdarstellung über das *shedding* des IL-6R und des IL-11R durch unterschiedliche Metalloproteasen.

6. Zusammenfassung

Ectodomain shedding, die proteolytische Spaltung extrazellulärer Domänen von Membranproteinen, ist ein wichtiger regulatorischer Mechanismus in unterschiedlichen Stoffwechselwegen¹. In dieser Arbeit wurde dieser Mechanismus insbesondere im Zusammenhang mit den Zytokinrezeptoren IL-6R und IL-11R untersucht. Beide Rezeptoren erfüllen wichtige physiologische Funktionen^{69,105}. Eine Fehlregulation des *sheddings* des IL-6R hat diverse Pathologien zur Folge⁶⁹.

Die Signalübertragung über den membrangebundenen Rezeptor wird als *classic-signaling*, die über den *gesheddeten* Rezeptor als *trans-signaling* bezeichnet^{69,105}. Während dem IL-6 *classic-signaling* eher protektive und homöostatische Funktionen zugesprochen werden, ist das IL-6 *trans-signaling* hauptsächlich mit Pathologien assoziiert⁶⁹. Das *shedding* des IL-6R ist einerseits Voraussetzung für das IL-6 *trans-signaling*, andererseits für die Bildung eines Puffers durch den die Aktivität von IL-6 reguliert wird⁶⁹.

Bisher waren ADAM10⁷⁵, ADAM17⁷³, Meprin α ⁴⁸ und Meprin β ⁴⁸ als *sheddasen* des IL-6R beschrieben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zusätzlich ADAM9 und MT1-MMP in der Lage sind den IL-6R zu *shedden* und IL-6 *trans-signaling* zu induzieren¹²⁰.

In früheren Veröffentlichungen wurde ADAM17 als die *major sheddase* des IL-6R beschrieben^{62,69}. Es konnte gezeigt werden, dass ADAM17 durch ADAM8 *gesheddert* wird¹⁸. Infolgedessen ist sADAM17 nicht mehr in der Lage den IL-6R zu *shedden*. ADAM8 reguliert dadurch indirekt die Funktionen von IL-6.

Alle für IL-11 beschriebenen Funktionen sind bis dato mit dem IL-11 *classic-signaling* assoziiert¹⁰⁵. Für das IL-11 *trans-signaling* sind bisher keine Funktionen beschrieben¹⁰⁵, jedoch spricht das Vorkommen von sIL-11R im Plasma gesunder Individuen dafür, dass das *shedding* des IL-11R ein natürlich vorkommendes Ereignis mit physiologischer Relevanz ist⁹⁴. In dieser Arbeit konnten ADAM9, ADAM17 und MT1-MMP als neue *sheddasen* des IL-11R identifiziert werden¹²⁰.

7. Literaturverzeichnis

1. Lichtenthaler SF, Lemberg MK, Fluhrer R. Proteolytic ectodomain shedding of membrane proteins in mammals-hardware, concepts, and recent developments. *EMBO J* 2018;37.
2. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L. *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018. ISBN: 978-3-662-54619-2.
3. López-Otín C, Overall CM. Protease degradomics, A new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:509–19.
4. López-Otín C, Bond JS. Proteases, Multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem* 2008;283:30433–7.
5. Bode W, Gomis-Rüth FX, Stöckler W. Astacins, serralsins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett* 1993;331:134–40.
6. Cerdà-Costa N, Gomis-Rüth FX. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. *Protein Sci* 2014;23:123–44.
7. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 2008;29:258–89.
8. Lorenzen I, Lokau J, Düsterhöft S, et al. The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Lett* 2012;586:1093–100.
9. Wetzel S, Seipold L, Saftig P. The metalloproteinase ADAM10, A useful therapeutic target? *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017;1864:2071–81.
10. Scheller J, Chalaris A, Garbers C, Rose-John S. ADAM17, A molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol* 2011;32:380–7.
11. Zunke F, Rose-John S. The shedding protease ADAM17, Physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017;1864:2059–70.
12. Rahn S, Becker-Pauly C. Meprin and ADAM proteases as triggers of systemic inflammation in sepsis. *FEBS Lett* 2022;596:534–56.
13. Lin C-Y, Cho C-F, Bai S-T, et al. ADAM9 promotes lung cancer progression through vascular remodeling by VEGFA, ANGPT2, and PLAT. *Sci Rep* 2017;7:15108.

- 14.** Namba K, Nishio M, Mori K, et al. Involvement of ADAM9 in multinucleated giant cell formation of blood monocytes. *Cell Immunol* 2001;213:104–13.
- 15.** Tousseyn T, Thathiah A, Jorissen E, et al. ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem* 2009;284:11738–47.
- 16.** Conrad C, Benzel J, Dorzweiler K, et al. ADAM8 in invasive cancers, Links to tumor progression, metastasis, and chemoresistance. *Clin Sci (Lond)* 2019;133:83–99.
- 17.** Conrad C, Götte M, Schlomann U, et al. ADAM8 expression in breast cancer derived brain metastases, Functional implications on MMP-9 expression and transendothelial migration in breast cancer cells. *Int J Cancer* 2018;142:779–91.
- 18.** Scharfenberg F, Helbig A, Sammel M, et al. Degradome of soluble ADAM10 and ADAM17 metalloproteases. *Cell Mol Life Sci* 2020;77:331–50.
- 19.** Sterchi EE, Green JR, Lentze MJ. Non-pancreatic hydrolysis of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid (PABA-peptide) in the human small intestine. *Clin Sci (Lond)* 1982;62:557–60.
- 20.** Beynon RJ, Shannon JD, Bond JS. Purification and characterization of a metallo-endoproteinase from mouse kidney. *Biochem J* 1981;199:591–8.
- 21.** Becker-Pauly C, Höwel M, Walker T, et al. The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol* 2007;127:1115–25.
- 22.** Biasin V, Marsh LM, Egemnazarov B, et al. Meprin β , a novel mediator of vascular remodelling underlying pulmonary hypertension. *J Pathol* 2014;233:7–17.
- 23.** Scharfenberg F, Armbrust F, Marengo L, Pietrzik C, Becker-Pauly C. Regulation of the alternative β -secretase meprin β by ADAM-mediated shedding. *Cell Mol Life Sci* 2019;76:3193–206.
- 24.** Peters F, Becker-Pauly C. Role of meprin metalloproteases in metastasis and tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 2019;38:347–56.
- 25.** Hengst JA, Bond JS. Transport of meprin subunits through the secretory pathway, Role of the transmembrane and cytoplasmic domains and oligomerization. *J Biol Chem* 2004;279:34856–64.

- 26.** Bayly-Jones C, Lupton CJ, Fritz C, et al. Helical ultrastructure of the metalloprotease meprin α in complex with a small molecule inhibitor. *Nat Commun* 2022;13:6178.
- 27.** Peters F, Scharfenberg F, Colmorgen C, et al. Tethering soluble meprin α in an enzyme complex to the cell surface affects IBD-associated genes. *FASEB J* 2019;33:7490–504.
- 28.** Becker C, Kruse M-N, Slotty KA, et al. Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin. *Biol Chem* 2003;384:825–31.
- 29.** Ohler A, Debela M, Wagner S, Magdolen V, Becker-Pauly C. Analyzing the protease web in skin, Meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation. *Biol Chem* 2010;391:455–60.
- 30.** Rösmann S, Hahn D, Lottaz D, Kruse M-N, Stöcker W, Sterchi EE. Activation of human meprin-alpha in a cell culture model of colorectal cancer is triggered by the plasminogen-activating system. *J Biol Chem* 2002;277:40650–8.
- 31.** Jäckle F, Schmidt F, Wichert R, et al. Metalloprotease meprin β is activated by transmembrane serine protease matriptase-2 at the cell surface thereby enhancing APP shedding. *Biochem J* 2015;470:91–103.
- 32.** Werny L, Colmorgen C, Becker-Pauly C. Regulation of meprin metalloproteases in mucosal homeostasis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2022;1869:119158.
- 33.** Wichert R, Ermund A, Schmidt S, et al. Mucus Detachment by Host Metalloprotease Meprin β Requires Shedding of Its Inactive Pro-form, which Is Abrogated by the Pathogenic Protease RgpB. *Cell Rep* 2017;21:2090–103.
- 34.** Jefferson T, dem Keller U auf, Bellac C, et al. The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin β and ADAM10. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:309–33.
- 35.** Herzog C, Haun RS, Ludwig A, Shah SV, Kaushal GP. ADAM10 is the major sheddase responsible for the release of membrane-associated meprin A. *J Biol Chem* 2014;289:13308–22.
- 36.** Hahn D, Pischitzis A, Roesmann S, et al. Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced ectodomain shedding and phosphorylation of the human meprinbeta metalloprotease. *J Biol Chem* 2003;278:42829–39.

37. Werny L, Grogro A, Bickenbach K, et al. MT1-MMP and ADAM10/17 exhibit a remarkable overlap of shedding properties. *FEBS J* 2023;290:93–111.
38. Wichert R, Scharfenberg F, Colmorgen C, et al. Meprin β induces activities of A disintegrin and metalloproteinases 9, 10, and 17 by specific prodomain cleavage. *FASEB J* 2019;33:11925–40.
39. Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 1967;27:157–62.
40. Becker-Pauly C, Barré O, Schilling O, et al. Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates. *Mol Cell Proteomics* 2011;10:M111.009233.
41. Broder C, Arnold P, Vadon-Le Goff S, et al. Metalloproteases meprin α and meprin β are C- and N-procollagen proteinases important for collagen assembly and tensile strength. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:14219–24.
42. Kronenberg D, Bruns BC, Moali C, et al. Processing of procollagen III by meprins, New players in extracellular matrix assembly? *J Invest Dermatol* 2010;130:2727–35.
43. Arnold P, Otte A, Becker-Pauly C. Meprin metalloproteases, Molecular regulation and function in inflammation and fibrosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017;1864:2096–104.
44. Banerjee S, Oneda B, Yap LM, et al. MEP1A allele for meprin A metalloprotease is a susceptibility gene for inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol* 2009;2:220–31.
45. Broder C, Becker-Pauly C. The metalloproteases meprin α and meprin β , Unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. *Biochem J* 2013;450:253–64.
46. Bedau T, Peters F, Prox J, et al. Ectodomain shedding of CD99 within highly conserved regions is mediated by the metalloprotease meprin β and promotes transendothelial cell migration. *FASEB J* 2017;31:1226–37.
47. Bedau T, Schumacher N, Peters F, et al. Cancer-associated mutations in the canonical cleavage site do not influence CD99 shedding by the metalloprotease meprin β but alter cell migration in vitro. *Oncotarget* 2017;8:54873–88.
48. Arnold P, Boll I, Rothaug M, et al. Meprin Metalloproteases Generate Biologically Active Soluble Interleukin-6 Receptor to Induce Trans-Signaling. *Sci Rep* 2017;7:44053.

49. Gellrich A, Scharfenberg F, Peters F, et al. Characterization of the Cancer-Associated Meprin Beta Variants G45R and G89R. *Front Mol Biosci* 2021;8:702341.
50. Itoh Y. Membrane-type matrix metalloproteinases, Their functions and regulations. *Matrix Biol* 2015;44-46:207–23.
51. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 1997;272:2446–51.
52. Okada Y, Morodomi T, Enghild JJ, et al. Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur J Biochem* 1990;194:721–30.
53. Niland S, Riscanevo AX, Eble JA. Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression. *Int J Mol Sci* 2021;23.
54. Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, et al. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 1999;99:81–92.
55. Paumier J-M, Py NA, García-González L, et al. Proamyloidogenic effects of membrane type 1 matrix metalloproteinase involve MMP-2 and BACE-1 activities, and the modulation of APP trafficking. *FASEB J* 2019;33:2910–27.
56. Jefferson T, Čaušević M, Keller U, et al. Metalloprotease meprin beta generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo. *J Biol Chem* 2011;286:27741–50.
57. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018;10.
58. Kang S, Narazaki M, Metwally H, Kishimoto T. Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. *J Exp Med* 2020;217.
59. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:878–88.
60. Schreiber S, Aden K, Bernardes JP, et al. Therapeutic Interleukin-6 Trans-signaling Inhibition by Olamkicept (sgp130Fc) in Patients With Active Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2021;160:2354-2366.e11.
61. Findeisen M, Allen TL, Henstridge DC, et al. Treatment of type 2 diabetes with the designer cytokine IC7Fc. *Nature* 2019;574:63–8.

- 62.** Rose-John S. Local and systemic effects of interleukin-6 (IL-6) in inflammation and cancer. *FEBS Lett* 2022;596:557–66.
- 63.** Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity, Defining a role for IL-6. *The Journal of Immunology* 2005;175:3463–8.
- 64.** Klimpel GR. Soluble factor(s) from LPS-activated macrophages induce cytotoxic T cell differentiation from alloantigen-primed spleen cells. *The Journal of Immunology* 1980;125:1243–9.
- 65.** Hirano T, Yasukawa K, Harada H, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986;324:73–6.
- 66.** Hirano T. Revisiting the 1986 molecular cloning of interleukin 6. *Front Immunol* 2014;5:456.
- 67.** Andus T, Geiger T, Hirano T, et al. Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS Lett* 1987;221:18–22.
- 68.** Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 2015;16:448–57.
- 69.** Rose-John S, Jenkins BJ, Garbers C, Moll JM, Scheller J. Targeting IL-6 trans-signalling, Past, present and future prospects. *Nat Rev Immunol* 2023:1–16.
- 70.** Fraunberger P, Wang Y, Holler E, et al. Prognostic value of interleukin 6, procalcitonin, and C-reactive protein levels in intensive care unit patients during first increase of fever. *Shock* 2006;26:10–2.
- 71.** Mroczko B, Groblewska M, Gryko M, Kedra B, Szmitkowski M. Diagnostic usefulness of serum interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) in the differentiation between pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *J Clin Lab Anal* 2010;24:256–61.
- 72.** Panichi V, Maggiore U, Taccola D, et al. Interleukin-6 is a stronger predictor of total and cardiovascular mortality than C-reactive protein in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1154–60.
- 73.** Müllberg J, Schooltink H, Stoyan T, et al. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol* 1993;23:473–80.
- 74.** Schumacher N, Schmidt S, Schwarz J, et al. Circulating Soluble IL-6R but Not ADAM17 Activation Drives Mononuclear Cell Migration in Tissue Inflammation. *J Immunol* 2016;197:3705–15.

- 75.** Matthews V, Schuster B, Schütze S, et al. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem* 2003;278:38829–39.
- 76.** Heink S, Yogev N, Garbers C, et al. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol* 2017;18:74–85.
- 77.** Murphy K, Weaver C. Janeway Immunologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018. ISBN: 978-3-662-56003-7.
- 78.** Schöbitz B, Pezeshki G, Pohl T, et al. Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo. *FASEB J* 1995;9:659–64.
- 79.** Barkhausen T, Tschernig T, Rosenstiel P, et al. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Crit Care Med* 2011;39:1407–13.
- 80.** Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, et al. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol* 1997;15:142–5.
- 81.** Jostock T, Müllberg J, Ozbek S, et al. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem* 2001;268:160–7.
- 82.** Diamant M, Rieneck K, Mehti N, et al. Cloning and expression of an alternatively spliced mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 signal transducer gp130. *FEBS Lett* 1997;412:379–84.
- 83.** Müller SA, Shmueli MD, Feng X, et al. The Alzheimer's disease-linked protease BACE1 modulates neuronal IL-6 signaling through shedding of the receptor gp130. *Mol Neurodegener* 2023;18:13.
- 84.** Riethmueller S, Somasundaram P, Ehlers JC, et al. Proteolytic Origin of the Soluble Human IL-6R In Vivo and a Decisive Role of N-Glycosylation. *PLoS Biol* 2017;15:e2000080.
- 85.** Garbers C, Monhasery N, Aparicio-Siegmund S, et al. The interleukin-6 receptor Asp358Ala single nucleotide polymorphism rs2228145 confers increased proteolytic conversion rates by ADAM proteases. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:1485–94.
- 86.** Ferreira RC, Freitag DF, Cutler AJ, et al. Functional IL6R 358Ala allele impairs classical IL-6 receptor signaling and influences risk of diverse inflammatory diseases. *PLoS Genet* 2013;9:e1003444.

- 87.** Aparicio-Siegmund S, Garbers Y, Flynn CM, et al. The IL-6-neutralizing sIL-6R-sgp130 buffer system is disturbed in patients with type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2019;317:E411-E420.
- 88.** Atreya R, Mudter J, Finotto S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation, Evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000;6:583–8.
- 89.** Zhang S, Chen B, Wang B, et al. Effect of Induction Therapy With Olamkicept vs Placebo on Clinical Response in Patients With Active Ulcerative Colitis, A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2023;329:725–34.
- 90.** Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012;52:199–219.
- 91.** Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S. Interleukin-6, Designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nat Rev Drug Discov* 2018;17:395–412.
- 92.** RECOVERY Collaborative Group. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY), A randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet* 2021;397:1637–45.
- 93.** Garbers C, Scheller J. Interleukin-6 and interleukin-11, Same same but different. *Biol Chem* 2013;394:1145–61.
- 94.** Lokau J, Nitz R, Agthe M, et al. Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling. *Cell Rep* 2016;14:1761–73.
- 95.** Koch L, Kespohl B, Agthe M, et al. Interleukin-11 (IL-11) receptor cleavage by the rhomboid protease RHBDL2 induces IL-11 trans-signaling. *FASEB J* 2021;35:e21380.
- 96.** Lamertz L, Rummel F, Polz R, et al. Soluble gp130 prevents interleukin-6 and interleukin-11 cluster signaling but not intracellular autocrine responses. *Sci Signal* 2018;11.
- 97.** Paul SR, Bennett F, Calvetti JA, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:7512–6.
- 98.** Kaye JA. FDA licensure of NEUMEGA to prevent severe chemotherapy-induced thrombocytopenia. *Stem Cells* 1998;16 Suppl 2:207–23.
- 99.** Fung KY, Louis C, Metcalfe RD, et al. Emerging roles for IL-11 in inflammatory diseases. *Cytokine* 2022;149:155750.

- 100.** Nieminen P, Morgan NV, Fenwick AL, et al. Inactivation of IL11 signaling causes craniosynostosis, delayed tooth eruption, and supernumerary teeth. *Am J Hum Genet* 2011;89:67–81.
- 101.** Keupp K, Li Y, Vargel I, et al. Mutations in the interleukin receptor IL11RA cause autosomal recessive Crouzon-like craniosynostosis. *Mol Genet Genomic Med* 2013;1:223–37.
- 102.** Schwerd T, Krause F, Twigg SRF, et al. A variant in IL6ST with a selective IL-11 signaling defect in human and mouse. *Bone Res* 2020;8:24.
- 103.** Agthe M, Garbers Y, Putoczki T, Garbers C. Interleukin-11 classic but not trans-signaling is essential for fertility in mice. *Placenta* 2017;57:13–6.
- 104.** Nitz R, Lokau J, Aparicio-Siegmund S, Scheller J, Garbers C. Modular organization of Interleukin-6 and Interleukin-11 α -receptors. *Biochimie* 2015;119:175–82.
- 105.** Lokau J, Kespol B, Kirschke S, Garbers C. The role of proteolysis in interleukin-11 signaling. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2022;1869:119135.
- 106.** Gearing DP, Ziegler SF, Comeau MR, et al. Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1119–23.
- 107.** Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36:59–74.
- 108.** DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 1987;7:379–87.
- 109.** Riethmueller S, Ehlers JC, Lokau J, et al. Cleavage Site Localization Differentially Controls Interleukin-6 Receptor Proteolysis by ADAM10 and ADAM17. *Sci Rep* 2016;6:25550.
- 110.** Schlomann U, Koller G, Conrad C, et al. ADAM8 as a drug target in pancreatic cancer. *Nat Commun* 2015;6:6175.
- 111.** Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, et al. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 2003;102:1186–95.

- 112.** Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;7:1513–23.
- 113.** Sakurai-Yageta M, Recchi C, Le Dez G, et al. The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *J Cell Biol* 2008;181:985–98.
- 114.** Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463–7.
- 115.** Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 1985;150:76–85.
- 116.** Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- 117.** Trad A, Hedemann N, Shomali M, Pawlak V, Grötzinger J, Lorenzen I. Development of sandwich ELISA for detection and quantification of human and murine a disintegrin and metalloproteinase17. *J Immunol Methods* 2011;371:91–6.
- 118.** Yamamoto K, Trad A, Baumgart A, et al. A novel bispecific single-chain antibody for ADAM17 and CD3 induces T-cell-mediated lysis of prostate cancer cells. *Biochem J* 2012;445:135–44.
- 119.** Chalaris A, Rabe B, Paliga K, et al. Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* 2007;110:1748–55.
- 120.** Sammel M, Peters F, Lokau J, et al. Differences in Shedding of the Interleukin-11 Receptor by the Proteases ADAM9, ADAM10, ADAM17, Meprin α , Meprin β and MT1-MMP. *Int J Mol Sci* 2019;20.
- 121.** Althoff K, Reddy P, Voltz N, Rose-John S, Müllberg J. 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* 2000;267:2624–31.
- 122.** Le Gall SM, Bobé P, Reiss K, et al. 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* 2009;20:1785–94.
- 123.** Dovey HF, John V, Anderson JP, et al. Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem* 2001;76:173–81.

- 124.** Winer A, Adams S, Mignatti P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy, Turning Past Failures Into Future Successes. *Mol Cancer Ther* 2018;17:1147–55.
- 125.** Weber S, Saftig P. Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development* 2012;139:3693–709.
- 126.** Doedens JR, Black RA. Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem* 2000;275:14598–607.
- 127.** Groth E, Pruessmeyer J, Babendreyer A, et al. Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863:2795–808.
- 128.** Stoeck A, Keller S, Riedle S, et al. A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J* 2006;393:609–18.
- 129.** Bertram A, Lovric S, Engel A, et al. Circulating ADAM17 Level Reflects Disease Activity in Proteinase-3 ANCA-Associated Vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2015;26:2860–70.
- 130.** Sun Q, Hampel H, Blennow K, et al. Increased plasma TACE activity in subjects with mild cognitive impairment and patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2014;41:877–86.
- 131.** Conrad C, Dorzweiler K, Miller MA, Lauffenburger DA, Strik H, Bartsch JW. Profiling of metalloprotease activities in cerebrospinal fluids of patients with neoplastic meningitis. *Fluids Barriers CNS* 2017;14:22.
- 132.** Jiang H, Hampel H, Prvulovic D, et al. Elevated CSF levels of TACE activity and soluble TNF receptors in subjects with mild cognitive impairment and patients with Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2011;6:69.
- 133.** Bostanci N, Emingil G, Afacan B, et al. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE) levels in periodontal diseases. *J Dent Res* 2008;87:273–7.
- 134.** Li X, Magenheimer BS, Xia S, et al. A tumor necrosis factor-alpha-mediated pathway promoting autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Med* 2008;14:863–8.

8. Danksagung

Zunächst möchte ich Christoph für die Möglichkeit danken, in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen. Vielen Dank für die großartige wissenschaftliche Ausbildung die ich bei dir genießen durfte, die vielfältigen Möglichkeiten unterschiedlichen Fragestellungen nachzugehen, die wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Diskussionen, der Möglichkeit zur Teilnahme an internationalen Tagungen und der Veröffentlichung in wissenschaftlichen Journalen und deine immerwährende Unterstützung.

Zudem möchte ich der IRTG des SFB 877 danken, dessen Stipendium diese Promotion ermöglicht hat.

Ich möchte an dieser Stelle noch das großartige Arbeitsklima in der AG Becker-Pauly hervorheben, das insbesondere durch die Möglichkeit der Zerstreuung durch den Bierclub und den Arbeitsgruppen-Retreats gestärkt wird.

Dann möchte ich mich natürlich bei allen lieben Menschen bedanken, die meine Zeit in der Biochemie durch ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und die tolle Zusammenarbeit bereichert haben. Es sind insbesondere zu nennen: Lui, Franka, Flo, Luisa, Fred, Anne, Cynthia, Nico, Kriti, Kira, Antonia, Nele, Melanie, Inez, Petra, Gamze

Insbesondere möchte ich mich bei Flo und Franka für die Betreuung meiner Arbeit, die vielfältigen Hilfestellungen und die gemeinsame Zeit, die mich sehr bereichert hat, bedanken.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und meinen langjährigen Freundinnen und Freunden die immer für mich da waren und die ich sehr schätze: Hannah, Stevie, Tobi, Ali und Christian

und natürlich den seit Kiel dazugekommenen: Anne, Tobi, Anna, Lui, Nico und Michi

Meine besten Jahre an der CAU waren die am Institut für Biochemie.

9. Veröffentlichungen

- **Sammel M**, Peters F, Lokau J, Scharfenberg F, Werny L, Linder S, Garbers C, Rose-John S, Becker-Pauly C. (2019) Differences in Shedding of the Interleukin-11 Receptor by the Proteases ADAM9, ADAM10, ADAM17, Meprin α , Meprin β and MT1-MMP. **Int J Mol Sci**. 2019 Jul 26
- Scharfenberg F, Helbig A, **Sammel M**, Benzel J, Schlomann U, Peters F, Wichert R, Bettendorff M, Schmidt-Arras D, Rose-John S, Moali C, Lichtenthaler SF, Pietrzik CU, Bartsch JW, Tholey A, Becker-Pauly C. (2020) Degradome of soluble ADAM10 and ADAM17 metalloproteases. **Cell Mol Life Sci**. 2020 Jan, Reproduced with permission from Springer Nature
- Gellrich A, Scharfenberg F, Peters F, **Sammel M**, Helm O, Armbrust F, Schmidt F, Lokau J, Garbers C, Sebens S, Arnold P, Becker-Pauly C. Characterization of the Cancer-Associated Meprin Beta Variants G45R and G89R. **Front Mol Biosci**. 2021 Oct 6



Article

Differences in Shedding of the Interleukin-11 Receptor by the Proteases ADAM9, ADAM10, ADAM17, Meprin α , Meprin β and MT1-MMP

Martin Sammel ¹, Florian Peters ¹, Juliane Lokau ², Franka Scharfenberg ¹, Ludwig Werny ¹, Stefan Linder ³ , Christoph Garbers ², Stefan Rose-John ¹ and Christoph Becker-Pauly ^{1,*}

¹ Institute of Biochemistry, University of Kiel, Otto-Hahn-Platz 9, 24118 Kiel, Germany

² Institute of Pathology, Otto-von-Guericke University Magdeburg, Leipziger Str. 44, 39120 Magdeburg, Germany

³ Institute for Medical Microbiology, Virology and Hygiene, University Medical Center Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany

* Correspondence: cbeckerpauly@biochem.uni-kiel.de

Received: 28 June 2019; Accepted: 25 July 2019; Published: 26 July 2019



Abstract: Interleukin-11 (IL-11) has been associated with inflammatory conditions, bone homeostasis, hematopoiesis, and fertility. So far, these functions have been linked to classical IL-11 signaling via the membrane bound receptor (IL-11R). However, a signaling cascade via the soluble IL-11R (sIL-11R), generated by proteolytic cleavage, can also be induced. This process is called IL-11 trans-signaling. A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and neutrophil elastase were described as ectodomain sheddases of the IL-11R, thereby inducing trans-signaling. Furthermore, previous studies employing approaches for the stimulation and inhibition of endogenous ADAM-proteases indicated that ADAM10, but not ADAM17, can cleave the IL-11R. Herein, we show that several metalloproteases, namely ADAM9, ADAM10, ADAM17, meprin β , and membrane-type 1 matrix metalloprotease/matrix metalloprotease-14 (MT1-MMP/MMP-14) when overexpressed are able to shed the IL-11R. All sIL-11R ectodomains were biologically active and capable of inducing signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) phosphorylation in target cells. The difference observed for ADAM10/17 specificity compared to previous studies can be explained by the different approaches used, such as stimulation of protease activity or making use of cells with genetically deleted enzymes.

Keywords: interleukin; IL-6; IL-11; trans-signaling; metalloproteases; ADAM; MMP; meprin

1. Introduction

IL-11 is a crucial factor in several physiological and pathophysiological signaling pathways [1]. It plays an important role in inflammation, osteogenesis, hematopoiesis, and fertility [1–3]. So far, those functions have only been linked to interleukin-11 (IL-11) signaling via the membrane bound IL-11 receptor (IL-11R). In this so-called classic signaling pathway, IL-11 binds to its membrane bound α -receptor, inducing the dimerization of the ubiquitously expressed β -receptor glycoprotein-130 (gp130) on the same cell. This complex then activates intracellular JAK/STAT, MAPK, PI3K signaling pathways [4–6]. The IL-11R can be released from the cell surface [7] by proteolytic ectodomain-shedding, which is analogous to IL-6R solubilization [8]. Soluble receptors such as sIL-6R and sIL-11R can then bind their ligands, IL-6 or IL-11, respectively, before inducing dimerization of gp130 on distinct cells. This pathway is called trans-signaling. sIL-11R can be found in serum of healthy individuals [7], strongly suggesting a physiological function for IL-11 trans-signaling, as known for sIL-6R [9].

Similar to the IL-6R [10,11], the IL-11R consists of three extracellular domains, an immunoglobulin (Ig)-like domain (D1), two fibronectin type III domains (D2 and D3), a stalk region, which is a 54 amino

acid long stretch connecting the extracellular part to the transmembrane region (TM), followed by an intracellular domain (ICD) [11,12]. The extracellular domains D2 and D3 form the cytokine binding module, which is essential for signaling [9].

Ectodomain-shedding of the IL-11R and IL-6R requires proteolytic cleavage of the receptors within their stalk regions. IL-6 trans-signaling can be proteolytically induced by a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and ADAM17, as well as by meprin α and meprin β [13]. IL-11R shedding has been attributed to ADAM10 and the neutrophil-derived serine protease neutrophil elastase (NE), thereby inducing trans-signaling [7].

Cleavage of the IL-6R by its major sheddase ADAM17 takes place between P³⁵⁵ and V³⁵⁶ [14,15]. For meprin β -mediated cleavage of the IL-6R, the cleavage site at P³⁵⁵/V³⁵⁶ is in too close proximity to the cell surface and thus sterically not accessible [13]. Additionally, the meprin β -generated sIL-6R fragment has a molecular weight of about 50 kDa, which is different from the 70 kDa fragment produced by ADAM17. This indicates that the meprin β cleavage site in the IL-6R stalk region is further N-terminal, as compared to the one used by ADAM17 [13]. So far, no precise cleavage site for the IL-11R has been identified. However, experiments with deletion variants of the IL-11R indicated that R³⁵⁵ in the IL-11R stalk region is important for ADAM10-mediated shedding [7].

ADAM10 and ADAM17 are ubiquitously expressed membrane bound metalloproteases promoting important biological functions. ADAM10 is an essential factor in Notch signaling and ADAM10 knock-out mice resemble the phenotype of Notch deficient animals [16]. ADAM17 plays an essential role in inflammation and cell proliferation by releasing TNF α and ligands of the EGFR [17]. Structurally, ADAM10 and ADAM17 are closely related and exhibit a characteristic domain composition comprising a N-terminal signal peptide followed by a prodomain, a metalloprotease domain, a disintegrin domain, a cysteine-rich domain, a single transmembrane helix, and a cytoplasmic region [18]. ADAM9 is another member of the ADAM family of proteases. It has the same domain topology, except for an EGF-like domain between the cysteine-rich domain and the transmembrane helix [17].

The metalloproteases meprin α and meprin β are multidomain oligomeric metalloproteases playing critical roles in inflammation and maturation of fibrillar collagen [19–21]. Meprin α is cleaved by furin on the secretory pathway and is thus released as a soluble protease, whereas pro-meprin β is expressed as a membrane bound protein and can be activated by matriptase-2 or the bacterial protease RgpB at the cell surface [22–24]. In its inactive proform, meprin β can also be shed from the cell surface by ADAM10 and ADAM17 and subsequently becomes activated by tryptic proteases [24–27]. Prominent substrates of meprins are CD99 [28,29], procollagen [20], mucine 2 [30], as well as IL-6 [31], and the IL-6R [13], highlighting their role in inflammation and extracellular matrix homeostasis and indicate a partially shared substrate pool with ADAM proteases.

Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) as a member of the MMP-family seems to act as a counterpart to meprins by degrading fibrillary collagens I, II, III. It also cleaves ADAM9 [32].

Meprins, as astacin-proteases, together with ADAMs and MMPs, belong to the metzincin superfamily. As described above, these proteases have a partially overlapping substrate pool [19,33–35]. The IL-6R and IL-11R are cleaved within their respective stalk regions [7,13]. The length and amino acid composition of these regions indicate broad susceptibility for proteolysis of both receptors. Hence, we hypothesized that IL-6R and IL-11R are susceptible for shedding by a larger group of proteases.

In this study we employed genetically-modified HEK293T cells deficient for ADAM10 and ADAM17 to avoid basal shedding of the IL-11R by these well-described sheddases. In this proof-of-concept study we were able to specifically address the capability of certain metalloproteases to cleave the IL-11R and the IL-6R. This would not have been possible in the HEK293T wild-type cell-line, which was often used to study ADAM10/17 activity after stimulation with ionomycin or phorbol myristate acetate (PMA), respectively. These compounds however are not solely influencing ADAM10/17 and we therefore compared in a proof-of-concept approach stimulation of endogenous ADAM proteases in HEK293T wild-type cells with retransfection of ADAM10/17 and other metalloproteases on an ADAM10/17-free background.

2. Results

2.1. The IL-11R Is Cleaved by Different Metalloproteases

The IL-11R can, at least in vitro, signal through its membrane bound as well as its soluble form. ADAM10 and neutrophil elastase have been described as sheddases of the IL-11R [7]. We hypothesized that, due to the length of the stalk region and its amino acid composition, the IL-11R should potentially be prone to proteolysis by additional proteases. To further investigate the production of sIL-11R by proteolysis, we transiently transfected human embryonic kidney 293T cells deficient for ADAM10 and ADAM17 (HEK293T ADAM 10/17^{-/-}) with cDNAs coding for IL-11R and different metalloproteases. Indeed, upon cotransfection with ADAM9, meprin β , MT1-MMP, ADAM17, and ADAM10, we could detect sIL-11R in the cell culture supernatant, demonstrating that all these proteases are putative sheddases of the IL-11R (Figure 1A). Of note, among the tested proteases only cotransfected meprin α showed no activity towards the IL-11R.

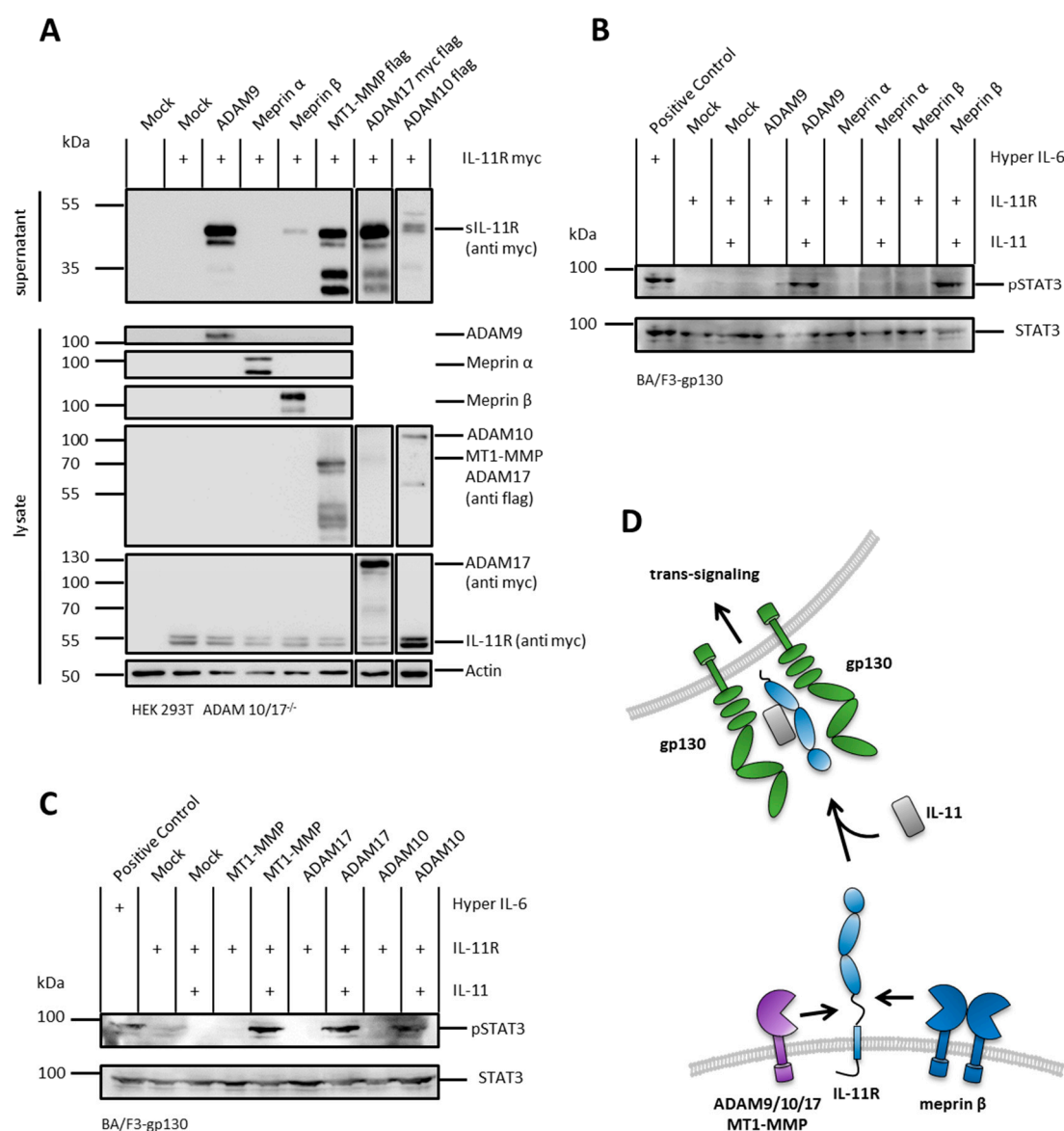


Figure 1. The membrane bound interleukin-11 receptor (IL-11R) is shed by different metalloproteases and induces interleukin-11 (IL-11) trans-signaling. (A) Shedding of the IL-11R in HEK293T ADAM 10/17^{-/-} cells. Cells were transfected with a N-terminally myc-tagged variant of the IL-11R alone or

with ADAM9, meprin α , meprin β , membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP), ADAM17, or ADAM10. Supernatants were ultracentrifuged, trichloroacetic acid (TCA)-precipitated, and analyzed by immunoblotting with an antibody raised against the myc-tag. ADAM9, meprin α , and meprin β were detected with specific antibodies in lysate controls. MT1-MMP was flag-tagged, IL-11R was myc-tagged, and ADAM17 flag-/myc-tagged. pcDNA3.1 served as mock and actin as loading control. Cotransfection of IL-11R and ADAM10 was performed in an independent experiment. **(B)** Phosphorylation of STAT3 in Ba/F3-gp130 cells stably transfected with gp130. Cells were treated with supernatants from the experiments in **(A)** and with recombinant IL-11. Phosphorylation of STAT3 was analyzed for cotransfection experiments of IL-11R with ADAM9, meprin α , and meprin β . A fusion protein consisting of soluble IL-6R and IL-6 (Hyper IL-6) served as positive control for pSTAT3. Mock control from **(A)** served as negative control. Phosphorylation was detected with an antibody raised against phosphorylated STAT3. Total STAT3 protein served as loading control. **(C)** Same experimental setting as in **(B)** but for MT1-MMP, ADAM17, and ADAM10 as IL-11R sheddases. **(D)** Schematic overview of IL-11R shedding by ADAM9, ADAM10, ADAM17, MT1-MMP, and meprin β .

2.2. sIL-11R Shed by Different Metalloproteases Is Able to Induce Phosphorylation of STAT3

It has recently been shown that a complex of IL-11 and sIL-11R is able to induce the JAK/STAT-pathway via phosphorylation of STAT3 [7]. We tested sIL-11R generated by different proteases for biological activity on Ba/F3-gp130 cells. Therefore, we treated these cells with the conditioned media resulting from the cotransfection experiments and with recombinant IL-11. In a second step, the cell lysates were stained for phosphorylated STAT3 to validate biological activity of the IL-11R ectodomains.

Indeed, sIL-11R resulting from cotransfection experiments with the proteases ADAM9, meprin β , MT1-MMP, ADAM17, or ADAM10 (Figure 1A) induced phosphorylation of STAT3, thus proving the ability to induce IL-11 trans-signaling (Figure 1B–D).

2.3. ADAM 10 and ADAM 17 Are Both Able to Shed the IL-11R

To examine cleavage of the IL-11R by ADAM proteases, we either stimulated endogenous ADAM proteases in HEK293T wild-type cells transiently transfected with the IL-11R, or we retransfected HEK293T ADAM 10/17^{-/-} cells with ADAM10 or ADAM17 together with IL-11R. Upon stimulation with the phorbol ester PMA, a strong inducer of ADAM17 activity via activation of Protein Kinase C, shedding of the IL-11R was slightly increased (Figure 2) [36]. Stimulation with ionomycin, which activates ADAM10 via cellular influx of calcium, also induced shedding, albeit to a much higher extent. This implies that ADAM10 is the major sheddase of the IL-11R in HEK293T wild-type cells, as described previously [7]. ADAM17 on the other hand sheds the IL-11R only to a much lower extent. However, upon retransfection of HEK293T ADAM 10/17^{-/-} cells with cDNAs coding for the proteases ADAM10 and ADAM17, shedding of the IL-11R was observed (Figure 2). Interestingly, ionomycin also induced IL-11R shedding in the HEK293T ADAM 10/17^{-/-} cells without retransfection of proteases, indicating that not only ADAM10/17, but also other sheddases of the IL-11R exist, at least in the cell line used herein.

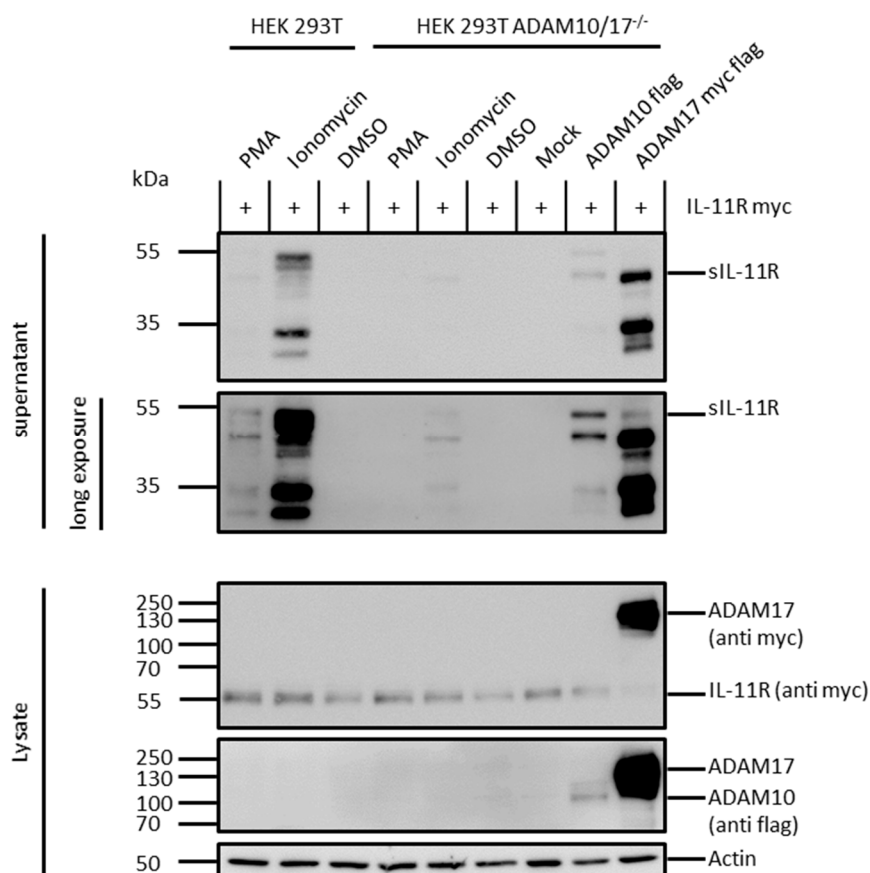


Figure 2. ADAM10 retransfected in HEK293T ADAM 10/17^{-/-} cells is capable of shedding the IL-11R. HEK293T wild-type cells (lanes 1–3) and HEK293T ADAM10/17^{-/-} cells (lanes 4–6) were transfected with a N-terminally myc-tagged variant of the IL-11R and stimulated with phorbol myristate acetate (PMA) or ionomycin. Dimethyl sulfoxide (DMSO) served as control. HEK293T ADAM10/17^{-/-} were transfected with an N-terminally myc-tagged variant of the IL-11R and ADAM10 or ADAM17 (lanes 7–9). For both setups the supernatant was ultracentrifuged, TCA-precipitated, and analyzed by immunoblotting with different antibodies. ADAM10 flag-tagged, IL-11R myc-tagged, and ADAM17 flag/myc-tagged were detected in lysate controls. pcDNA3.1 served as mock and actin as loading control.

2.4. Arginine 355 Is not Obligatory for Ectodomain Shedding of the IL-11R

The cotransfection experiments described above were repeated with an IL-11R variant lacking amino acids H353–S362 (IL-11RΔ353). The amino acid Arg355 is located within the stalk region, which was previously described to be critical for ADAM10-mediated shedding of the IL-11R, as a mutation of arginine to glutamic acid at this position resulted in significantly reduced proteolysis [7]. However, cotransfection of HEK293T ADAM 10/17^{-/-} cells with ADAM9, meprin β, MT1-MMP, ADAM17, or ADAM10 with IL-11RΔ353 resulted in shedding of this IL-11R variant (Figure 3A). Moreover, sIL-11RΔ353 was able to induce trans-signaling, as measured by pSTAT3 in stimulated Ba/F3-gp130 cells (Figure 3B,C).

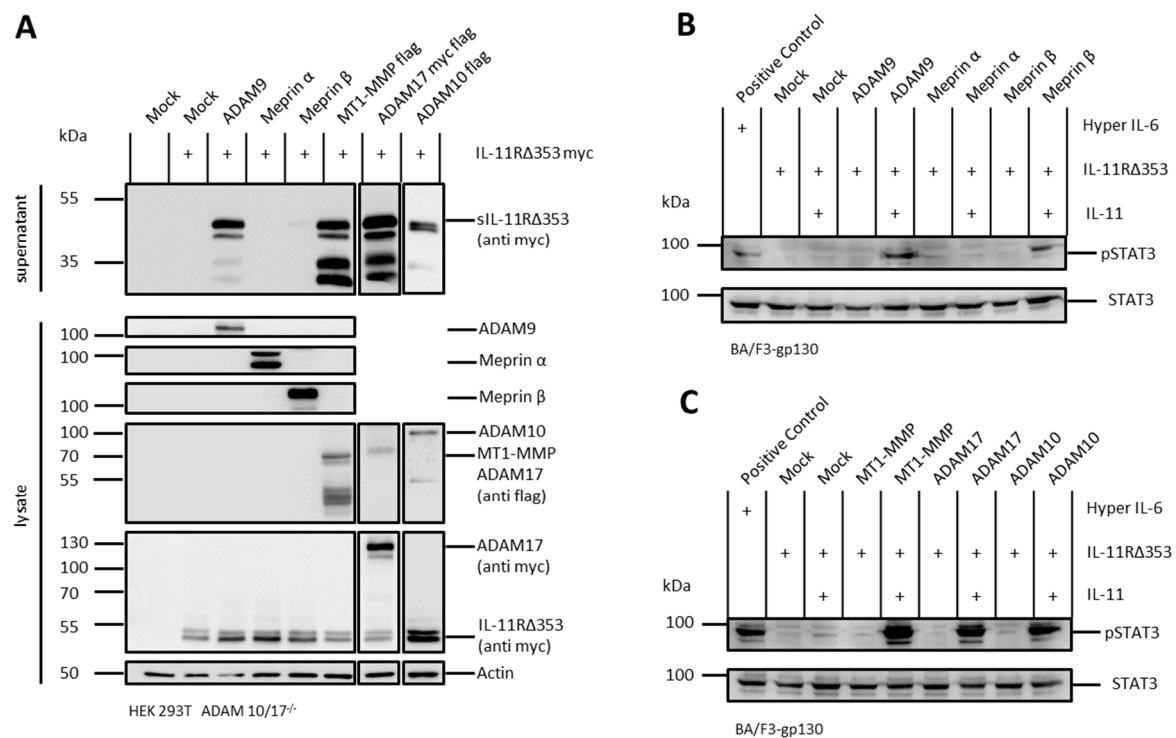


Figure 3. Shedding of the IL-11RΔ353 in HEK293T ADAM10/17^{-/-} cells. **(A)** HEK293T ADAM10/17^{-/-} cells were transfected with a N-terminally myc-tagged variant of the IL-11RΔ353 and ADAM9, meprin α, meprin β, MT1-MMP, ADAM17, or ADAM10. Supernatants were ultracentrifuged, TCA-precipitated, and analyzed by immunoblotting with different antibodies. pcDNA3.1 served as mock and actin as loading control. Cotransfection of IL-11RΔ353 and ADAM10 was performed in an independent experiment. **(B)** Phosphorylation of STAT3 in Ba/F3-gp130 cells stably transfected with gp130. Cells were treated with supernatants from the experiments in **(A)** and with recombinant IL-11. Phosphorylation of STAT3 was analyzed for cotransfection of IL-11RΔ353 with ADAM9, meprin α, and meprin β. A fusion protein consisting of soluble IL-6R and IL-6 (Hyper IL-6) served as positive control. Mock control from **(A)** served as negative control. Phosphorylation was detected with an antibody raised against phosphorylated STAT3. Total STAT3 protein served as loading control. **(C)** Same experimental setting as in **(B)** but for MT1-MMP, ADAM17, and ADAM10 as IL-11RΔ353 sheddases.

2.5. The IL-6R Is Cleaved by Several Metalloproteases

It has been shown that, similarly to the IL-11R, the IL-6R can signal through its membrane bound as well as its soluble form. The sIL-6R can be, comparable to sIL-11R, the result of a proteolytic cleavage event induced by ADAMs or meprins [7,13]. To analyze the production of sIL-6R by proteolysis, we applied the same experimental setting as for the cotransfection with the IL-11R. Upon cotransfection with ADAM9, meprin α, meprin β, MT1-MMP, ADAM17, or ADAM10, we could detect sIL-6R in the cell culture supernatants, thus demonstrating that the IL-6R can be shed by all these proteases (Figure 4A).

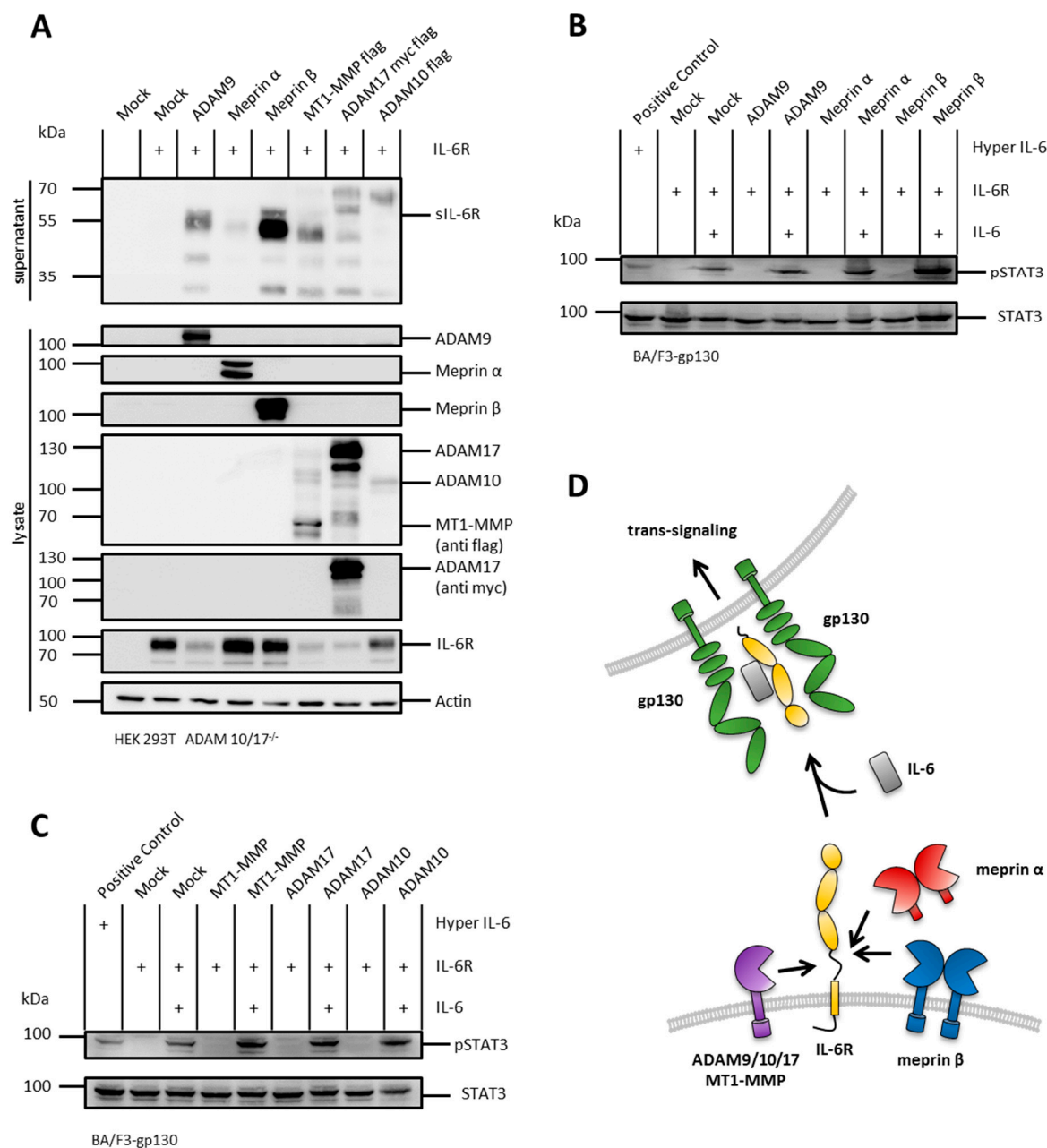


Figure 4. The IL-6R is shed by different metalloproteases and induces IL-6 trans-signaling. (A) HEK293T ADAM10/17^{-/-} cells were transfected with IL-6R and/or ADAM9, meprin α, meprin β, MT1-MMP, ADAM17, or ADAM10. Supernatants were ultracentrifuged, TCA-precipitated, and analyzed by immunoblotting with an antibody raised against the D1-domain of the IL-6R. ADAM9, meprin α, and meprin β were detected with specific antibodies in lysate controls. MT1-MMP and ADAM10 are flag-tagged and ADAM17 flag-/myc-tagged and detected respectively in lysate controls. pcDNA3.1 served as mock and actin as loading control. (B) Phosphorylation of STAT3 in Ba/F3-gp130 cells stably transfected with gp130. Cells were treated with supernatants from the experiments in (A) and with recombinant IL-6. Phosphorylation of STAT3 was analyzed for cotransfection with ADAM9, meprin α, and meprin β. A fusion protein consisting of soluble IL-6R and IL-6 (Hyper IL-6) served as positive control. Mock control from (A) served as negative control. Phosphorylation was detected with an antibody raised against phosphorylated STAT3. Total STAT3 protein served as loading control. (C) Same experimental setting as in (B) but for MT1-MMP, ADAM17, and ADAM10 as IL-6R sheddases. (D) Schematic overview of IL-6R shedding by ADAM9, ADAM10, ADAM17, MT1-MMP, meprin α, and meprin β.

Similar to the above described IL-11R shedding and trans-signaling experiments (Figure 1A–D, Figure 3A–C), the proteases ADAM9, meprin α , meprin β , MT1-MMP, ADAM17, and ADAM10 induced phosphorylation of STAT3 by shedding of the IL-6R, thus proving the ability to also induce IL-6 trans-signaling (Figure 4A–D).

2.6. N-Terminal Cleavage of the IL-6R and the IL-11R Apart from the Stalk Regions

The results from the cotransfection experiments showed that at least two different shedding sites within the stalk region of the IL-6R can be assessed, which are in accordance with previous studies [13]. Conclusively, this resulted in a 70 kDa fragment produced by ADAM10 and ADAM17 and a 50 kDa fragment produced by ADAM9, meprin α , meprin β , MT1-MMP, and ADAM17 (Figure 4A). Of note, cotransfection with ADAM9, meprin β , MT1-MMP, ADAM10, or ADAM17 led to additional fragments of about 30 kDa and/or 40 kDa. Immunodetection of the cell culture supernatants was performed with an antibody raised against the D1-domain of the IL-6R. Therefore, these two fragments could be the product of cleavage events within the linker regions between domains D3 and D2, as well as D2 and D1.

Comparable to IL-6R-, also IL-11R cleavage results in multiple fragments. Upon stimulation of HEK293T wild-type cells, as well as cotransfection of HEK293T ADAM 10/17^{-/-} cells with different proteases, a characteristic pattern of at least four different receptor bands appeared (Figures 1A, 2 and 3A). This implied that there could be more than one cleavage site within the IL-11R. The two bands between 35 and 55 kDa likely represent shedding within the stalk region resulting in the full-length soluble receptor. The bands at 30 and 35 kDa could be due to cleavage in the linker region between extracellular domains D1 to D3. Analogous to the IL-6R, this band pattern underlines cleavage specificities for the different proteases.

3. Discussion

The pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-11 fulfill several important functions. IL-6 is an important mediator in the innate and acquired immune system, involved in differentiation of T-cells, release of c-reactive protein [9], and acts as acute phase trigger [6]. IL-6 trans-signaling is driven by ectodomain shedding of the IL-6R and has been shown to be a critical event in inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease [9]. IL-11 is involved in hematopoiesis, especially production of thrombocytes, which led to its approval as the drug ‘Oprelvekin’ for the treatment of chemotherapy-induced thrombocytopenia [7]. Additionally, IL-11 can activate the hepatic acute phase response [37]. IL-11R knock-out mice underlined an important role in fertility [2] and bone homeostasis [3], as IL-11R knock-out mice show elevated bone density. Mutations within the ectodomain of the IL-11R are associated with craniosynostosis [2,3] and gastric tumorigenesis [38,39]. Moreover, IL-11 is produced by osteoblasts, which further implies a possible role of IL-11 signaling in osteoporosis [40]. For IL-11 trans-signaling, no definite physiological or pathophysiological event has been defined so far, although, sIL-11R can be detected in the plasma of healthy individuals [7]. We could detect both IL-11R shedding and IL-11 trans-signaling in vitro, which strongly suggests an in vivo function for sIL-11R, as demonstrated for sIL-6R.

In this study, we demonstrated that ectodomain-shedding and subsequent induction of trans-signaling of the IL-6R and the IL-11R can be mediated by different metalloproteases. We hypothesize that the length and amino acid composition of both receptors are the reason for their broad susceptibility for proteolysis, which in turn underlines the importance of this trans-signaling event.

So far, possible sheddases of the IL-11R have been identified on the basis of stimulation experiments to induce proteolytic activity of endogenous ADAM10 and ADAM17 in HEK293T wild-type cells [7]. However, stimulation with PMA or ionomycin may additionally induce other proteases besides ADAM10/17 potentially cleaving the IL-11R and IL-6R. To address this issue in a genetically modified system, we employed HEK293T cells deficient for ADAM10 and ADAM17 and retransfected these cells

with the proteases and the IL-11R, which allowed us to associate the shedding events precisely with the transfected proteases. Of note, retransfection of the genetically-modified HEK293T cells resulted in some experiments in slightly higher expression levels of ADAM10/17 compared to HEK293T wild-type cells. However, we used this system in a proof-of-concept approach to demonstrate the biochemical capability of certain proteases to cleave the IL-11R and IL-6R. Indeed, we observed shedding of the IL-6R and the IL-11R by several metalloproteases, which resulted in receptor fragments of different sizes, indicating cleavage events in different regions within the receptors. For the IL-6R, two different shedding sites within the stalk region have already been discussed [13]. However, two additional fragments appeared upon cotransfection of the IL-6R with ADAM9, meprin β , MT1-MMP, or ADAM17. We hypothesize that those fragments represent cleavage in the linker regions in between the ectodomains D3 and D2, as well as D2 and D1. Meprin α seemed to solely target the stalk region of the IL-6R, resulting in a fragment of about 50 kDa, whereas ADAM10 seemed to cleave within the stalk region as well as within the linker region between domains D2 and D1.

A comparable band pattern occurred in the cotransfection with the IL-11R. The bands at 30 and 35 kDa could represent cleavage events in the linker region between extracellular domains D1 to D3. Analogous to the IL-6R, this band pattern underlines different cleavage specificities for the tested proteases.

Overall, we observed clear differences between the pharmacological and genetically-modified approaches, which has to be considered, particularly with regard to therapeutic manipulation of IL-6/11 signaling.

In sum, the physiological and pathophysiological functions of IL-6 trans-signaling have been studied to a great extent in health and disease [1,9]. In this proof-of-concept study we showed that the IL-11 trans-signaling can be induced by ADAM9, meprin β , MT1-MMP, ADAM10, or ADAM17 in vitro. Future experiments will show if this concept also holds true in vivo. A possibility to address potential pathological impact of some of the proteases analyzed in this study would be the generation of knock-in mouse models to induce protease-specific expression in certain tissues under diseased conditions.

4. Material and Methods

4.1. Chemicals

All chemicals were of analytical grade and obtained from Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany), Merck KGaA (Darmstadt, Germany), Sigma Aldrich Inc. (Darmstadt, Germany) and Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA), if not stated otherwise.

4.2. Cells

HEK293T wild-type (DSMZ GmbH, Braunschweig, Germany) and HEK293T ADAM 10/17^{-/-} cells (kindly provided by Dr. Björn Rabe [41]) were maintained in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; GibcoTM, Waltham, Massachusetts, USA) with GlutaMAXTM supplemented with 10% (v/v) FCS, 100 units/L penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 50 μ g/mL Gentamycin.

Ba/F3-gp130 cells [42], which have been stably transfected with gp130 cDNA and therefore respond to the IL-6/sIL-6R or IL-11/sIL-11R complexes [43], were maintained in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; GibcoTM) with GlutaMAXTM supplemented with 10% (v/v) FCS, 100 units/L penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 50 μ g/mL Gentamycin, and 10 ng/mL Hyper-IL-6. All cells were kept under humidified conditions (5% CO₂) at 37 °C.

4.3. Plasmids

- pcDNA 3.1
- murine ADAM9 in pcDNA 3.1
- human ADAM10 flag-tagged in pcDNA4/TO
- human ADAM17 DDK in pCMV6: purchased on Origene

- human meprin α in pSG5
- human meprin β in pSG5
- human IL-11R N:myc, C:HA in pcDNA3.1
- human IL-11R in pcDNA 3.1 lacking H353-S362
- human MT1-MMP flag-tagged in pcDNA4/TO
- human IL-6R in pcDNA 3.1
- Sequences were confirmed by Sanger-sequencing.

4.4. Shedding Assay

A total of $2.5\text{--}3 \times 10^6$ cells per dish were transiently transfected with an N-terminally myc and C-terminally HA-tagged variant of the IL-11R or different proteases and the IL-11R. pcDNA 3.1 alone was used as mock-control. In the same experimental setting, a N-terminally myc-tagged IL-11R variant lacking amino acids H353-S362 was cotransfected with the proteases. Polyethylenimine (PEI, Polysciences Europe GmbH) was used as transfection-reagent. For cell transfections, plasmids and PEI were mixed in a ratio of 1:3 in serum-free medium. After 30 min of incubation at room temperature, the transfection-mixture was added to the cell culture in a total volume of 5 mL. After incubation for 5 h, an additional 5 mL of medium was added and incubation was continued overnight. Cell culture medium was replaced with serum-free medium for additional 24 h. For the detection of soluble receptors, the supernatant was collected and cleared by centrifugation ($500\times g$, 10 min, room temperature). Additionally, the cell culture supernatant was ultracentrifuged at $186,000\times g$ for 2 h at 4°C . Cell culture supernatants were normalized to the amount of protein of the respective cell lysates and analyzed by immunoblotting. For concentration of proteins, respective cell culture supernatants were precipitated with trichloroacetic acid (TCA 10% (*w/v*)) following incubation on ice for 60 min. Afterwards proteins were pelleted ($15,000\times g$, 15 min, 4°C), washed with ice cold acetone, and dissolved in sample-buffer.

4.5. ADAM10/17 Stimulation

HEK293T wild-type and HEK293T ADAM10/17^{-/-} cells were transfected (as described above) with the IL-11R. Afterwards, cells were washed twice with sterile PBS and cell culture medium was replaced with serum-free medium. Cells were then stimulated by adding PMA (100 nM) for 2 h or ionomycin (1 μM) for 1 h. Dimethyl sulfoxide (DMSO) served as control. Cells were harvested and lysed (as described below) and cell culture supernatants were analyzed (as described previously) [7].

4.6. Phosphorylation Assay

Ba/F3-gp130 cells were washed four times with sterile PBS and incubated in serum-free medium for 2 h. A total of 10^6 cells per vial were suspended in 300 μL conditioned medium (shedding assay) and either 150 ng recombinant IL-11 or 150 ng Hyper-IL-6 [7,13] was added. Cells were incubated at 37°C , shaking at 500 rpm, for 15 min before centrifugation at $500\times g$ for 3 min at room temperature. The supernatant was discarded, and the cell-pellet was boiled in sample-buffer. SDS-PAGE and immunoblot analysis were performed to analyze protein expression and protein phosphorylation.

4.7. Cell Lysis, SDS-PAGE, and Immunoblot Analysis

Transfected cells were harvested in ice-cold PBS and centrifuged at $1000\times g$ for 10 min at 4°C . Cell pellets were washed three times with PBS prior to resuspension in lysis buffer (cOmpleteTM protease inhibitor cocktail, 1% (*v/v*) Triton-X 100, PBS, pH 7.4) before incubation on ice for 45 min. Afterwards, the cell-suspension was centrifuged at $15,000\times g$ at 4°C for 15 min and the protein amount was determined using a BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Cell culture supernatants were normalized to the protein content of the respective cell lysates to ensure a comparable analysis. Protein samples were boiled in sample buffer containing DTT. After separation by SDS-PAGE proteins

were transferred on nitrocellulose membranes by blotting, which were then saturated with 5% dry milk or 3% BSA for 1 h at room temperature. The membranes were then incubated with primary antibody at 4 °C overnight. After washing in TBS, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific Inc.) in 5% dry milk or TBS for 1 h at room temperature. Chemiluminescence was detected using the Super Signal™ West Femto kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) with the LAS-3000 Imaging System (FUJIFILM Europe GmbH). The following antibodies were used for detection: anti-meprin α /meprin β (polyclonal Abs, generated against ectodomains; Pineda); anti-Myc (# 2276, Cell Signaling Technology, Inc., Cambridge, UK); anti-Flag (F1804, clone M2, Sigma-Aldrich); anti-ADAM9 (polyclonal Ab, kindly provided by Carl Blobel); anti-Actin (#097M4883V, Sigma-Aldrich Inc.); anti-IL-6R (4-11 monoclonal, generated against the D1-domain); and anti-pSTAT3 (#9131 (Tyr705), Cell signaling Technology, Inc.); anti-STAT3 (#9139 (124H6), Cell signaling Technology, Inc.).

Author Contributions: M.S., F.P., F.S. and C.B.-P. designed experiments and interpreted the data. M.S. conducted the experiments. J.L., L.W., S.L., C.G., and S.R.-J. provided material. M.S. and C.B.-P. wrote and edited the manuscript.

Funding: This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) SFB 877 (Proteolysis as a Regulatory Event in Pathophysiology, Projects A1, A9, A10, A14, and B13).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Garbers, C.; Scheller, J. Interleukin-6 and interleukin-11: Same same but different. *Biol. Chem.* **2013**, *394*, 1145–1161. [[CrossRef](#)]
- Agthe, M.; Garbers, Y.; Putoczki, T.; Garbers, C. Interleukin-11 classic but not trans-signaling is essential for fertility in mice. *Placenta* **2017**, *57*, 13–16. [[CrossRef](#)]
- Nieminen, P.; Morgan, N.V.; Fenwick, A.L.; Parmanen, S.; Veistinen, L.; Mikkola, M.L.; van der Spek, P.J.; Giraud, A.; Judd, L.; Arte, S.; et al. Inactivation of IL11 signaling causes craniosynostosis, delayed tooth eruption, and supernumerary teeth. *Am. J. Hum. Genet.* **2011**, *89*, 67–81. [[CrossRef](#)]
- Hilton, D.J.; Hilton, A.A.; Raicevic, A.; Rakar, S.; Harrison-Smith, M.; Gough, N.M.; Begley, C.G.; Metcalf, D.; Nicola, N.A.; Willson, T.A. Cloning of a murine IL-11 receptor alpha-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction. *EMBO J.* **1994**, *13*, 4765–4775. [[CrossRef](#)]
- Zhang, X.G.; Gu, J.J.; Lu, Z.Y.; Yasukawa, K.; Yancopoulos, G.D.; Turner, K.; Shoyab, M.; Taga, T.; Kishimoto, T.; Bataille, R.; et al. Ciliary neurotrophic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130. *J. Exp. Med.* **1994**, *179*, 1337–1342. [[CrossRef](#)]
- Garbers, C.; Hermanns, H.M.; Schaper, F.; Muller-Newen, G.; Grotzinger, J.; Rose-John, S.; Scheller, J. Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2012**, *23*, 85–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lokau, J.; Nitz, R.; Agthe, M.; Monhasery, N.; Aparicio-Siegmund, S.; Schumacher, N.; Wolf, J.; Moller-Hackbarth, K.; Waetzig, G.H.; Grotzinger, J.; et al. Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling. *Cell Rep.* **2016**, *14*, 1761–1773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Müllberg, J.; Schooltink, H.; Stoyan, T.; Günther, M.; Graeve, L.; Buse, G.; Mackiewicz, A.; Heinrich, P.; Rose-John, S. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol.* **1993**, *23*, 473–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Garbers, C.; Heink, S.; Korn, T.; Rose-John, S. Interleukin-6: Designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 395–412. [[CrossRef](#)]
- Yawata, H.; Yasukawa, K.; Natsuka, S.; Murakami, M.; Yamasaki, K.; Hibi, M.; Taga, T.; Kishimoto, T. 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.* **1993**, *12*, 1705–1712. [[CrossRef](#)]

11. Nitz, R.; Lokau, J.; Aparicio-Siegmund, S.; Scheller, J.; Garbers, C. Modular organization of Interleukin-6 and Interleukin-11 alpha-receptors. *Biochimie* **2015**, *119*, 175–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Sprecher, C.A.; Grant, F.J.; Baumgartner, J.W.; Presnell, S.R.; Schrader, S.K.; Yamagiwa, T.; Whitmore, T.E.; O'Hara, P.J.; Foster, D.F. Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *246*, 82–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Arnold, P.; Boll, I.; Rothaug, M.; Schumacher, N.; Schmidt, F.; Wichert, R.; Schneppenheim, J.; Lokau, J.; Pickhinke, U.; Koudelka, T.; et al. Meprin Metalloproteases Generate Biologically Active Soluble Interleukin-6 Receptor to Induce Trans-Signaling. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Goth, C.K.; Halim, A.; Khetarpal, S.A.; Rader, D.J.; Clausen, H.; Schjoldager, K.T. A systematic study of modulation of ADAM-mediated ectodomain shedding by site-specific O-glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 14623–14628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Riethmueller, S.; Somasundaram, P.; Ehlers, J.C.; Hung, C.W.; Flynn, C.M.; Lokau, J.; Agthe, M.; Dusterhoft, S.; Zhu, Y.; Grotzinger, J.; et al. Proteolytic Origin of the Soluble Human IL-6R In Vivo and a Decisive Role of N-Glycosylation. *PLoS Biol.* **2017**, *15*, e2000080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Qi, H.; Rand, M.D.; Wu, X.; Sestan, N.; Wang, W.; Rakic, P.; Xu, T. Artavanis-Tsakonas, S. Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* **1999**, *283*, 91–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Matthews, A.L.; Noy, P.J.; Reyat, J.S.; Tomlinson, M.G. Regulation of A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family sheddases ADAM10 and ADAM17: The emerging role of tetraspanins and rhomboids. *Platelets* **2017**, *28*, 333–341. [[CrossRef](#)]
18. Janes, P.W.; Saha, N.; Barton, W.A.; Kolev, M.V.; Wimmer-Kleikamp, S.H.; Nievergall, E.; Blobel, C.P.; Himanen, J.P.; Lackmann, M.; Nikolov, D.B. Adam meets Eph: An ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* **2005**, *123*, 291–304. [[CrossRef](#)]
19. Herzog, C.; Haun, R.S.; Kaushal, G.P. Role of meprin metalloproteinases in cytokine processing and inflammation. *Cytokine* **2019**, *114*, 18–25. [[CrossRef](#)]
20. Prox, J.; Arnold, P.; Becker-Pauly, C. Meprin alpha and meprin beta: Procollagen proteinases in health and disease. *Matrix Biol.* **2015**, *44–46*, 7–13. [[CrossRef](#)]
21. Broder, C.; Arnold, P.; Vadon-Le Goff, S.; Konerding, M.A.; Bahr, K.; Muller, S.; Overall, C.M.; Bond, J.S.; Koudelka, T.; Tholey, A.; et al. Metalloproteases meprin alpha and meprin beta are C- and N-procollagen proteinases important for collagen assembly and tensile strength. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 14219–14224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Broder, C.; Becker-Pauly, C. The metalloproteases meprin alpha and meprin beta: unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. *Biochem. J.* **2013**, *450*, 253–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Jackle, F.; Schmidt, F.; Wichert, R.; Arnold, P.; Prox, J.; Mangold, M.; Ohler, A.; Pietrzik, C.U.; Koudelka, T.; Tholey, A.; et al. Metalloprotease meprin beta is activated by transmembrane serine protease matriptase-2 at the cell surface thereby enhancing APP shedding. *Biochem. J.* **2015**, *470*, 91–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wichert, R.; Ermund, A.; Schmidt, S.; Schweinlin, M.; Ksiazek, M.; Arnold, P.; Knittler, K.; Wilkens, F.; Potempa, B.; Rabe, B.; et al. Mucus Detachment by Host Metalloprotease Meprin beta Requires Shedding of Its Inactive Pro-form, which Is Abrogated by the Pathogenic Protease RgpB. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 2090–2103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Johnson, G.D.; Bond, J.S. Activation Mechanism of Meprins, Members of the Astacin Metalloendopeptidase Family. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 28126–28132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Herzog, C.; Haun, R.S.; Ludwig, A.; Shah, S.V.; Kaushal, G.P. ADAM10 is the major sheddase responsible for the release of membrane-associated meprin A. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 13308–13322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hahn, D.; Pischitzis, A.; Roesmann, S.; Hansen, M.K.; Leuenberger, B.; Luginbuehl, U.; Sterchi, E.E. Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced ectodomain shedding and phosphorylation of the human meprinbeta metalloprotease. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 42829–42839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Bedau, T.; Peters, F.; Prox, J.; Arnold, P.; Schmidt, F.; Finkernagel, M.; Kollmann, S.; Wichert, R.; Otte, A.; Ohler, A.; et al. Ectodomain shedding of CD99 within highly conserved regions is mediated by the metalloprotease meprin beta and promotes transendothelial cell migration. *FASEB J.* **2017**, *31*, 1226–1237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

29. Bedau, T.; Schumacher, N.; Peters, F.; Prox, J.; Arnold, P.; Koudelka, T.; Helm, O.; Schmidt, F.; Rabe, B.; Jentzsch, M.; et al. Cancer-associated mutations in the canonical cleavage site do not influence CD99 shedding by the metalloprotease meprin beta but alter cell migration in vitro. *Oncotarget* **2017**, *8*, 54873–54888. [[CrossRef](#)]
30. Schutte, A.; Ermund, A.; Becker-Pauly, C.; Johansson, M.E.; Rodriguez-Pineiro, A.M.; Backhed, F.; Muller, S.; Lottaz, D.; Bond, J.S.; Hansson, G.C. Microbial-induced meprin beta cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 12396–12401. [[CrossRef](#)]
31. Keiffer, T.R.; Bond, J.S. Meprin metalloproteases inactivate interleukin 6. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 7580–7588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Chan, K.M.; Wong, H.L.; Jin, G.; Liu, B.; Cao, R.; Cao, Y.; Lehti, K.; Tryggvason, K.; Zhou, Z. MT1-MMP inactivates ADAM9 to regulate FGFR2 signaling and calvarial osteogenesis. *Dev. Cell* **2012**, *22*, 1176–1190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Itoh, Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol.* **2015**, *44–46*, 207–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zunke, F.; Rose-John, S. The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 2059–2070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Edwards, D.R.; Handsley, M.M.; Pennington, C.J. The ADAM metalloproteinases. *Mol. Asp. Med.* **2008**, *29*, 258–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lokau, J.; Wandel, M.; Garbers, C. Enhancing Interleukin-6 and Interleukin-11 receptor cleavage. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2017**, *85*, 6–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Baumann, H.; Schendel, P. Interleukin-11 regulates the hepatic expression of the same plasma protein genes as interleukin-6. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 20424–20427. [[PubMed](#)]
38. Balic, J.J.; Garbers, C.; Rose-John, S.; Yu, L.; Jenkins, B.J. Interleukin-11-driven gastric tumorigenesis is independent of trans-signalling. *Cytokine* **2017**, *92*, 118–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Putoczki, T.L.; Thiem, S.; Loving, A.; Busuttill, R.A.; Wilson, N.J.; Ziegler, P.K.; Nguyen, P.M.; Preaudet, A.; Farid, R.; Edwards, K.M.; et al. Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically. *Cancer Cell* **2013**, *24*, 257–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Shaarawy, M.; Zaki, S.; Sheiba, M.; El-Minawi, A.M. Circulating levels of osteoclast activating cytokines, interleukin-11 and transforming growth factor-beta2, as valuable biomarkers for the assessment of bone turnover in postmenopausal osteoporosis. *Clin. Lab.* **2003**, *49*, 625–636. [[PubMed](#)]
41. Riethmueller, S.; Ehlers, J.C.; Lokau, J.; Dusterhoft, S.; Knittler, K.; Dombrowsky, G.; Grotzinger, J.; Rabe, B.; Rose-John, S.; Garbers, C. Cleavage Site Localization Differentially Controls Interleukin-6 Receptor Proteolysis by ADAM10 and ADAM17. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Gearing, D.P.; Ziegler, S.F.; Comeau, M.R.; Friend, D.; Thoma, B.; Cosman, D.; Park, L.; Mosley, B. Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 1119–1123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Lokau, J.; Agthe, M.; Garbers, C. Generation of Soluble Interleukin-11 and Interleukin-6 Receptors: A Crucial Function for Proteases during Inflammation. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*, 1785021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]





Degradome of soluble ADAM10 and ADAM17 metalloproteases

Franka Scharfenberg¹ · Andreas Helbig² · Martin Sammel¹ · Julia Benzel³ · Uwe Schlomann³ · Florian Peters¹ · Rielana Wichert¹ · Maximilian Bettendorff¹ · Dirk Schmidt-Arras⁴ · Stefan Rose-John⁴ · Catherine Moali⁵ · Stefan F. Lichtenthaler^{6,7,8} · Claus U. Pietrzik⁹ · Jörg W. Bartsch³ · Andreas Tholey² · Christoph Becker-Pauly¹

Received: 4 December 2018 / Revised: 10 May 2019 / Accepted: 6 June 2019 / Published online: 17 June 2019
 © Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract

Disintegrin and metalloproteinases (ADAMs) 10 and 17 can release the extracellular part of a variety of membrane-bound proteins via ectodomain shedding important for many biological functions. So far, substrate identification focused exclusively on membrane-anchored ADAM10 and ADAM17. However, besides known shedding of ADAM10, we identified ADAM8 as a protease capable of releasing the ADAM17 ectodomain. Therefore, we investigated whether the soluble ectodomains of ADAM10/17 (sADAM10/17) exhibit an altered substrate spectrum compared to their membrane-bound counterparts. A mass spectrometry-based N-terminomics approach identified 134 protein cleavage events in total and 45 common substrates for sADAM10/17 within the secretome of murine cardiomyocytes. Analysis of these cleavage sites confirmed previously identified amino acid preferences. Further in vitro studies verified fibronectin, cystatin C, sN-cadherin, PCPE-1 as well as sAPP as direct substrates of sADAM10 and/or sADAM17. Overall, we present the first degradome study for sADAM10/17, thereby introducing a new mode of proteolytic activity within the protease web.

Keywords TAILS · ADAM8 · ADAM10 · ADAM17 · Ectodomain shedding · Proteolysis

Abbreviations

ACN	Acetonitrile
ADAM	A disintegrin and metalloprotease
APP	Amyloid precursor protein
CTF	C-terminal fragment
DAPT	<i>N</i> -[<i>N</i> -(3,5-Difluorophenacetyl)- <i>L</i> -alanyl]- <i>S</i> -phenylglycine <i>t</i> -butyl ester
DCM	Dilated cardiomyopathy

dnp	2,4-Dinitrophenyl
ECM	Extracellular matrix
FCS	Fetal calf serum
HEK	Human embryonic kidney
LC–MS/MS	Liquid chromatography–tandem mass spectrometry
Mca	7-Methoxycoumarin-4-yl-acetyl
MMP	Matrix metalloproteinase
PCPE-1	Procollagen C-proteinase enhancer-1
PSM	Peptide scoring matches
RFU	Relative fluorescence unit

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03184-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Franka Scharfenberg
fscharfenberg@biochem.uni-kiel.de

✉ Christoph Becker-Pauly
beckerpauly@biochem.uni-kiel.de

¹ Unit for Degradomics of the Protease Web, Biochemical Institute, University of Kiel, Kiel, Germany

² Systematic Proteomics and Bioanalytics, Institute for Experimental Medicine, University of Kiel, Kiel, Germany

³ Department of Neurosurgery, Philipps University Marburg, Marburg, Germany

⁴ Biochemical Institute, University of Kiel, Kiel, Germany

⁵ Tissue Biology and Therapeutic Engineering Unit, LBTI, UMR 5305, Univ. Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, 69367 Lyon, France

⁶ Neuroproteomics, School of Medicine, Klinikum rechts der Isar, Institute for Advanced Study, Technical University Munich, Munich, Germany

⁷ Munich Center for Systems Neurology (SyNergy), Munich, Germany

⁸ German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Munich, Germany

⁹ Institute for Pathobiochemistry, University Medical Center of the Johannes Gutenberg-University Mainz, Mainz, Germany

SD	Standard deviation
TAILS	Terminal amine isotopic labeling of substrates
TCA	Trichloroacetic acid
TFA	Trifluoroacetic acid
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TMT	Tandem mass tag
TR	Technical replicate

Introduction

The proteolytic release of soluble extracellular mediators is crucial for almost all biological processes, from embryonic development and tissue homeostasis to cell death [1–4]. Dysregulation of ectodomain shedding is associated with several pathologies, demonstrating the importance of such irreversible proteolytic events [1, 5]. Members of a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family are known to mediate ectodomain shedding of a variety of membrane-bound proteins affecting cell adhesion, migration, signaling, and proteolysis [2, 6–9].

The ubiquitously expressed membrane-bound proteases ADAM10 and ADAM17 are the most intensively studied and best characterized members of the ADAM proteinase family. With regard to sequence homology and structure, these two proteases are closely related to each other and set apart from all other ADAMs [6]. A characteristic feature is the unique domain composition within the ADAM family comprising an N-terminal signal peptide followed by a prodomain, a metalloprotease domain, a disintegrin domain, a cysteine-rich domain, a single transmembrane helix, and a cytoplasmic region [10]. Several studies confirmed a number of specific substrates for ADAM10 (e.g., N-cadherin and betacellulin) or ADAM17 (e.g., TNF α , amphiregulin, and HB-EGF), but also unraveled overlapping specificities (e.g., IL-6R, Notch, and APP) [11–13], suggesting compensatory proteolytic activities regulated in a cell type- and tissue-dependent manner. The broad and complex spectrum of shedding substrates has characterized ADAM10 and ADAM17 as important molecular switches of major physiological pathways controlling tissue regeneration, inflammatory immune responses, cancer development, neurodegenerative pathologies, and cardiovascular diseases [12, 14–16].

The analysis of loss-of-function mouse models revealed that ADAM10 and ADAM17 are essential for organ development and that deficiency leads to embryonic lethality [17, 18]. The severe morphological defects affect various tissues including the heart [17–19]. Here, the absence of functional ADAM10 or ADAM17 leads to severely impaired cardiac development [18, 20–22]. Altered expression levels in response to specific heart pathologies such as myocarditis [23], different cardiomyopathies [24], atrial fibrillation [25], or myocardial infarction [26, 27] reflect the impact of ADAM10 and ADAM17 for structural integrity and remodeling of cardiac tissue.

Fig. 1 ADAM8-dependent shedding of ADAM17. **a** Immunoblot of MDA-MB-231 ADAM8 knockout (hA8 ko) and control (ctrl) cell lysates. **b** Relative increased soluble protein levels of MDA-MB-231 ctrl vs hA8 ko clones determined by the soluble receptor array are shown. **c** ELISA OD levels corresponding to the amount of soluble ADAM17 in conditioned cell-culture medium of MDA-MB-231 hA8 ko and ctrl clones. **d** Immunoblot of the Co-IP assay. Cell lysates of MDA-MB-231 hA8 ko clone transfected with a human ADAM8 Flag tag expression construct was loaded on magnetic beads covalently coupled with a Flag tag ab or mouse IgG. Shown is the signal of ADAM8 and ADAM17 (arrows indicate the pro and mature form of ADAM17) in the cell lysates and in the eluted fraction. **e** Shedding of ADAM17 in ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells transfected with mADAM17 and/or mADAM8, monitored by immunoblotting. Shedding of mADAM17 was analyzed in ultracentrifuged, TCA precipitated supernatants (*) with an antibody raised against the ectodomain and in the lysate based on the enrichment of CTFs, detected with an ADAM17 C-terminal specific antibody. BB-94, BK-13-61, or GW was added to the medium 24 h before collecting the supernatants. Cells were additionally treated with DAPT to inhibit γ -secretase. **f** Co-immunoprecipitation of mADAM8 and mADAM17. ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells were transfected with a C-terminal Myc-tagged mADAM8 and/or mADAM17. ADAMs were immunoprecipitated via the Myc-tag and proteins analyzed by immunoblotting

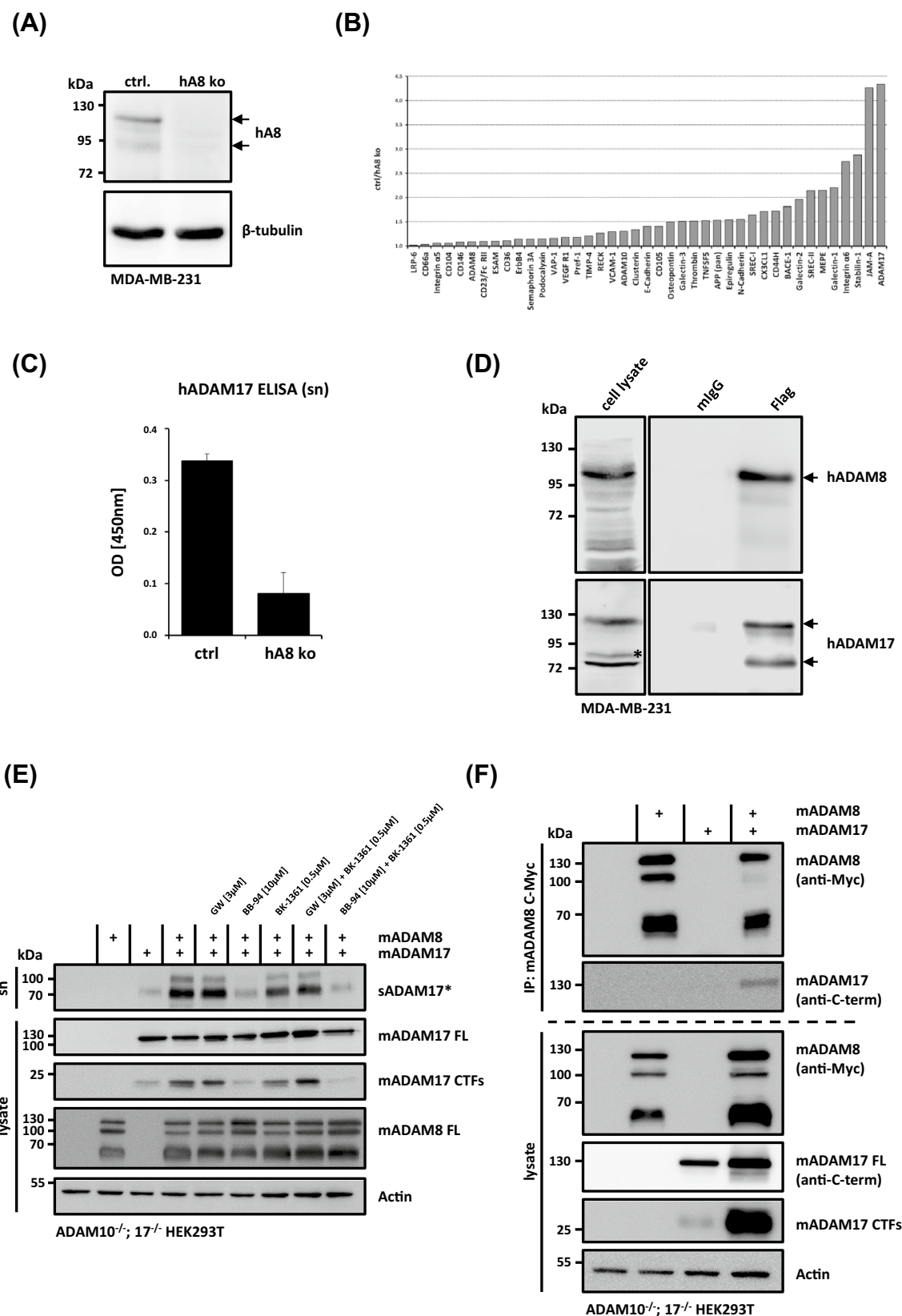
Interestingly, in human dilated cardiomyopathy (DCM), ADAM15 expression was found to be increased [24]. ADAM15 again is a sheddase of ADAM10 [28], which potentially results in elevated levels of soluble shed ADAM10 in the cardiac extracellular matrix (ECM). For ADAM17, no particular sheddase has been described so far. However, cell-culture experiments demonstrated that ADAM17 can undergo shedding [29], which is further supported by several reports on ADAM17 activity in plasma [30, 31].

Based on these observations and our identification of ADAM8 as a sheddase of ADAM17, we hypothesized that the shedding of ADAM10 and ADAM17 is not only a mechanism to downregulate cell-surface activity of these proteases, but instead enables soluble ADAM10 and ADAM17 (sADAM10/17) to get access to a so far not characterized substrate pool of soluble proteins. To address this issue, we employed a mass spectrometry-based proteomics approach [32] to identify substrates for sADAM10 and sADAM17 in the secretome of murine cardiomyocytes and additionally verified shedding activities of the soluble proteases toward known targets of membrane-bound ADAM10 and ADAM17.

Results

ADAM17 is shed by ADAM8

Recently, it was shown that an ADAM8 dependent shedding of the P-selectin ligand PSGL-1 regulates transendothelial



migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. A knock-down of ADAM8 in this cell line caused a significant decrease in cell migration when compared to WT cells [33].

Based on this observation, an ADAM8-deficient MDA-MB-231 cell line was generated by CRISPR/Cas9 (Fig. 1a) and the release of other cell-surface receptors using a

commercial receptor array kit was analyzed (Fig. 1b). Interestingly, the amount of sADAM17 in the medium of MDA-MB-231 cells was significantly decreased in the absence of ADAM8, which was further confirmed by ELISA (Fig. 1c) with MDA-MB-231 cells, but also in another cancer cell line bearing an ADAM8 knockout (Fig. S1). Co-immunoprecipitation of ADAM8 and ADAM17 in transiently transfected MDA-MB-231 cells demonstrated a direct protein–protein interaction of ADAM17 and ADAM8 (Fig. 1d).

To investigate ADAM8-mediated ADAM17 shedding in more detail, ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells were transiently transfected with murine ADAM17 and/or murine ADAM8 (Fig. 1e). Of note, ADAM17 shedding was already observed in ADAM17 single transfected cells but was largely increased in the presence of ADAM8, as indicated by the accumulation of ADAM17 C-terminal fragments (CTFs) in cell lysates and sADAM17 in the cell supernatants (Fig. 1e). qRT-PCR revealed endogenous expression of ADAM8 in ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells, which might be responsible for the observed shedding of single transfected ADAM17 (Fig. S2). Application of the hydroxamate-based inhibitor GW280623 (GW), known to block ADAM17 activity [34], excluded an autocatalytic processing. For the inhibition of ADAM8-dependent ADAM17 shedding, the hydroxamate derivative Batimastat (BB-94) and the ADAM8 specific cyclic peptide inhibitor BK-1361 were used. Surprisingly, shedding of ADAM17 was only reduced in the presence of the membrane permeable BB-94 and not with BK-1361 (Fig. 1e). In a control experiment under the same conditions using CD23 as a well-described ADAM8 substrate, the inhibitory capacity of both inhibitors against ADAM8 was confirmed (Fig. S3A). Here the release of a ~36 kDa sCD23 form was decreased in the presence of BB-94 and BK-1361 as reported previously [35]. Notably, when analyzing cell supernatants an additional second fragment of sADAM17 appeared at ~100 kDa upon co-transfection with ADAM8. Using an N-terminal Strep-tagged ADAM17 it became apparent that this represents the pro-form of ADAM17 (Fig. S3B). Co-immunoprecipitation of mADAM8 and mADAM17 further supported close interaction of both murine proteases (Fig. 1f). Overall, the results indicate that ADAM8 can shed the pro- as well as the mature form of ADAM17.

Identification of sADAM10 and sADAM17 substrates by N-terminomics (TAILS)

Based on previous publications and our above described data, we assumed that shedding of ADAM10 and ADAM17 might be of particular importance in maintaining homeostasis of the cardiovascular system. Therefore, the murine cardiomyocyte cell line HL-1 was chosen for

a mass spectrometry-based N-terminomics approach to identify possible substrates of soluble ADAM10/17. HL-1 cells are described to express ADAM10 and ADAM17 [36] and we could demonstrate by qRT-PCR that these cells additionally express ADAM9 and ADAM15 as sheddases for ADAM10 along with ADAM8 as sheddase for ADAM17 (Fig. S2).

For the N-terminomics TAILS approach, the ectodomains of the two target proteases ADAM10 and ADAM17 were expressed in insect cells and purified to homogeneity and validated by LC–MS/MS (Figs. 2a, S4). Activity measurements using specific fluorogenic peptides confirmed both proteases being proteolytically active. The selective inhibition of sADAM10 in the presence of the hydroxamate-based inhibitor GI254023X (GI) in comparison with the GW280623 (GW) inhibitor [34], blocking both ADAM10 and ADAM17, further confirmed the protease preparations as suitable for specific degradome studies (Fig. 2b). For the elucidation of specific cleavage events mediated by sADAM10 or sADAM17, the isolated secretome from HL-1 cells was incubated alone (non-treated control sample) or with the respective recombinant ADAMs for 16 h, in two technical replicates each, and subjected to a 6plex-TMT analysis (Fig. 2c). More than 95% of all peptide identifications (1078 unique peptides) carried an N-terminal TMT tag, indicating an original or a proteolytically generated protein N-terminus present prior tryptic digestion. We obtained TMT quantification values for 990 N-termini from 586 unique proteins. Determination of a TMT ratio cutoff to determine possible sADAM10/17 substrates was calculated according to a common TAILS protocol [37]. A > threefold change in sADAM10 or sADAM17-treated samples compared to the control was considered as a significant cleavage event for the respective protease.

Cleavage specificity of sADAM10 and sADAM17

From 968 quantified N-terminal peptides, 165 N-termini from 134 proteins displayed possible sADAM10 or sADAM17 cleavage events (Suppl. file 1). Only ratios that fulfilled the criteria for both replicates of sADAM treated replicates vs the averaged control signal were considered for the determination of the cleavage specificity and identification of potential substrates. Similar numbers of ADAM10 ($n=42$) or ADAM17 ($n=49$) specific events as well as a shared pool of cleavage events ($n=45$) were identified (Fig. 2c). The revealed consensus sequences nicely fit to the previous studies, where cleavage preferences were assessed using peptide libraries as substrate [38, 39]. Overall, ADAM10 and ADAM17 showed comparable specificities for hydrophobic residues at P1' position (Fig. 3a, b). While ADAM10 had a strong preference for leucine at P1', ADAM17 additionally accepted the smaller residues valine

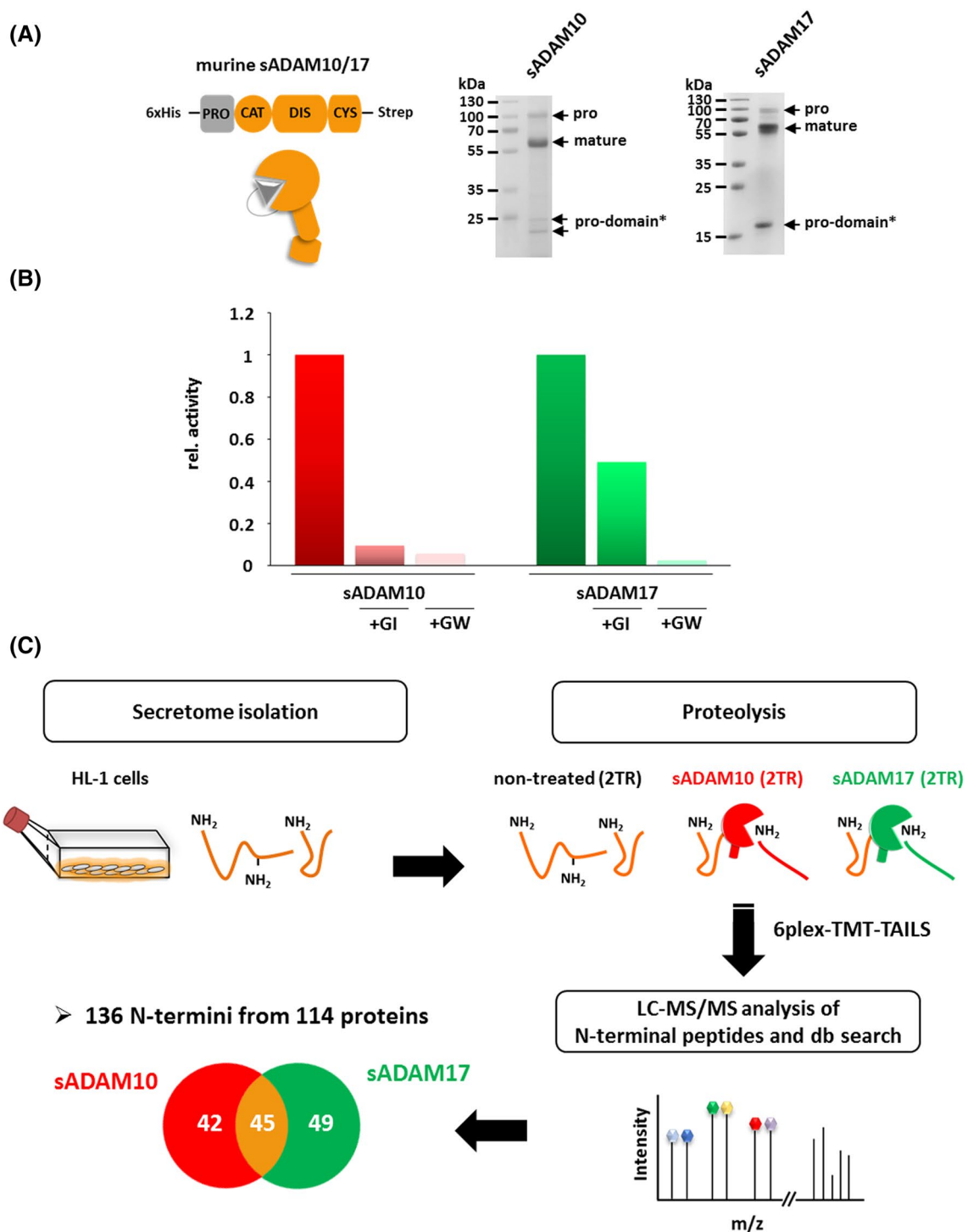
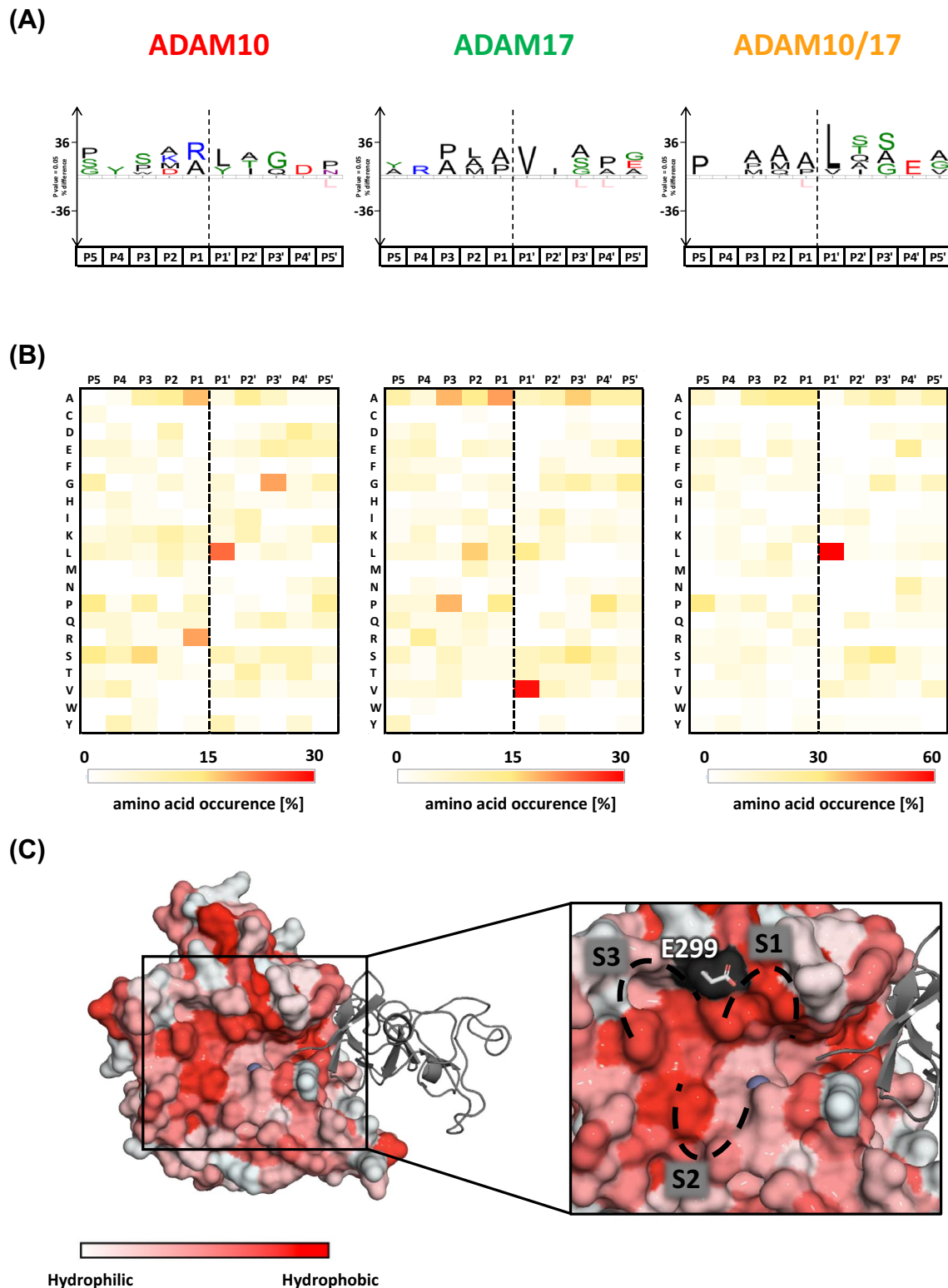


Fig. 2 Strategy for substrate screening of sADAM10 and sADAM17 employing the N-terminomics TAILS approach. **a** Domain structure of the recombinant murine sADAM10/17 constructs. The expressed and purified proteases comprise an N-terminal 6× His-tag followed by the prodomain (PRO), the disintegrin domain (DIS) and the cysteine-rich domain (CYS) with a C-terminal Strep-tag. Representative Coomassie-stained SDS-PAGE gels of 10 µg purified sADAM10 and sADAM17 are shown on the right. **b** Activity of purified recombinant sADAM10 and sADAM17 validated by a fluorogenic peptide-based cleavage assay. The proteases were inhibited by

GI254023 (ADAM10) and GW280623 (ADAM10/17). **c** 6plex-TMT-TAILS workflow. Isolated HL-1 secretome treated with recombinant sADAM10 or sADAM17 was compared with untreated control samples. N-termini of the two internal technical replicates (TR) from each condition were labeled with TMT reagents 126–131. Following tryptic digestion, internal peptides were blocked and removed by a polyaldehyde dendritic polymer and N-termini (natural or TMT-labeled) were enriched for LC-MS/MS analysis. Venn diagram showing total numbers of identified proteins in both TR for sADAM10 and sADAM17 with a fold change > 3.0 compared to the control samples



and alanine. Consistent with the previous reports was the quite loosely defined preference for aliphatic and neutral amino acids at P2'–P5' and at P2–P5 (Fig. 3a, b). Notably, the preference for arginine at P1 observed for ADAM10 in the TAILS approach was much more pronounced compared

to peptide substrates, indicative for the relevance of that position for protein binding and cleavage. Based on the crystal structure of the ectodomain of human ADAM10 [40], we propose that this arginine residue in a protein substrate might form a stabilizing salt-bridge with a glutamate residue

Fig. 3 Cleavage specificity of sADAM10 and sADAM17 based on TAILS-identified substrates. **a** IceLogo and heat map, **b** analysis for amino acid occurrence in P5–P5' of neo N-termini generated specifically by sADAM10 ($n=42$) and sADAM17 ($n=49$) and cleavage sites common for both proteases ($n=45$). Protein sequence logos were generated using iceLogo [94] with correlation for natural amino acid abundance in the mouse proteome, while heat maps show general percentage occurrence of amino acids within the data set. Dotted lines indicate cleavage sites. **c** P1 arginine preference of murine sADAM10. The homology model was generated based on the crystal structure of human ADAM10 (PDB: 6BE6). In the left panel the catalytic domain is shown as a molecular surface with a hydrophobicity sliding scale from white (polar) to red (hydrophobic), the cysteine-rich domain as a gray cartoon and the zinc ion as a light blue sphere. In the close up view (right panel) the substrate binding pockets S1–S3 are indicated with dashed lines. The suggested ADAM10 substrate stabilizing E299 residue is shown as sticks in a transparent surface pointing into the S1 pocket of the active site cleft

pointing into the S1 pocket of the active site (Fig. 3c). This particular glutamate residue seems to be a distinguishing feature for the active site of ADAM10, since in ADAM17, no corresponding acidic residue is present at the beginning of helix B (Fig. S5).

Validation of newly identified substrates of sADAM10 and sADAM17

Among the candidate substrates identified, we found 9 extracellular proteins with cleavage sites specific for either ADAM10 or ADAM17 as well as sites shared by both proteases (Table 1). Several of these proteins are representative candidates of the different components contributing to the defined structural and functional properties of the cardiac ECM [41], such as collagen IV and fibronectin as well as a non-structural matricellular protein thrombospondin-4 [42]. Furthermore, N-cadherin, a well-characterized cell adhesion molecule [43], cystatin C, a known protease inhibitor [44], and the hematopoietic macrophage colony-stimulating factor 1 (MCSF-1; [45, 46]) were identified as potential substrates for sADAM10/17.

To validate direct processing of selected candidate substrates by sADAM10 and sADAM17 in vitro, cleavage assays were performed and analyzed by SDS-PAGE and LC–MS/MS (Figs. 4, S6). In case of cystatin C, the TAILS analysis predicted an N-terminal cleavage event for sADAM17 between M29 ↓ L30. Indeed, a fragment of corresponding molecular weight could be detected upon digestion of murine cystatin C with recombinant sADAM17 and in solution LC–MS/MS confirmed the TAILS-derived cleavage site (Fig. 4a). Incubation of murine fibronectin with sADAM10 or sADAM17 resulted in multiple and distinct cleavage products for the two proteases, even though TAILS revealed only one newly generated N-terminus common for both enzymes (Fig. 4b). Due to the low sequence coverage (Fig. S6), it was not possible to identify the particular

cleavage event at P1654 ↓ S1655 by MS. In case of N-cadherin, an already described shedding substrate of membrane-bound ADAM10 [47], the TAILS data likewise revealed one cleavage site between the extracellular domains two and three at position T386 ↓ F387 (Table 1) for sADAM10 and sADAM17. The in vitro incubation of a recombinant murine N-cadherin Fc chimera resulted in several low molecular weight fragments in the presence of sADAM10, including an N-terminal fragment of ~40 kDa consistent with the TAILS-identified cleavage sites (Fig. 4c). Conversely, using solely the N-cadherin ectodomain as substrate revealed further cleavage events, also in the presence of sADAM17 (Fig. S7). This was likewise reflected by the MS analysis (Suppl. File 2), which, amongst others, revealed an sADAM10/17 N-cadherin cleavage site one amino acid C-terminal to the site detected by TAILS. For PCPE-1, three specific neo N-termini generated by sADAM17 were identified within the CUB I domain (Table 1). The cleavage sites predict N- and C-terminal fragments of ~12 kDa and ~30 kDa, which is in accordance with the observed cleavage pattern (Fig. 4d). Indeed, all sites identified by the TAILS approach could be validated in in vitro cleavage assays analyzed by LC–MS (Suppl. file 2). The highest fold change in peptide abundance was observed for the position P118 ↓ V119. Therefore, we conclude that this cleavage corresponds to the two prominent protein fragments observed by SDS-PAGE (Fig. 4d).

Apart from all identified soluble protein substrates and intrigued by the observation that sADAM10 is able to process shed N-cadherin, we were interested to know whether other shedding substrate of membrane-bound ADAM10 and ADAM17 are also substrates of the soluble enzymes. To investigate this, the amyloid precursor protein APP was analyzed, which is an extensively studied ADAM substrate with regard to its function in Alzheimer's disease [48–50]. Incubation of the recombinant ectodomains of the two human APP isoforms 695 and 751 (additionally including a Kunitz-type protease inhibitor domain; KPI) with sADAM10/17 resulted in several distinct cleavage products (Figs. 5a, S8). LC–MS/MS analysis of these APP fragments was in line with our TAILS-identified cleavage specificity for ADAM10 and ADAM17 (Fig. 3a, b). Notably, two cleavage events in the stalk region of both APP isoforms at positions E590 ↓ I591 and E593 ↓ V594 (amino acid numbering corresponding to UniProt accession number P05067-4), suggested potential shedding sites different from the described α -secretase site K612 ↓ L613 within the A β peptide sequence [49].

Impact of N-terminal sADAM10/17 cleavage on cystatin C inhibition of meprin α

Since the N-terminus of cystatin C is known to be important for its inhibitory capacity, we examined the influence of the

Table 1 TAILS-identified sADAM10 and sADAM17 cleavage sites in native substrates

ECM protein	Protease	Cleavage site	TMT ratio ^a (protease/control)	
			ADAM10	ADAM17
PCPE-1	ADAM17	YDALE(95).(96)VFAGS	(1.77)	9.50
		GRFCG(112).(113)TFRPA	(3.57)	10.90
		FRPAP(118).(119)VVAPG	(1.46)	5.42
Fibronectin	ADAM10/17	VRWLP(1654).(1655)STSPV	4.43	18.40
Macrophage colony-stimulating factor 1 (CSF-1)	ADAM10/17	PSMAP(217).(281)LAGLA	7.03	6.88
Cadherin-2 (N-cadherin)	ADAM10/17	FTAMT(386).(387)FYGEV	27.08	8.08
Dickkopf-related protein 3 (Dickkopf-3; Dkk-3)	ADAM10/17	VFSET(131).(132)VITSV	(3.03)	5.69
Thrombospondin-4	ADAM10/17	QQSEP(212).(213)LAATS	10.20	(2.50)
	ADAM17	SEPLA(214).(215)ATSTG	(1.86)	6.61
Olfactomedin-like protein	ADAM10	HLRGR(288).(289)LASKP	4.52	(1.85)
2B (Photomedin-2)				
Cystatin C	ADAM17	QGPRM(29).(30)LGAPE	(2.13)	11.36
		QGPRM(29).(30)LGAPE	(1.17)	8.26
Collagen alpha-2(IV) chain	ADAM17	GIPQK(1391).(1392)IAVQP	(2.09)	4.69

^aTMT ratios are averaged values for both technical replicates vs average control values. TMT ratios in bold correspond to a fold change > 3 in both replicates, while values in italics and brackets do not fulfill all statistical selection criteria

observed truncation toward meprin α activity. In a previous study, it was shown that human cystatin C is an inhibitor of human meprin α [51]. Human and murine cystatin C share an overall sequence identity of ~71%, while especially, the N-terminal regions differ. Therefore, we also analyzed the processing of human cystatin C by murine sADAM10/17, to exclude possible species differences. Interestingly, the cleavage preference for human cystatin C was significantly shifted toward sADAM10 in comparison with the sADAM17 processed murine homolog (Fig. S9A). In case of human cystatin C, the sADAM10 cleavage was identified at position R34 ↓ L35 (Suppl. file 2), which is one amino acid N-terminal to the corresponding site in murine cystatin C (Fig. S9B). Finally, a fluorogenic peptide-based activity assay for human meprin α was employed, in which the protease activity was analyzed in the presence of full length or sADAM10/17 processed cystatin C proteins. Indeed, sADAM10/17 N-terminal truncated cystatin C resulted in decreased meprin α inhibition (Fig. S9C).

Shedding activity of sADAM10 and sADAM17

To elucidate whether the herein described proteolytic activity of sADAM10 and sADAM17 is restricted to soluble substrates and thus preventing shedding activity, we additionally analyzed the known membrane-bound targets APP [48, 52, 53] and the metalloprotease meprin β (Fig. 5b) [54–57].

As control, we co-transfected ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells with either APP695 or APP751 and membrane-bound ADAM10 or ADAM17, respectively,

which resulted in shed APP protein in the supernatant (Fig. 5b, c). As expected, investigating the shedding activity of the soluble proteases excluded sADAM10 as APP sheddase (Fig. 5b). Similar to that, no shedding of APP751 by sADAM17 was observed (Fig. 5c). However, in case of APP695, a low amount of soluble APP α (sAPP α) was detected in the cell-culture supernatants after incubation with recombinant sADAM17 (Fig. 5c). Shedding of APP695 by sADAM17 is further supported by an increase of APP CTFs in the cell lysates (Fig. 5c). Notably, only when sADAM17 was present, an additional higher migrating APP CTF signal appeared. The shift in size of the different CTFs is in agreement with the determined cleavage site from the LC–MS/MS analysis of the in solution digest of the soluble ectodomains (Figs. 5a, S8). As mentioned above, cleavage of APP by sADAM17 is further N-terminal to the previously identified α -secretase cleavage site at K612 ↓ L613 [49]. Using meprin β as known ADAM substrate, shedding was only observed in the presence of membrane-bound and not for soluble ADAM10 or ADAM17 (Fig. 5d). Overall, these results indicate in a proof of concept approach that sADAM17 still exhibits putative shedding activity toward a restricted panel of substrates (Fig. 5e).

sADAM10 and sADAM17 activities in the ECM

Employing the N-terminomics TAILS approach, we revealed a diverse degradome for sADAM10 and sADAM17 (Fig. 6). However, when analyzing candidate substrates of membrane-bound and soluble ADAM10 and ADAM17 using the

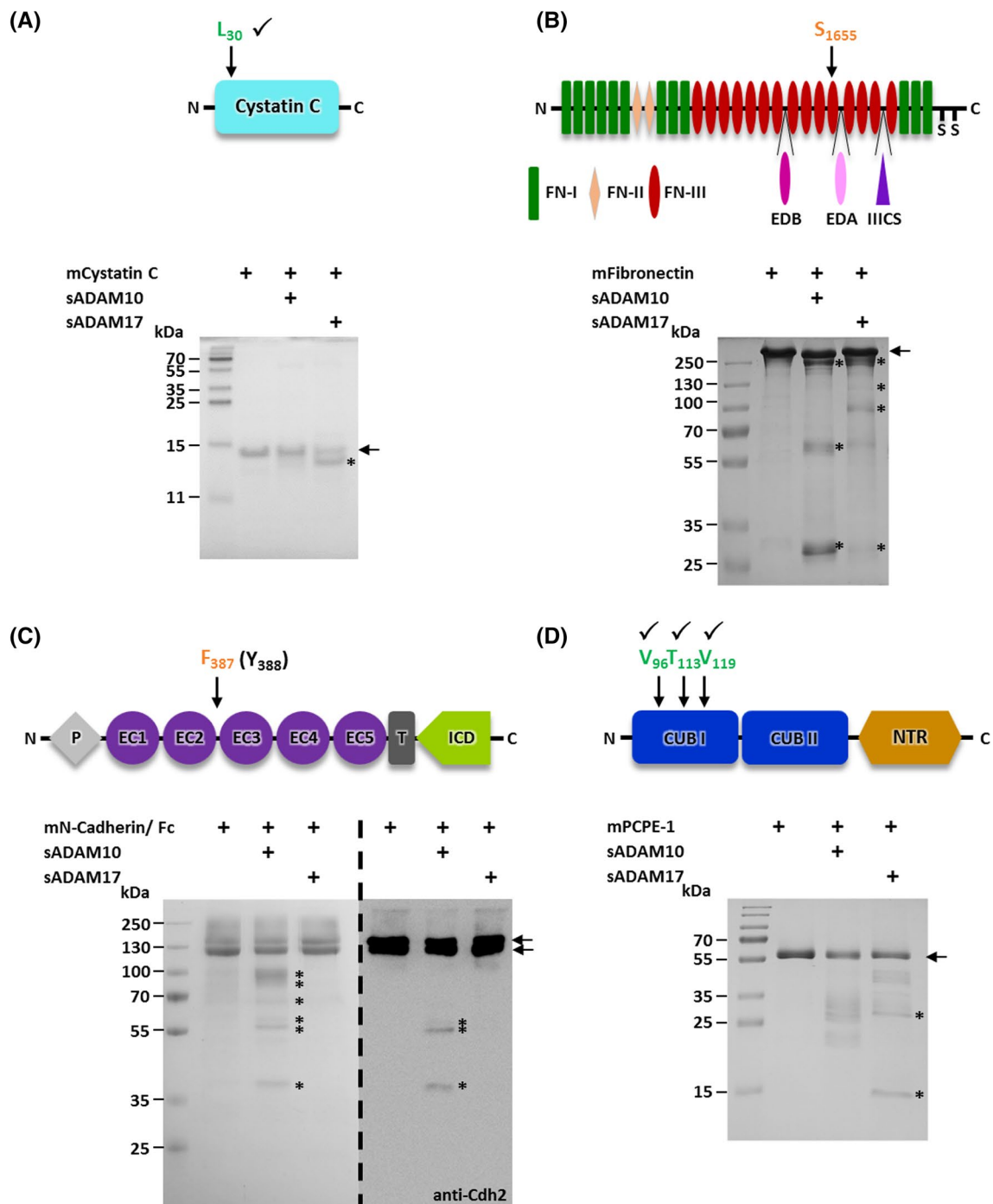


Fig. 4 Validation of TAILS-predicted substrates by in vitro cleavage assays and LC-MS/MS. Cleavage of recombinant proteins by sADAM10/17 was assessed by SDS-PAGE and visualized by Coomassie staining and immunoblotting. For each substrate the TAILS-predicted cleavage site(s) are highlighted by the P1' position within the respective domain composition. Cleavage sites are colored according to specificity: green (sADAM17) and yellow (sADAM10/17). Proteolytic fragments generated by sADAM10 and/or ADAM17 are indicated by asterisks and full-length proteins by arrows. By LC-MS/MS confirmed cleavage events are marked with a tick. Processing of **a** murine cystatin C, **b** murine fibro-

tin and **d** murine PCPE-1 at a molar ratio of 10:1 with sADAM10 and sADAM17 or buffer alone. **c** In case of N-cadherin, the murine N-cadherin Fc chimera was incubated with sADAM10 and sADAM17 at a molar ration of 8:1 (left panel). Additional immunoblotting (right panel) using an N-terminal specific antibody confirmed the ~40 kDa cleavage fragment. *FN* fibronectin domain I–III, *EDB*, *EDA*, *IIICS* alternatively spliced regions, *P* prodomain, *EC* extracellular domain, *TM* transmembrane domain, *ICD* intracellular domain, *CUB* complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1 domains I and II, *NTR* netrin-like domain

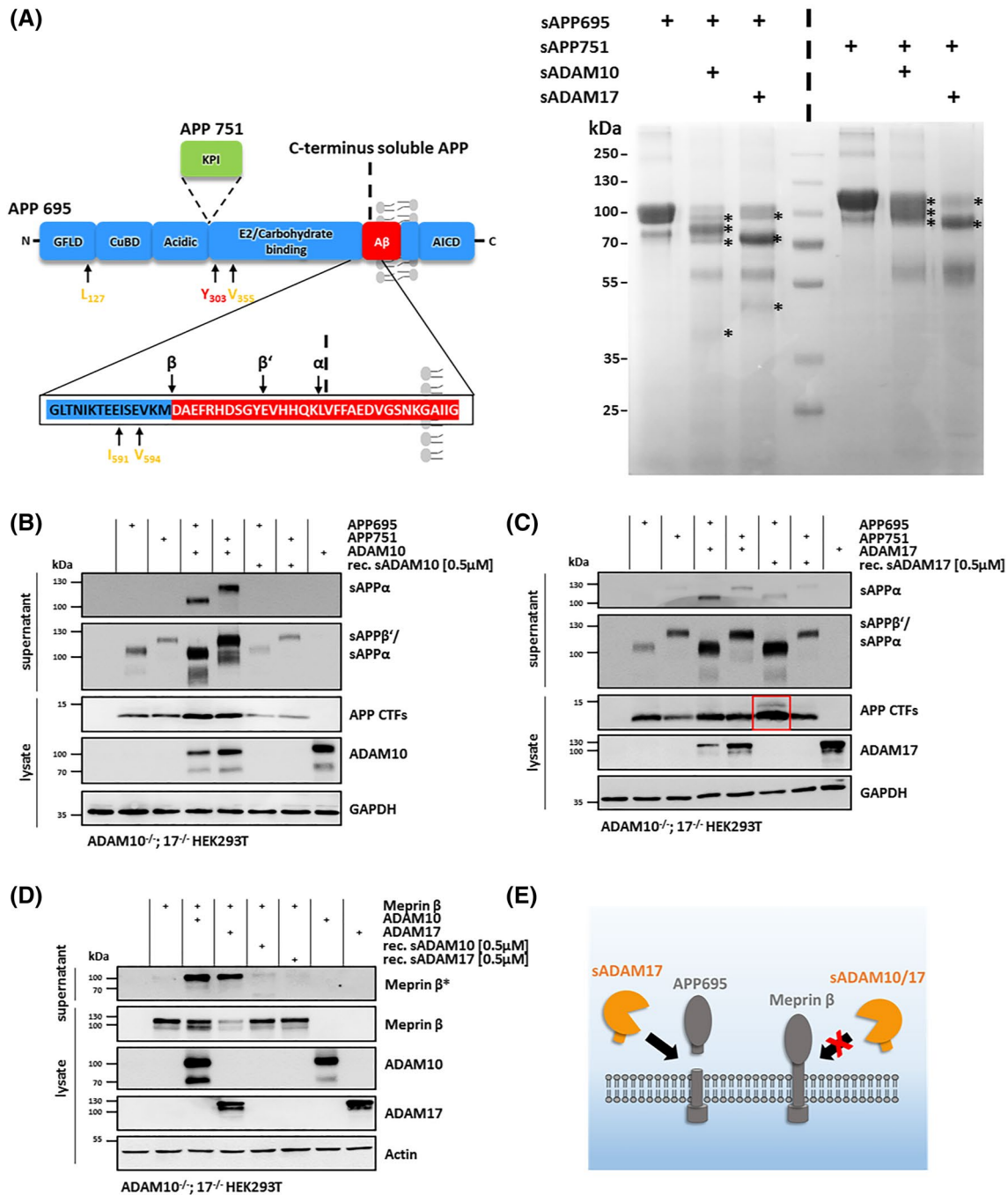
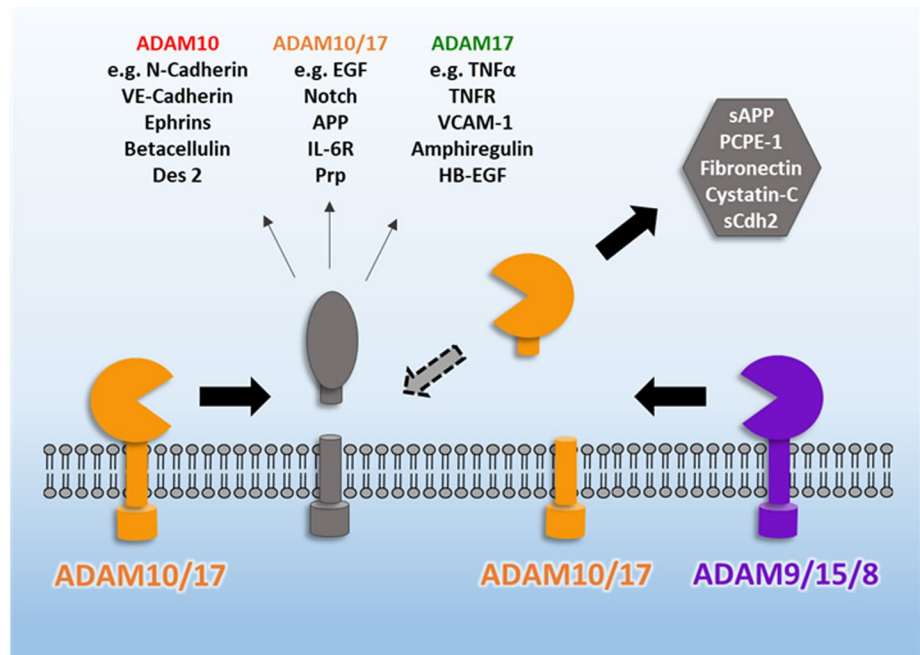


Fig. 5 Cleavage of APP and meprin β by sADAM10 and sADAM17. **a** Domain structure of APP with annotated α - and β -cleavage sites in the A β peptide region (left panel). Recombinant sAPP695 and sAPP751 were incubated in a molar ratio of 3:1 with sADAM10, sADAM17 or buffer alone. Cleavage products were separated by SDS-PAGE and visualized by Coomassie staining (right panel). Proteolytic fragments generated by sADAM10 and/or ADAM17 are indicated by asterisks. Selected high scoring PSM cleavage sites determined by LC-MS/MS are highlighted in the domain structure according to specificity: red (sADAM10) and yellow (sADAM10/17). GFLD: N-terminal growth factor-like domain, CuBD: copper-binding domain, KPI: kunitz protease inhibitor, E2: conserved region of the central APP domain, AICD: APP intracellular domain. **b–d** ADAM10 $^{-/-}$; 17 $^{-/-}$ HEK293T cells were either transfected with

APP695, APP751 or meprin β alone or together with membrane-bound ADAM10 or ADAM17. In case of cells solely expressing APP695, APP751 or meprin β 0.5 μ M recombinant sADAM10 or sADAM17 were added to the medium for 24 h before collecting the supernatants. Shedding of the target substrates was monitored by immunoblotting. **b, c** Shed APP was detected in the supernatants by immunoblotting using a sAPP α and sAPP β' -detecting antibody (IC16) and a specific sAPP α antibody (14D6). Cells were additionally treated with DAPT to inhibit γ -secretase and APP shedding was additionally monitored in the cell lysates using a C-terminal specific antibody (CT15). **d** Meprin β shedding was analyzed in ultracentrifuged supernatants (*) with an antibody raised against the ectodomain of meprin β . **e** Model of putative shedding activity of sADAM10 and sADAM17 summarizing the findings of experiments of **b–d**

Fig. 6 Functional relevance of sADAM10 and sADAM17. Membrane-bound ADAM10 and ADAM17 are sheddases for a number of specific and common substrates. These seems to hold likewise true for sADAM10/17, even though the shed proteases have a different substrate pool like their membrane-bound counterparts



STRING database [58], a well-connected network between the different proteins was defined reflecting the complex nature of ECM homeostasis and remodeling (Fig. S10). The present study demonstrates once more the power of the TAILS approach for de novo substrate identification and provides a better understanding of the functional relevance of shed ADAM10 and ADAM17 within the protease web.

Discussion

Ectodomain shedding of membrane-bound proteins is an important regulatory event in many physiological and pathological conditions [1–4, 59]. Numerous in vivo and in vitro studies highlighted the particular importance of ADAM10 and ADAM17 for such proteolytic events [12, 13, 60]. However, what is only weakly addressed in this context is the turnover of active ADAM10 and ADAM17 at the cell surface. While internalization and exosomal release are under debate [29, 61–63], the consequences of proteolytic shedding of ADAM10 and ADAM17 by other proteases have not been investigated yet. For instance, shedding of ADAM10 by ADAM9 and ADAM15 has been described, but functional consequences have only been discussed with regard to impaired ectodomain shedding [28, 64]. For ADAM17, several studies report activity in plasma [30, 31], cerebrospinal fluid [65, 66], gingival crevicular fluid [67], and in kidney cyst fluids [68] without addressing the origin of the detected ADAM17 activity. With the identification of ADAM8 as a sheddase, we demonstrate for the first time that ADAM17 can indeed be proteolytically released from the cell surface.

While classical ectodomain shedding occurs predominantly at the plasma membrane, our data suggest that ADAM8-mediated cleavage of ADAM17 partially happens on the secretory pathway. This notion is supported by the fact that full inhibition of ADAM8-dependent ADAM17 shedding was only achieved using BB-94, a hydroxamate inhibitor, which is membrane permeable in comparison with the cyclic peptide BK-1361. Encouraged by this and the fact that at least ADAM10 shedding is increased especially in the developing heart, we suggested the heart to be an interesting tissue and HL-1 cells to be an appropriate cell line to initially study the biochemical properties and functional relevance of sADAM10 and sADAM17 on secreted proteins.

N-terminomics TAILS has been demonstrated to be an efficient and straightforward technique for de novo substrate discovery [32]. Protein labeling with isobaric mass tags, e.g., TMT or iTRAQ reagents, allows simultaneous comparison of multiple samples and the quantification of protease-specific cleavage events. Employing a 6plex-TMT-TAILS approach, we present the first degradome study for sADAM10 and sADAM17. The analysis resulted in the identification of 136 sADAM10/17 cleaved N-termini from 114 proteins. The obtained cleavage specificity for a hydrophobic residue at position P1' is in accordance with previous reports using peptide libraries [38, 39], which highlights the validity of the approach. A remarkable observation was the pronounced preference for an arginine residue at P1 for ADAM10, which is distinct to the previously published peptide-library-based PICS data [38]. While the protease domains of ADAM10 and ADAM17 resemble the characteristic fold of the adamalysin/ADAM family with an extended

zinc-binding motif and the conserved methionine turn, several insertion loops define unique surface features [40, 69]. The active site cleft is relatively flat on the non-prime side and becomes notched toward the prime side. Therefore, only subtle differences in the groove width of the binding pockets, especially the one of the S1' pocket, define substrate specificity of ADAM10 and ADAM17 as reflected by the determined cleavage specificity. The S1 pocket itself is quite small, which is consistent with the preference for alanine at P1 for both proteases in general. Considering that native substrates have a complex fold in comparison with rather short peptides, additional interactions regulate substrate binding. Therefore, it is likely that the glutamate residue protruding into the S1 pocket in ADAM10 stabilizes substrates via a salt bridge over an arginine residue at the P1 position. Nonetheless, deduced from known ADAM10 shedding sites as well as from the herein identified cleavage sites in ECM substrates, it is also evident that this preference is not a prerequisite for substrate cleavage. Overall, we conclude that not only membrane-bound ADAM10 and ADAM17, but also their shed forms need a tight spatial and temporal regulation to ensure selective substrate specificity *in vivo*. One such regulation can be achieved by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), which are endogenous inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) and ADAMs [70]. TIMP-3 inhibits ADAM10 and ADAM17 [71, 72], whereas ADAM10 is additionally targeted by TIMP-1 [71]. Interestingly, particularly in hearts of patients with dilated cardiomyopathy, TIMP-3 levels are decreased, while ADAM15, ADAM10, and ADAM17 expression is elevated [24]. This suggests a less stringent proteolytic control of membrane-bound and soluble ADAM10/17 during the progress of the disease. However, it is possible that sADAM10/17 have an additional non-proteolytic regulatory function in complexing TIMPs in the ECM and serum, thereby down-regulating their inhibitory capacity also toward other target proteases. Nonetheless, the proposed physiological mechanisms have to be proven in further studies *in vivo*.

Besides the well-characterized sheddome of ADAM10 and ADAM17, the TAILS approach led to the identification of unique and common substrates for sADAM10 and sADAM17. Initial candidate substrate validation by *in vitro* cleavage assays and in solution LC–MS/MS further confirmed these findings. For example, fibronectin and sN-cadherin are directly processed by both ADAM10 and ADAM17, whereas cystatin C and PCPE-1 are preferred substrates of sADAM17 only. Apart from the TAILS analysis, the ectodomains of APP695 and APP751 are cleaved by both proteases specifically and at common sites. Although the *in vitro* cleavage specificities are in general accordance with the TAILS-identified N-termini, some discrepancies were observed, which could have

different reasons. For example, alternative cleavage sites were not detectable by mass spectrometry due to technical issues, such as peptide length or inefficient ionization [73]. Another explanation is that *in vitro* assays are limited in recapitulating the complexity of a secretome sample. Hence, detection of indirect or secondary cleavage events of the analyzed target protease, a hallmark of the protease web, is difficult [74]. Interactions of a substrate with other proteins may result in structural conformational changes that are prerequisite for the protease accessibility to the cleavage site. Our data on murine vs human cystatin C cleavage by sADAM10/17, furthermore, show that already subtle differences in sequence can have an impact on substrate specificity of the two proteases. However, since the cystatin C inhibition mechanisms vary depending on the target protease, it needs to be proven whether the described N-truncation by sADAM10/17 is of physiological relevance. Especially in the context of heart remodeling and/or heart diseases, there are so far no reports about N-terminal truncated cystatin C variants.

The TAILS data and the biochemical analysis of substrates clearly demonstrate proteolytic activity of shed ADAM10 and ADAM17. Hence, we investigated if this activity is strictly restricted to soluble substrates. For instance, membrane-bound activated meprin β can act as sheddase for several proteins such as APP [75] or the IL-6R [76]. Soluble meprin β has no shedding activity toward these substrates, but cleaves, e.g., APP within the N-terminal region, generating non-toxic APP fragments [59, 75] or mucine 2 in the intestine [77]. Prototypically, meprin β itself as well as the two APP variants APP695 and APP751 were used as substrates to investigate potential shedding by sADAM10/17 *in cellulo*. Our data suggest that membrane tethering of ADAM10/17 is of general importance for their shedding activity and efficiency, most likely to enable close proximity to the stalk regions of the substrates and concomitantly the association to the activity regulating iRhoms [78, 79]. Therefore, the observed shedding of APP695 in the presence of sADAM17 might be due to the unphysiological high concentrations of the protease. However, these data demonstrate the general possibility of persistent shedding activity for soluble ADAM17 which should be considered with regard to the overall debate on major determinants of shedding activity [1].

In sum, the TAILS N-terminomics data together with the shedding activity assays provide proof of concept that sADAM10 and sADAM17 may exhibit additional biological roles within the protease web (Figs. 6, S10). Therefore, the identified unique and overlapping substrates pave the way for further studies to understand the physiological relevance of the sADAM10 and sADAM17 degradome in health and disease.

Experimental procedures

Chemicals

All chemicals were of analytical grade and obtained from Carl Roth GmbH + Co. KG, Merck KGaA, Sigma-Aldrich Inc. and Thermo Fisher Scientific Inc., if not stated otherwise.

Cells

The murine HL-1 cells were generously provided by William C. Claycomb (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Louisiana State University Health Sciences Center, New Orleans, Louisiana). The cells were cultured in Claycomb media (Sigma-Aldrich Inc.) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 0.1 mM norepinephrine in ascorbic acid, 100 units/l penicillin, and 100 µg/ml streptomycin at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T [80] were maintained in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Gibco™) with GlutaMAX™ supplemented with 10% (v/v) FCS, 100 units/l penicillin and 100 µg/ml streptomycin under humidified conditions (5% CO₂) at 37 °C.

The CRISPR/Cas9 knockout/knockin kit from OriGene (# KN213386) was used to generate a genomic ADAM8 knockout in MDA-MB-213 and AsPC1 cells. In brief, the pCas-Guide vector with the ADAM8 target sequence (gRNA) near to the 5' end of the ADAM8 ORF or a scramble gRNA control was transfected together with a knockin vector into both cell lines using lipofectamine LTX (Invitrogen AG). The knockin vector contains between the left and right ADAM8 homology arms a functional GFP and puromycin cassette. After homology recombination, the GFP is under the control of the native ADAM8 promoter and the puromycin gene is under a PGK promoter. The transfected cells were split several times in the following 3 weeks before starting the selection with 5 µg/ml puromycin (InvivoGen) to get single-cell clones. MDA-MB-231 were cultured in DMEM (Biochrome GmbH) and AsPC1 in RPMI (Biochrome GmbH) with GlutaMAX™ supplemented with 10% (v/v) FCS (Biochrome GmbH).

ELISA

MDA-MB-231 and AsPC1 cell clones were incubated for 16 h at 37 °C in growth medium. A soluble human ADAM17 (# DY930) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; R&D Systems Inc.) was used to detect soluble ADAM17 in cell-culture supernatants.

Soluble receptor array

Relative levels of 119 soluble receptors and related proteins secreted into the medium of MDA-MB-231 control and ADAM8 knockout clones was assessed using the Proteome Profiler™ Human Soluble Receptor antibody array (Non-hematopoietic Panel, R&D Systems, # ARY012). Briefly, 5 × 10⁵ cells were cultured for 48 h in serum-free DMEM medium. The conditioned medium was centrifuged at 15,000×g for 15 min to remove cell debris and subjected to the antibody array according to the manufacturer's protocol. The signal intensity of the detected proteins was measured using ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from HL-1 and ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells using the NucleoSpin® RNA Isolation Kit (MACHEREY–NAGEL GmbH & Co. KG). The concentration, purity, and integrity of the isolated RNA were determined by a NanoDrop™ 2000 instrument (Thermo Fisher Scientific Inc.). One microgram of RNA was used as input for complementary DNA (cDNA) synthesis using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.), according to the manufacturer's instructions.

Quantitative real-time PCR analysis

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) assays were performed based on the hydrolysis probe technology on a LightCycler® 480 instrument (Roche Deutschland Holding GmbH) using the 2× LightCycler® 480 Probes mastermix (Roche Deutschland Holding GmbH). For primers and UPL probes, see Suppl. Table S1. Primers were purchased from Sigma-Aldrich Inc. The qRT-PCR was performed in three technical replicates on each sample for each gene tested. Cycling conditions were as follows: 10 min at 95 °C, followed by 45 cycles each consisting of 10 s at 95 °C and 30 s at 60 °C, and a cooling step of 30 s at 40 °C (ramp rate of 4.8 °C/s). The crossing point (Cp) data were analyzed using the absolute quantitation algorithm for each sample. Delta Cp was calculated by subtracting the GAPDH control gene Cp from Cp of the test gene.

Recombinant sADAM10 and sADAM17

The ectodomains of murine ADAM10 (UniProt accession number: O35598, amino acid residues 20-673) and ADAM17 (UniProt accession number: Q9Z0F8, amino acid residues 18-671) were amplified from respective full-length cDNA and cloned into pFastBac (Gibco™) containing a meprin β signal peptide [81], followed by an N-terminal 6× His-tag and a C-terminal Strep-tag. Sigma-Aldrich

Inc. synthesized primers and sequences of the constructs were verified by DNA sequencing (GATC Biotech AG). Expression and purification were performed as previously described [38]. The purity of the enzyme preparations, in particular the absence of other proteases, was confirmed by LC–ESI MS (data are deposited at the server ProteomeX-change). Therefore, 20 µg of sADAM10 and sADAM17 were dissolved in 2 M Urea in 100 HEPES buffer (pH 8.0). Samples were reduced with dithiothreitol (5 mM) for 1 h at 37 °C and alkylated with iodoacetamide (12.5 mM) for 1 h at 25 °C. Samples were split into two and either incubated with or without 500 units of PNGaseF (New England Biolabs GmbH) overnight at 37 °C. Samples were further split into two and left to be digested overnight at 37 °C with either 100 ng of trypsin (10 mM ABC, 25 mM HEPES buffer) or 100 ng of chymotrypsin (25 mM HEPES, pH 8.0, 1 mM CaCl₂). Samples were diluted with 1% FA and analyzed by LC–MS. Samples were analyzed on a Thermo Q-Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc.). The samples were concentrated and washed for 4 min (Acclaim Pepmap 100 C18, 5 mm × 300 µm, 5 µm, 100 Å, Dionex) with 3% ACN/0.1% TFA at a flow rate of 30 µl/min prior to peptide separation using an Acclaim PepMap 100 C18 analytical column (50 cm × 75 µm, 2 µm, 100 Å, Dionex). A flow rate of 300 nl/min using eluent A (0.05% FA) and eluent B (80% ACN/0.04% FA) was used. Peptides were separated over 40 min by increasing the concentration of eluent B from 5 to 50%. The column was subsequently washed by increasing eluent B to 95% over 1 min, and after a further 10 min at 95% B, the system was equilibrated at 5% B for 15 min. The ten most intense precursors with charge states greater than 2+ were selected for HCD fragmentation using a normalized collision energy of 25 at a resolution of 17,500.

Fluorogenic peptide-based activity assay

The enzymatic activity of sADAM10 or sADAM17 was analyzed using the quenched fluorogenic peptide substrates Acetyl-dArg(3)-dGlu(3)-hexaminoyl-K(Dabcyl)-PRYEAYKMGK(5FAM)-C-NH₂ (BioZyme Inc.) for sADAM10 and Mca-PLAQAV(Dpa)RSSSR-NH₂ (R&D Systems) for sADAM17 at final concentrations of 10 µM. For inhibition studies, GI254023 (ADAM10) or GW280623 (ADAM10 and ADAM17) (Iris Biotech GmbH) were added to final concentrations of 3 µM. For murine and human cystatin C inhibition studies, the activity of 1 nM recombinant meprin α was monitored using a specific quenched fluorogenic peptide Mca-HVANDPIW-dnp (Genosphere Biotechnologies) [82]. Recombinant meprin α was expressed and purified as described previously [83]. For inhibition analysis, meprin α was incubated with 1 µM full-length or sADAM10/17 processed (ratio 1:10 sADAM10/17 to cystatin C, 16 h, 37 °C) cystatin C for 30 min at 37 °C. As control,

the activity of the same amount of sADAM10/17 toward the fluorogenic substrate was determined. Immediately before measurement 10 µM of the quenched fluorogenic peptide, substrate was added. All activity assays were carried out in 20 mM HEPES buffer (pH 7.5) in duplicates at 37 °C. Proteolytic activity was measured as relative fluorescence units (RFU) every 30 s for 120 min, at excitation 405 nm and emission 320 nm, using the Tecan Infinite® F200 PRO plate reader (Tecan Trading AG). The activity was determined from the slope of the linear range of the curve normalized to the initial point of the measurement and presented as bar graph.

TAILS

For proteomic analysis, murine HL-1 cells were grown to ~70% confluency. Cells were then intensively washed with PBS (Gibco™) and grown in DMEM medium without serum and phenol red. After 48 h, the conditioned medium was collected and protease inhibitor cocktail (cOmplete™, Roche Deutschland Holding GmbH) immediately added. Cell debris was removed by centrifugation (5 min, 2200×g) and filtration (0.22 µm). The secretome was concentrated at 4 °C by ultrafiltration using Amicon Ultra-15 centrifugal filter units (10 kDa cutoff, Merck Millipore Ltd.). Within the same concentrating device, the buffer was exchanged to 100 mM HEPES (pH 7.0) by five cycles of dilution and concentration. A protein concentration of 2.4 mg/ml was determined using the BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). The secretome preparation was aliquoted, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C until further use.

Equal amounts of concentrated secretome were incubated for 16 h at 37 °C with recombinant sADAM10 or sADAM17 in a ratio of 1:100 protease to secretome, as previously described for matrix metalloproteinases (MMPs) [84]. Non-treated control samples received an equivalent of buffer only. All individual experiments were performed from secretome aliquots of the same batch and in two technical replicates each.

The TAILS analysis followed the previously published protocol [32], but used 6plex-TMT reagents (Thermo Fisher Scientific Inc.). From each reduced and alkylated sample, 0.2 mg of proteins were labeled using 1.6 mg TMT reagent per channel in 50% DMSO (final concentration) for 30 min at room temperature. The reaction was quenched with 100 mM ammonium bicarbonate for 15 min and the samples were combined. The following steps of tryptic digestion and enrichment of N-terminal blocked peptides were carried out according to Kleifeld et al. [32].

LC–MS/MS analysis was performed using a Dionex U3000 nanoHPLC coupled to a Q-Exactive Orbitrap mass spectrometer (both from Thermo Fisher Scientific Inc.). In

two technical replicates, 5 μ l of TAILS enriched and TMT-labeled peptides were injected and loaded on a trap column (Acclaim Pepmap 100 C18, 10 mm $\times$ 300 μ m, 3 μ m, 100 Å, Dionex). Trapping was performed for 3 min with 3% ACN/0.1% TFA at a flow rate of 30 μ l/min. Peptide separation was performed using an Acclaim PepMap 100 C18 analytical column (15 cm $\times$ 75 μ m, 3 μ m, 100 Å, Dionex) with a flow rate of 300 nl/min. Peptides were separated using a linear gradient from 5 to 50% B (solvent A: 0.04% formic acid; solvent B: 80% acetonitrile/0.04% formic acid) in 180 min followed by 40–95% B in 5 min, 95% B for 10 min and equilibrating at 5% B for 11 min. Ionization was performed with 1.5 kV spray voltage applied on a liquid junction emitter (10 μ m tip size, New Objective, Woburn, MA, USA) with the source temperature set to 250 °C. MS data were acquired from 5 to 205 min with MS full scans between 300 and 1800 m/z at a resolution of 60,000 at m/z 400. The 15 most intense precursors with charge states $\geq 2+$ were subjected to fragmentation with HCD with NCE of 32.5; isolation width of 2 m/z . Dynamic exclusion for 90 s was applied with a precursor mass tolerance of 5 ppm. Lock mass correction was performed based on the polysiloxane contaminant signal of 445.120025 m/z .

The acquired MS/MS spectra from two technical replicates were searched using SequestHT within Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) against the entire reviewed database of *Mus musculus* (Ensembl 86) with known proteoforms and common contaminants (24,754 sequences). Modifications for the database search were static carbamidomethylation on cysteine residues, dynamic oxidation on methionine residues, static TMT-6plex on lysines, and dynamic TMT-6plex on the peptide N-terminus. Spectra were searched with semi-tryptic enzyme specificity. MS mass tolerance was set to 5 ppm and MS/MS tolerance was set to 0.04 Da. A decoy search determined false-discovery rate of 1% was applied using the Percolator algorithm. TMT reporter ion intensities were extracted and missing reporter ions replaced by minimal values. sADAM10/17 to control and ADAM10 to ADAM17 ratios for both technical replicates were calculated using Proteome Discoverer 1.4 software package.

Determination of a TMT ratio cutoff to determine possible ADAM10/17 substrates was calculated according to a common TAILS protocol [37]. In short, five times the standard deviation (SD) from the normal distribution of control 1 vs control 2 ratios indicated a stringent protease treated vs control ratio cutoff, which corresponded to a fold change between control and sADAM10/17-treated sample of > 3 . Furthermore, to ensure reproducibility between protease-treated technical replicates and to remove outliers, only ratios of ADAM-treated replicates 1 and 2 vs the averaged control that fulfilled the criteria

for both replicates were considered to indicate a potential substrate for the respective protease.

Substrate cleavage assays

Recombinant sADAM10 or sADAM17 were incubated with candidate substrates in 20 mM HEPES pH 7.5 for 16 h at 37 °C. Recombinant human APP695 and APP751 were expressed and purified as described previously [75, 85]. Other proteins were purchased as follows: murine cystatin C (# RD272009025; BioVendor-Laboratori medicina a.s.), human cystatin C (# RD172009; BioVendor-Laboratori medicina a.s.), mouse N-cadherin Fc chimera (# 6626-NC; R&D Systems), mouse N-cadherin (# 50752-mcch, Sino Biological Inc.), mouse PCPE-1 (# 2239-PE-020; R&D Systems Inc.), and mouse fibronectin (# ab92784; Abcam plc.). For cleavage site determination, 10 μ g of human APP695 and APP751 were incubated with sADAM10 or sADAM17 in a 3:1 ratio. 4 μ g of the N-cadherin proteins were processed at a substrate to protease ratio of 8:1. For murine and human cystatin C (4 μ g), PCPE-1 (5 μ g), and fibronectin (15 μ g), a ratio of the respective substrate to sADAM10 and/or sADAM17 of 10:1 was chosen. Reaction products were analyzed by SDS-PAGE and visualized by Coomassie staining or immunoblotting as well as by LC-MS/MS.

LC-MS/MS analysis of in vitro substrate cleavage by sADAM10/17

For cleavage site determination, digested proteins and undigested controls of the substrate cleavage assays were denatured and unfolded by the addition of 2 M guanidine hydrochloride followed by heating the sample to 60 °C for 20 min. 10 mM of DTT was added and the samples incubated at 60 °C for 30 min. Alkylation of cysteine residues was achieved by adding 55 mM iodoacetamide and incubation for 1 h at RT in the dark. Reductive dimethylation of primary amine groups was carried out by the addition of 30 mM formaldehyde and 30 mM of sodium cyanoborohydride. Samples were incubated over night at 37 °C and the reaction was quenched by the addition of 100 mM ammonium bicarbonate. Subsequently, the samples were acidified using 10% formic acid and lyophilized in a speedvac. Proteins were re-dissolved in 18 O-water to decrease the guanidinium hydrochloride concentration to 0.5 M and the pH was adjusted to 7.5. For the cleavage analysis of human APP695, APP751, human cystatin C, and the mouse N-cadherin Fc chimera, the samples were then digested using trypsin or chymotrypsin (100 ng protease per sample) at 37 °C overnight. In case of murine cystatin C, murine fibronectin, murine PCPE-1, and murine N-cadherin, one aliquot was digested using LysC/trypsin and another one using chymotrypsin. The respective endoprotease (1:50) was added and the samples were

digested over night at 37 °C. All samples were acidified with 10% formic acid. Trypsin and chymotrypsin or LysC/trypsin and chymotrypsin treated identical samples were combined and peptides were purified using the C18 Sep Pak column system. Elution of peptides was achieved using sequential elution using 50% and 100% ACN. Samples were lyophilized and reconstituted in 5% formic acid prior to LC-MS analysis on an Orbitap-Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc.). The mouse N-cadherin Fc chimera sample was measured on an Orbitrap Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc.).

The acquired MS/MS spectra were searched with Sequest-HT against the *Homo sapiens* (49,429 entries) or *Mus musculus* (17,453 entries) database using Proteome Discoverer 1.4 containing the proteins of interest as well as common contaminants. Static modifications applied for searches were carbamidomethylation on cysteines. Dimethylation of lysines and peptide N-termini, oxidation on methionines and ^{18}O C-terminal labeling were set as variable modifications. Spectra were searched with semi-enzyme specificity for trypsin and full enzyme specificity for chymotrypsin. An MS mass tolerance of 10 ppm and an MS/MS tolerance of 0.04 Da were used.

Peptide grouping was applied to group peptides spectrum matches (PSMs) with the same modification under the same peptide. Peptides were identified using a false-discovery rate ≤ 0.01 (high). Ion intensities, as well as peptide spectral match counts, for all identified peptides were extracted from the data and N-terminally dimethylated as well as peptides lacking the C-terminal ^{18}O label were considered to indicate a possible sADAM10 or sADAM17 prime or non-prime cleavage site if they displayed a strongly higher abundance in the sADAM10/17-treated samples ($>$ eightfold change, Suppl. file 2).

Shedding assay

For shedding experiments, ADAM10 $^{-/-}$; 17 $^{-/-}$ HEK293T cells were used, kindly provided by Dr. Björn Rabe, University of Kiel. Transient transfection was performed at 80–90% cell confluence with the following constructs: pcDNA3.1 (empty vector), murine ADAM10 and murine ADAM17 in pcDNA3.1, double tagged murine ADAM17 in pcDNA4/TO, murine ADAM8 in pCMV6, human ADAM8 in pAAVS1, human CD23 in pIRES2-EGFP, human meprin β in pSG5, human APP695 and APP751 in pCIneo. For transfection, plasmids were mixed with the transfection reagent polyethyleneimine (PEI, Polysciences Europe GmbH) in a ratio of 1:3 in serum-free medium. After an incubation step of 30 min at room temperature, the mixture was added to the cells for 5 h and then replaced by fresh medium. After 24 h of serum starvation, culture medium was replaced with fresh serum-free medium alone or containing 0.5 μM

recombinant sADAM10 or sADAM17. For the detection of C-terminal fragments (CTFs), the medium was additionally supplemented with the γ -secretase inhibitor DAPT. After 24 h, cell-culture supernatants were collected, cleared by centrifugation (15,000 $\times g$, 5 min, 4 °C) and cells harvested. For the analysis of ADAM17, CD23 and meprin β shedding cell supernatants were additionally ultracentrifuged at 186,000 $\times g$ for 2 h at 4 °C. For a comparable analysis of possible shedding events, supernatants were normalized to the protein content of the respective cell lysates and analyzed by immunoblotting. For concentration of respective supernatant, proteins were precipitated with trichloroacetic acid [TCA 10% (wt/vol)]. After incubation on ice for 60 min, proteins were pelleted (15,000 $\times g$, 15 min, 4 °C), washed with acetone, and dissolved in SDS-PAGE loading buffer.

Co-immunoprecipitation

The MDA-MB-231 ADAM8 knockout cell clone was transiently transfected with a human ADAM8 Flag tag expression construct [86], and after 48 h, cells were lysed in KEB buffer (50 mM Tris pH8, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% NP40, 10 mM Phenanthroline, hr Holding GmbH), PhosStopTM (Roche Deutschland Holding GmbH). A monoclonal Flag M2 antibody (# F3165, Sigma-Aldrich Inc.) or mouse IgG (Sigma-Aldrich Inc.) was covalently coupled to magnetic beads using the DynabeadsTM antibody coupling kit (# 14311D, Invitrogen AG). The cell lysates were incubated with the beads for 2 h at 4 °C, followed by three wash steps with lysis buffer. SDS-PAGE loading buffer including DTT was added to the beads and the samples were heated up to 95 °C for 5 min to elute the bounded proteins. The samples were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using specific antibodies for ADAM8 (AF1031) and ADAM17 (A300D).

For co-immunoprecipitation of mADAM17 and murine ADAM8, ADAM10 $^{-/-}$; 17 $^{-/-}$ HEK293T cells were transiently transfected as described above. After 48 h, cells were harvested and lysed in 450 μl lysis buffer (cCompleteTM protease inhibitor cocktail, 120 mM NaCl, 50 mM Tris, 0.5% NP-40, pH 7.4). The cell lysate was filled up to 1 ml with PBS and anti-myc antibody (# 2276, Cell-Signaling Technology, Inc.) added over night at 4 °C. In addition, PierceTM Protein G Agarose beads were washed with PBS three times, centrifuged (1000 $\times g$, 3 min, 4 °C), and incubated with 3% BSA/TBS over night at 4 °C. The next day, 50 μl of blocked beads were added to the sample and incubated for 30 min at 4 °C. After centrifugation (1000 $\times g$, 3 min, 4 °C), beads were washed several times with lysis buffer. After the addition of SDS-PAGE loading buffer including DTT beads were heated up to 65 °C for 30 min and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

Cell lysis, SDS-PAGE, and immunoblot analysis

Cells were harvested in ice-cold PBS and centrifuged at $1100\times g$ for 5 min at 4 °C. Cell pellets were washed three times with PBS and resuspended in lysis buffer [cOmplete™ protease inhibitor cocktail, 1% (v/v) Triton-X 100, PBS, pH 7.4] and incubated for 45 min at 4 °C. After centrifugation for 15 min at $15,000\times g$ at 4 °C, the protein amount of lysates was determined using the BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). For a comparable analysis of possible shedding events, supernatants were normalized to the protein content of the respective cell lysates and analyzed by immunoblotting.

For separation by SDS-PAGE, protein samples were boiled in sample buffer containing DTT. After blotting transfer, nitrocellulose or PVDF membranes were saturated with 5% dry milk or 3% BSA for 1 h at room temperature. Then, membranes were incubated with the primary antibody at 4 °C overnight. The following primary antibodies were used for detection: anti-GAPDH (# 2118; Cell-Signaling Technology, Inc.), anti-actin (# A2066; Sigma-Aldrich, Inc.), anti- β tubulin (# NB600-936; Novus Biologicals, LLC), anti-ADAM10 (# 124695; Abcam plc.), anti-mADAM17 (polyclonal, generated against ectodomain), anti-hADAM17 (A300D, generated against disintegrin domain), C-terminal anti-ADAM17 (# AB19027, Merck Merck KGaA), anti-hADAM8 (# PA5-47047, Thermo Fisher Scientific Inc.), anti-meprin β (polyclonal Ab, generated against ectodomain), anti-APP (IC16, monoclonal, detecting amino acids 1–8 of A β [87], anti-sAPP α (14D6, monoclonal, directed against amino acids 11–16 of A β [88], C-terminal anti-APP (CT15, polyclonal, corresponding to amino acids 680–695 of APP695) [89], anti-N-cadherin (# EPR1791; Abcam plc.), anti-Myc (# 2276, Cell-Signaling Technology, Inc.), anti-Strep (# 34850, QIAGEN GmbH), and anti-HA (# C29F4, Cell-Signaling Technology, Inc.). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific Inc.) were added in 5% dry milk/TBS for 1 h at room temperature and chemiluminescence detected using the Super Signal™ West Femto kit or SuperSignal™ West Pico PLUS kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) with the LAS-3000 Imaging System (FUJIFILM Europe GmbH).

Homology modelling

Model of murine ADAM10 (UniProt accession O35598, aa residue 215–673) was built based on the crystal structure of human ADAM10 (PDB: 6BE6) using the SWISS-MODEL workspace [90]. Structure visualization and analysis were carried out using PyMOL (Schrödinger LLC).

Protein–protein interaction network analysis

For protein–protein interaction analysis and visualization, the Cytoscape software with an implemented stringApp was used [58, 91]. The STRING database was queried with TAILS-identified substrates, TIMP-1, TIMP-3, meprin β , APP, and ADAM10/17 with a confidence cutoff score of 0.5, while 14 additional interacting proteins were accepted. Missing but experimentally confirmed interactions or shedding activities were manually integrated into the map: shedding of meprin β by ADAM10/17 [54–57], APP shedding by meprin β [75], BMP1–PCPE-1 interaction [92], BMP1–FN interaction [93], and TIMP-1 inhibition of ADAM10 [71].

Acknowledgements We thank William C. Claycomb (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Louisiana State University Health Sciences Center, New Orleans, Louisiana) for providing HL-1 cells. We thank Björn Rabe from the Biochemical Institute of the University of Kiel for ADAM10^{−/−}; 17^{−/−} HEK293T cells.

Author contributions Conceptualization, FS and CB-P; methodology, investigation, and data analysis, FS, AH, MS, JB, US, FP, RW, MB, DS-A, SR-J, CM, SFL, CUP, JWB, AT, and CB-P; writing, FS and CB-P.

Funding This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) SFB 877 (Proteolysis as a Regulatory Event in Pathophysiology, Projects A1, A9, A15 and Z2), BE 4086/2-2 (C.B.-P.), University of Lyon (C.M.), FOR2290 (S.F.L.), PI379/5-2 (C.U.P.), and BA1606/3-1 (J.W.B.).

MS data The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [95] partner repository with the data set identifier PXD013718.

References

- Hartmann M, Herrlich A, Herrlich P (2013) Who decides when to cleave an ectodomain? *Trends Biochem Sci* 38(3):111–120
- Weber S, Saftig P (2012) Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development* 139(20):3693–3709
- Duffy MJ et al (2009) The role of ADAMs in disease pathophysiology. *Clin Chim Acta* 403(1–2):31–36
- Lichtenthaler SF, Lemberg MK, Fluhrer R (2018) Proteolytic ectodomain shedding of membrane proteins in mammals—hardware, concepts, and recent developments. *EMBO J* 37(15):e99456
- Hayashida K et al (2010) Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding. *Anat Rec (Hoboken)* 293(6):925–937
- Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ (2008) The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29(5):258–289
- Takeda S (2016) ADAM and ADAMTS family proteins and snake venom metalloproteinases: a structural overview. *Toxins (Basel)* 8(5):155
- Giebler N, Zigrino P (2016) A disintegrin and metalloprotease (ADAM): historical overview of their functions. *Toxins (Basel)* 8(4):122

9. Reiss K, Saftig P (2009) The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol* 20(2):126–137
10. Janes PW et al (2005) Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* 123(2):291–304
11. Pruessmeyer J, Ludwig A (2009) The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Semin Cell Dev Biol* 20(2):164–174
12. Zunke F, Rose-John S (2017) The shedding protease ADAM17: physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 1864(11 Pt B):2059–2070
13. Matthews AL et al (2017) Regulation of A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family sheddases ADAM10 and ADAM17: the emerging role of tetraspanins and rhomboids. *Platelets* 28(4):333–341
14. Saftig P, Reiss K (2011) The “A Disintegrin And Metalloproteases” ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol* 90(6–7):527–535
15. Wetzel S, Seipold L, Saftig P (2017) The metalloproteinase ADAM10: a useful therapeutic target? *Biochim Biophys Acta* 1864(11 Pt B):2071–2081
16. Scheller J et al (2011) ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol* 32(8):380–387
17. Peschon JJ et al (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282(5392):1281–1284
18. Hartmann D et al (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
19. Chalaris A et al (2010) Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med* 207(8):1617–1624
20. Zhang C et al (2010) Adam10 is essential for early embryonic cardiovascular development. *Dev Dyn* 239(10):2594–2602
21. Shi W et al (2003) TACE is required for fetal murine cardiac development and modeling. *Dev Biol* 261(2):371–380
22. Jackson LF et al (2003) Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *EMBO J* 22(11):2704–2716
23. Satoh M et al (2000) Expression of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme and tumor necrosis factor-alpha in human myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 36(4):1288–1294
24. Fedak PW et al (2006) Altered expression of disintegrin metalloproteinases and their inhibitor in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 113(2):238–245
25. Arndt M et al (2002) Altered expression of ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) in fibrillating human atria. *Circulation* 105(6):720–725
26. Fan D et al (2015) Cardiomyocyte A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) is essential in post-myocardial infarction repair by regulating angiogenesis. *Circ Heart Fail* 8(5):970–979
27. Akatsu T et al (2003) Increased mRNA expression of tumour necrosis factor-alpha and its converting enzyme in circulating leucocytes of patients with acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 105(1):39–44
28. Toussey T et al (2009) ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem* 284(17):11738–11747
29. Groth E et al (2016) Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes. *Biochim Biophys Acta* 1863(11):2795–2808
30. Sun Q et al (2014) Increased plasma TACE activity in subjects with mild cognitive impairment and patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 41(3):877–886
31. Bertram A et al (2015) Circulating ADAM17 level reflects disease activity in proteinase-3 ANCA-associated vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 26(11):2860–2870
32. Kleifeld O et al (2010) Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. *Nat Biotechnol* 28(3):281–288
33. Conrad C et al (2018) ADAM8 expression in breast cancer derived brain metastases: functional implications on MMP-9 expression and transendothelial migration in breast cancer cells. *Int J Cancer* 142(4):779–791
34. Hundhausen C et al (2003) The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 102(4):1186–1195
35. Schlomann U et al (2015) ADAM8 as a drug target in pancreatic cancer. *Nat Commun* 6:6175
36. Jiang J et al (2011) Ectodomain shedding and autocleavage of the cardiac membrane protease corin. *J Biol Chem* 286(12):10066–10072
37. Prudova A et al (2016) TAILS N-terminomics and proteomics show protein degradation dominates over proteolytic processing by cathepsins in pancreatic tumors. *Cell Rep* 16(6):1762–1773
38. Tucher J et al (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
39. Caescu CI, Jeschke GR, Turk BE (2009) Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem J* 424(1):79–88
40. Seegar TCM et al (2017) Structural basis for regulated proteolysis by the alpha-secretase ADAM10. *Cell* 171(7):1638–1648 e7
41. Li L, Zhao Q, Kong W (2018) Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Matrix Biol* 68:490–506
42. Frolova EG et al (2012) Thrombospondin-4 regulates fibrosis and remodeling of the myocardium in response to pressure overload. *Faseb J* 26(6):2363–2373
43. Radice GL et al (1997) Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol* 181(1):64–78
44. Turk V, Stoka V, Turk D (2008) Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Front Biosci* 13:5406–5420
45. Pixley FJ, Stanley ER (2004) CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol* 14(11):628–638
46. Hohensinner PJ et al (2007) Macrophage colony stimulating factor expression in human cardiac cells is upregulated by tumor necrosis factor-alpha via an NF-kappaB dependent mechanism. *J Thromb Haemost* 5(12):2520–2528
47. Reiss K et al (2005) ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J* 24(4):742–752
48. Lammich S et al (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(7):3922–3927
49. Kuhn PH et al (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29(17):3020–3032
50. Jorissen E et al (2010) The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci* 30(14):4833–4844

51. Hedrich J et al (2010) Fetuin-A and Cystatin C are endogenous inhibitors of human meprin metalloproteases. *Biochemistry* 49(39):8599–8607
52. Buxbaum JD et al (1998) Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273(43):27765–27767
53. Allinson TM et al (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74(3):342–352
54. Herzog C et al (2014) ADAM10 is the major sheddase responsible for the release of membrane-associated meprin A. *J Biol Chem* 289(19):13308–13322
55. Hahn D et al (2003) Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced ectodomain shedding and phosphorylation of the human meprin-beta metalloprotease. *J Biol Chem* 278(44):42829–42839
56. Jefferson T et al (2013) The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin beta and ADAM10. *Cell Mol Life Sci* 70(2):309–333
57. Wichert R et al (2017) Mucus detachment by host metalloprotease meprin beta requires shedding of its inactive pro-form, which is abrogated by the pathogenic protease RgpB. *Cell Rep* 21(8):2090–2103
58. Szklarczyk D et al (2017) The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* 45(D1):D362–D368
59. Scharfenberg F et al (2019) Regulation of the alternative β -secretase meprin β by ADAM-mediated shedding. *Cell Mol Life Sci*. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03179-1>
60. Saftig P, Lichtenthaler SF (2015) The alpha secretase ADAM10: a metalloprotease with multiple functions in the brain. *Prog Neurobiol* 135:1–20
61. Doedens JR, Black RA (2000) Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem* 275(19):14598–14607
62. Marcello E et al (2013) Endocytosis of synaptic ADAM10 in neuronal plasticity and Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 123(6):2523–2538
63. Stoeck A et al (2006) A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J* 393(Pt 3):609–618
64. Moss ML et al (2011) ADAM9 inhibition increases membrane activity of ADAM10 and controls alpha-secretase processing of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 286(47):40443–40451
65. Jiang H et al (2011) Elevated CSF levels of TACE activity and soluble TNF receptors in subjects with mild cognitive impairment and patients with Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 6:69
66. Conrad C et al (2017) Profiling of metalloprotease activities in cerebrospinal fluids of patients with neoplastic meningitis. *Fluids Barriers CNS* 14(1):22
67. Bostanci N et al (2008) Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE) levels in periodontal diseases. *J Dent Res* 87(3):273–277
68. Li X et al (2008) A tumor necrosis factor-alpha-mediated pathway promoting autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Med* 14(8):863–868
69. Maskos K et al (1998) Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(7):3408–3412
70. Arpino V, Brock M, Gill SE (2015) The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol* 44–46:247–254
71. Amour A et al (2000) The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett* 473(3):275–279
72. Amour A et al (1998) TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett* 435(1):39–44
73. Jagdeo JM et al (2018) N-Terminomics TAILS identifies host cell substrates of poliovirus and coxsackievirus B3 3C proteinases that modulate virus infection. *J Virol* 92(8):e02211-17
74. Schlage P et al (2014) Time-resolved analysis of the matrix metalloproteinase 10 substrate degradome. *Mol Cell Proteomics* 13(2):580–593
75. Jefferson T et al (2011) Metalloprotease meprin beta generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo. *J Biol Chem* 286(31):27741–27750
76. Arnold P et al (2017) Meprin metalloproteases generate biologically active soluble interleukin-6 receptor to induce trans-signaling. *Sci Rep* 7:44053
77. Schutte A et al (2014) Microbial-induced meprin beta cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(34):12396–12401
78. Cavadas M et al (2017) Phosphorylation of iRhom2 controls stimulated proteolytic shedding by the metalloprotease ADAM17/TACE. *Cell Rep* 21(3):745–757
79. Oikonomidi I et al (2018) iTAP, a novel iRhom interactor, controls TNF secretion by policing the stability of iRhom/TACE. *Elife* 7:e35032
80. Riethmueller S et al (2016) Cleavage site localization differentially controls interleukin-6 receptor proteolysis by ADAM10 and ADAM17. *Sci Rep* 6:25550
81. Becker C et al (2003) Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin. *Biol Chem* 384(5):825–831
82. Peters F et al (2019) Tethering soluble meprin α in an enzyme complex to the cell surface affects IBD-associated genes. *FASEB J* 33(6):7490–7504
83. Becker-Pauly C et al (2007) The α and β subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol* 127(5):1115–1125
84. Prudova A et al (2010) Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 9(5):894–911
85. Blanc G et al (2007) Insights into how CUB domains can exert specific functions while sharing a common fold: conserved and specific features of the CUB1 domain contribute to the molecular basis of procollagen C-proteinase enhancer-1 activity. *J Biol Chem* 282(23):16924–16933
86. Schlomann U et al (2002) The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. *J Biol Chem* 277(50):48210–48219
87. Richter L et al (2010) Amyloid beta 42 peptide (A β 42)-lowering compounds directly bind to A β and interfere with amyloid precursor protein (APP) transmembrane dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(33):14597–14602
88. Colombo A et al (2013) Constitutive alpha- and beta-secretase cleavages of the amyloid precursor protein are partially coupled in neurons, but not in frequently used cell lines. *Neurobiol Dis* 49:137–147
89. Soriano S et al (2001) The amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein (APP) is independent of its cleavage by caspases. *J Biol Chem* 276(31):29045–29050
90. Waterhouse A et al (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 46(W1):W296–W303
91. Shannon P et al (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13(11):2498–2504

92. Bekhouche M et al (2010) Role of the netrin-like domain of pro-collagen C-proteinase enhancer-1 in the control of metalloproteinase activity. *J Biol Chem* 285(21):15950–15959
93. Huang G et al (2009) Fibronectin binds and enhances the activity of bone morphogenetic protein 1. *J Biol Chem* 284(38):25879–25888
94. Colaert N et al (2009) Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo. *Nat Methods* 6(11):786–787
95. Perez-Riverol Y et al (2019) The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res* 47(D1):D442–D450

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Characterization of the Cancer-Associated Meprin Beta Variants G45R and G89R

Antonin Gellrich^{1†}, Franka Scharfenberg^{1†}, Florian Peters², Martin Sammel¹, Ole Helm³, Fred Armbrust¹, Frederike Schmidt¹, Juliane Lokau⁴, Christoph Garbers⁴, Susanne Sebens³, Philipp Arnold⁵ and Christoph Becker-Pauly^{1*}

¹Biochemical Institute, Kiel University, Kiel, Germany, ²Department of Ophthalmology, Laboratory for Retinal Cell Biology, University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland, ³Institute for Experimental Cancer Research, Kiel University, Kiel, Germany, ⁴Institute of Pathology, Otto-von-Guericke University Magdeburg, Magdeburg, Germany, ⁵Institute of Functional and Clinical Anatomy, FAU Erlangen, Erlangen, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Salvatore Santamaria,
Imperial College London,
United Kingdom

Reviewed by:

Rens de Groot,
University College London,
United Kingdom
Simone Dario Scilabra,
Helmholtz Association of German
Research Centers (HZ), Germany

*Correspondence:

Christoph Becker-Pauly
cbeckerpauly@biochem.uni-kiel.de

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Protein Chemistry and Enzymology,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Biosciences

Received: 29 April 2021

Accepted: 16 August 2021

Published: 06 October 2021

Citation:

Gellrich A, Scharfenberg F, Peters F,
Sammel M, Helm O, Armbrust F,
Schmidt F, Lokau J, Garbers C,
Sebens S, Arnold P and
Becker-Pauly C (2021)
Characterization of the Cancer-
Associated Meprin Beta Variants
G45R and G89R.
Front. Mol. Biosci. 8:702341.
doi: 10.3389/fmolb.2021.702341

Meprin β is a metalloprotease associated with neurodegeneration, inflammation, extracellular matrix homeostasis, transendothelial cell migration, and cancer. In this study, we investigated two melanoma-associated variants of meprin β , both exhibiting a single amino acid exchange, namely, meprin β G45R and G89R. Based on the structural data of meprin β and with regard to the position of the amino acid exchanges, we hypothesized an increase in proteolytic activity in the case of the G45R variant due to the induction of a potential new activation site and a decrease in proteolytic activity from the G89R variant due to structural instability. Indeed, the G89R variant showed, overall, a reduced expression level compared to wild-type meprin β , accompanied by decreased activity and lower cell surface expression but strong accumulation in the endoplasmic reticulum. This was further supported by the analysis of the shedding of the interleukin-6 receptor (IL-6R) by meprin β and its variants. In transfected HEK cells, the G89R variant was found to generate less soluble IL-6R, whereas the expression of meprin β G45R resulted in increased shedding of the IL-6R compared to wild-type meprin β and the G89R variant. A similar tendency of the induced shedding capacity of G45R was seen for the well-described meprin β substrate CD99. Furthermore, employing an assay for cell migration in a collagen IV matrix, we observed that the transfection of wild-type meprin β and the G45R variant resulted in increased migration of HeLa cells, while the G89R variant led to diminished mobility.

Keywords: metalloprotease, meprin, sheddase, IL-6, CD99, APP, ADAM

INTRODUCTION

Meprin β is a metalloprotease of the astacin family of zinc endopeptidases. As a multidomain homodimer and a type I transmembrane protein, it is tethered to the cell surface or it can be shed from the plasma membrane by other proteases such as ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) (Broder and Becker-Pauly 2013; Wichert et al., 2017; Scharfenberg et al., 2019). Expressed as a zymogen, meprin β must be activated by proteases with tryptic specificity due to an arginine residue at the P1 position of the activation site. At the cell surface, the activation of meprin β can be achieved by membrane-bound matriptase 2 (Jackle et al., 2015) or as a shed protein by soluble serine proteases,

such as kallikrein 4/5 or pancreatic trypsin (Ohler et al., 2010). Of note, once activated at the plasma membrane, meprin β cannot be shed from the cell surface anymore (Wichert et al., 2017). Hence, meprin β occurs as a membrane-bound sheddase or soluble protease with access to different protein substrates.

Proteolysis of extracellular matrix and adhesion molecules is a very important factor in the context of cancer progression and metastasis. Meprin β is capable of cleaving off the prodomains of fibrillar collagens I and III, thereby inducing a collagen fibril assembly and deposition (Kronenberg et al., 2010; Broder et al., 2013). In this regard, meprin β has been associated with fibrotic conditions of the skin and in the lungs (Becker-Pauly et al., 2007; Biasin et al., 2014). On the other hand, meprin β is able to degrade collagen IV, an important component of the basal membrane, and thus may contribute to cancer cell metastasis (Kruse et al., 2004). Furthermore, meprin β has been shown to cleave different cell adhesion molecules. The expression of E-cadherin, a major adhesion molecule of the epithelium, was shown to be decreased compared to carcinoma and adenoma (Perl et al., 1998). Interestingly, E-cadherin is a substrate of meprin β (Huguenin et al., 2008), which could lead, in the case of dysregulation in the expression and functionality due to mutations, to tumor progression from adenoma to carcinoma. The adhesion molecule CD99 is overexpressed in many types of cancer, particularly in Ewing sarcoma and specific subtypes of leukemia (Manara et al., 2018; Pasello et al., 2018). CD99 is crucial for the transendothelial migration (TEM) of leukocytes promoting the final step of cell extravasation. The type I transmembrane protein is expressed on hematopoietic and endothelial cells (Jefferson et al., 2013; Bedau et al., 2017a; Bedau et al., 2017b). Being a substrate of meprin β , the cleavage of CD99 could influence tumor metastasis.

Another substrate of meprin β is the interleukin-6 receptor (IL-6R), which in its shed soluble form can induce a strong proinflammatory stimulus *via* the so-called IL-6 trans-signaling (Rose-John, 2012). Inflammatory processes and cancer progression are highly connected, mediated by cytokines like the IL-6R and other immunomodulatory molecules in the tumor microenvironment (Balkwill and Mantovani 2001; Fisher et al., 2014). It was observed that a selective blockage of IL-6 trans-signaling with the sgp130Fc protein (Olamkicept) had a suppressive effect on the tumorigenesis and metastasis of colorectal cancer (Schmidt et al., 2018; Schumacher and Rose-John 2019).

Meprin β has been associated with certain types of cancer, and its expression was observed in pancreatic and neuroendocrine tumors (Carr et al., 2013). Searching the BioMuta database (Dingerdisen et al., 2018), several single nucleotide variants (SNVs) of the Mep1b gene can be found in different cancer entities identified by multiple genomic studies, with the largest number identified in melanoma, uterine cancer, and lung cancer (Peters and Becker-Pauly, 2019). In this study, we characterized the melanoma-associated meprin β variants G45R and G89R with regard to cell surface expression, shedding activity, cell proliferation, and tumor cell invasion.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All chemicals were of analytical grade and obtained from Carl Roth GmbH + Co. KG, Merck KGaA, and Sigma-Aldrich Inc., and Thermo Fisher Scientific Inc., if not stated otherwise.

Cells, Transfection, Plasmids, and Antibodies

ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells (Riethmueller et al., 2016), deficient for the metalloproteases ADAM10 and ADAM17, were kindly provided by Björn Rabe, University of Kiel. HeLa and COS-7 cells were obtained from DSMZ GmbH (Braunschweig, Germany), and Ba/F3-gp130 cells (Gearing et al., 1994) were obtained from Immunex (Seattle, WA, United States). All cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) and high glucose culture medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), L-glutamine, and 1% penicillin and streptomycin (Thermo Fisher Scientific) and cultured at 37°C in 5% CO₂ atmosphere and at 95% relative humidity. Ba/F3-gp130 cells were cultured using 10 ng/ml recombinant hyper-IL-6, which was expressed and purified as described previously (Fischer et al., 1997). Transient transfection was performed with polyethylenimine according to the manufacturer's instructions. The following plasmids were used: human meprin β in the pcDNA4/TO-3x-Flag vector, human meprin β G45R in the pcDNA4/TO-3x-Flag vector, human meprin β G89R in the pcDNA4/TO-3x-Flag vector, human IL-6R, human CD99-Myc in pCMV6, APP695 in pCI-neo, and pcDNA3.1 as the empty vector control. The following antibodies were used: polyclonal anti-meprin β (generated against the ectodomain peptide CGMIQSSGDSADWQRVSQ, Pineda Antibody-Service, Berlin, Germany), monoclonal anti-IL-6R (4-11, generated against the D1 domain), monoclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (2,118, 14C10; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, United States), monoclonal anti-Flag (M2, F1804; MilliporeSigma), polyclonal anti-transferrin receptor (ab84036; Abcam, Cambridge, United Kingdom), monoclonal anti-Myc (9B11, 2,276; Cell Signaling Technology), phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (pSTAT3) (9,131, Y705, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, United States), STAT3 (9,139, 124H6, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, United States), monoclonal anti-N-terminal APP (22C11; MilliporeSigma), polyclonal C-terminal anti-APP (CT15) and monoclonal anti-soluble APP α (6E10; Covance, Princeton, NJ, United States), and anti-PDI6 (ab11432; Abcam, Cambridge, United Kingdom).

Generating Meprin β Variants G45R and G89R

Using the meprin β pcDNA4/TO construct with a C-terminal FLAG-tag as the template, the two variants G45R and G89R were generated. For exchanging single nucleotides, we applied

appropriate primers (meprin β G45R: 5'-CAATGAAGGTTT GAGACTGGATCTTTTGGAGGG-3' and 5'-CCCT CAAAAA GATCCAGTCTCAAACCTTCATTG-3' and meprin β G89R: 5'-GGAAATG AATGCTAAG CGAGTTATCCTCAATGC-3' and 5'-GCATTGAGGATAACTCGCTTAGCATTCAATTC-3') and the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) following the manufacturer's instructions. To validate the correct single nucleotide exchanges of variants G45R and G89R, the cDNA of the Mep1b gene was sequenced by GATC Biotech, Konstanz, Germany.

Cell Lysis, SDS-PAGE, and Western Blot Analysis

Transfected cells were harvested 48 h after transfection. For C-terminal fragment analysis, cells were treated with 1 μ M γ -secretase inhibitor DAPT overnight prior to cell lysis. PBS-washed cells were lysed in 1% Triton X-100 and the protease inhibitor tablet with EDTA (Roche) in PBS. The protein concentration was determined using the BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. Samples were heated in sample buffer including DTT for 10 min at 95°C. The total protein lysate (30 μ g) was separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF or nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Waukesha, WI, United States). Membranes were blocked with 5% dry milk or 3% BSA diluted in TBS for 1 h at room temperature, incubated overnight with the primary antibody in milk at 4°C, washed three times with TBS, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody in TBS at room temperature. After further washes, membranes were developed with SuperSignal West Femto (Thermo Fisher Scientific) in a chemiluminescence detection system (LAS-3000; Fujifilm, Tokyo, Japan).

Protein Deglycosylation

The total protein lysate (60 μ g) of transfected ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells was deglycosylated using PNGase F according to the manufacturer's instructions (P0704; New England Biolabs, Ipswich, MA, United States).

Cell Surface Biotinylation

ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells were transiently transfected with meprin β variants or empty vectors and incubated for 24 h. Cells were washed twice with ice-cold PBS-CaCl₂ and MgCl₂ (CM) (CM: 0.1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂ in PBS) and treated with 1 mg/ml biotin solution (Sulfo-NHS-SS-Biotin; Thermo Fisher Scientific) in PBS-CM for 30 min at 4°C. The biotin solution was removed, and cells were incubated with quenching buffer (50 mM Tris-HCl in PBS-CM, pH 8) for 10 min at 4°C, washed three times with PBS-CM, and harvested. Subsequently, cells were lysed and the protein concentration was determined using the BCA assay kit following the instruction manual. For the purification of biotin-labeled proteins, streptavidin-coated magnetic beads (88,816, Thermo Fisher Scientific) were used according to the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence Microscopy

The immunofluorescence staining of Cos-7 cells, which were seeded on coverslips, was performed 24 h after transfection as described previously (Peters et al., 2019). In brief, cells were washed three times with PBS and fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS for 10 min. After cell permeabilization with 0.2% (w/v) saponin, cells were incubated with the primary antibody (anti-Flag 1:2000 and anti-PDI6 1:1000 in 1xPBS with 10% FCS) for 1 h, washed, and then incubated with the respective secondary antibody (Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit and Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse, 1:300; Thermo Fisher Scientific). The excessive antibody was removed by five washes in 0.2% (w/v) saponin and PBS and two washes in double-distilled H₂O. The coverslips were mounted onto slides with a mixture of 17% (w/v) Mowiol, 33% (v/v) glycerol, and 50 mg/ml 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (MilliporeSigma) supplemented with 1 μ g/ml DAPI for nuclear staining. Images were acquired on an Olympus FV 1000 confocal laser scanning microscope (Olympus, Hamburg, Germany).

Quenched Fluorogenic Peptide Cleavage Assay

To quantify meprin β activity in cell lysates and at the cell surface, a highly specific fluorogenic peptide substrate for meprin β [7-methyloxycoumarin-4-yl (mca)-EDEDED-K- ϵ -2,4-dinitrophenyl (dnp), Genosphere Biotechnologies, Paris, France] was used in a final concentration of 50 μ M (Jackle et al., 2015). For meprin β cell surface activity, transfected ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells were washed three times in PBS and activity measurements were performed with 0.5×10^6 cells in 48-well plates in a total volume of 300 μ l. For cell lysate activity, cells were lysed using EDTA free lysis buffer, and a total amount of 50 μ g protein was used for the activity assays. For trypsin activation, cells and lysates were incubated with 10 μ g/ml of recombinant trypsin (Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C prior to measurement. Remaining cell suspensions were used for Western blot analyses. All activity assays were carried out in duplicates at 37°C. Proteolytic activity was measured as relative fluorescence units (RFUs) every 30 s for 120 min at an excitation of 405 nm and emission of 320 nm using the Tecan Infinite® F200 PRO plate reader (Tecan Trading AG). The activity was determined from the slope of the linear range of the curve normalized to the initial point of the measurement and presented as a bar graph.

Ba/F3-gp130 STAT3 Phosphorylation Assay

The biological activity of the sIL-6R was analyzed as described previously (Sammel et al., 2019). In brief, after washing with PBS, Ba/F3-gp130 cells were incubated in serum-free medium for 2 h. Cells were incubated with an ultracentrifuged (186,000 $\times$ g for 2 h at 4°C), conditioned cell culture supernatant of ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells co-transfected with meprin β variants and the IL-6R; 150 ng recombinant IL-6 was added. 150 ng hyper-IL-6 (Fischer et al., 1997; Schroers et al., 2005) served as positive control. Cells were incubated at 37°C and were shook for 15 min at 500 rpm followed by centrifugation at 1000 $\times$ g for 5 min at

room temperature. After discarding the supernatant, cells were lysed in sample-buffer for 10 min at 95°C. Phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (p-STAT3) levels were detected by Western blot analysis. STAT3 served as the control.

Real Time Cell Analysis Invasion Assay

A real-time cell analysis (RTCA) system was used for testing the invasiveness of cells overexpressing meprin β and its variants G45R and G89R. RTCA (ACEA Bio, San Diego, CA, United States) is a method measuring the density-dependent variation of cell population growth using a sensitive micro-sensor system. The CIM-plate 16 used in this experiment is a two-chamber-well within a micro-sensor plate beneath a membrane with 8 μ m pores. The top of the membrane was coated with a layer of collagen IV (Sigma-Aldrich C5533, 12 μ g per well). The medium was measured to detect the background impedance. HeLa cells were transiently transfected with the meprin β variants, and 40.000 cells in a volume of 100 μ l medium with 1% FCS were transferred into the upper chamber onto the layer of collagen IV. To prevent the cells from evaporating, the plate around the wells was filled with sterile PBS and covered with a lid. Pre-incubation of 1 h enabled all cells to adhere onto the layer of collagen IV before starting the RTCA experiment. RTCA was run for 24 h, measuring the cell index every 30 min at 37°C and 5% CO₂. The cells passing through the layer of collagen IV touching the microelectrode increased the impedance. This was calculated automatically in the dimensionless cell index. The equation for the cell index is as follows: $CI = (Z_i - Z_0) / 15 \Omega$. Z_i is the individual impedance of each well to a certain time point and Z_0 is the impedance of the time point at 15 min at the beginning. To be able to ignore a possible variability of cell numbers between the wells, a delta cell index was calculated and added. The formula for the delta cell index is as follows: $DCI_{ti} = CI_{ti} + (DCI_{reference} - CI_{Delta_time})$. Therefore, the delta cell index is a constant number for each well representing the difference between reference DCI and the cell index. For statistical analysis, the area under the curve (AUC) or the end-point number was used.

Homology Modeling

The model of the membrane-bound meprin β dimer was built based on the crystal structure of human pro-meprin β (PDB ID: 4GWM) and a molecular model of the membrane-bound form, containing the EGF-like domains, the transmembrane helix, and the C-terminal tail (Arolas et al., 2012), using the SWISS-MODEL workspace (Waterhouse et al., 2018). Structure visualization was carried out using PyMOL (Schrödinger, New York, NY, United States).

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using Prism 8 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States) for a one-way ANOVA followed by Tukey's post-test. Values are expressed as means $\pm$ sd. The null hypothesis was rejected at a value of $p < 0.05$.

RESULTS

Localization and Cell Surface Expression of Meprin β Variants G45R and G89R

Based on the crystal structure of meprin β , we hypothesized a decrease in proteolytic activity for the G89R variant, having an additional arginine at the back of the catalytic domain at the interface to the TRAF domain, which may disturb proper folding (Figure 1A). The second meprin β variant G45R could insert a potential cleavage site into the propeptide, which likely promotes faster activation of the protease (Figure 1A). Since meprin β can be activated at the cell surface or in its soluble shed form, it was important to first investigate whether the cancer-associated variants G45R and G89R are correctly transported to the cell surface. Therefore, we performed cell surface biotinylation experiments of transfected HEK293T cells, deficient for ADAM10 and ADAM17, to prevent physiological ADAM-mediated shedding of meprin β . The biotin pulldown showed comparable cell surface levels for wild-type meprin β and the G45R variant, whereas clearly less levels of the meprin β variant G89R were detected at the cell surface (Figure 1B). However, it has to be considered that, on the one hand, the overall expression level of the meprin β variant G89R was clearly reduced in comparison to wild-type meprin β and G45R. On the other hand, the relative amount of the less glycosylated ER-form of meprin β detectable at about 100 kDa (Peters et al., 2019) was increased compared to the fully glycosylated form at about 130 kDa in the cell lysates of meprin β G89R (Supplementary Figure S1).

Within the biotinylated fractions of the meprin β variants, the majority of the detected meprin β corresponds to the higher molecular mass in the case of wild-type meprin β and its G45R variant, whereas only a similar trend was observed for meprin β G89R (Figure 1B). This suggests that the G89R mutation has a fold-impairing effect for meprin β that also affects its efficient N-glycosylation and transport to the cell surface.

The results were confirmed employing immunofluorescence microscopy of Cos-7 cells overexpressing the different meprin β variants (Figure 1C). Cos-7 cells were used instead of HEK293T cells due to their large size and better visibility of cellular compartments. While the G45R variant showed cell surface expression comparable to wild-type meprin β , the majority of meprin β G89R strongly co-localized with the endoplasmic reticulum marker protein disulfide isomerase (PDI). Overall, these results indicate that the G89R variant is, indeed, stuck on the secretory pathway probably due to impaired folding, causing a less efficient glycosylation.

Activation and Proteolytic Activity of Meprin β Variants G45R and G89R Using a Specific Fluorogenic Peptide Substrate

In order to investigate the functional consequences on the activation and proteolytic activity of the meprin β variants G45R and G89R, we

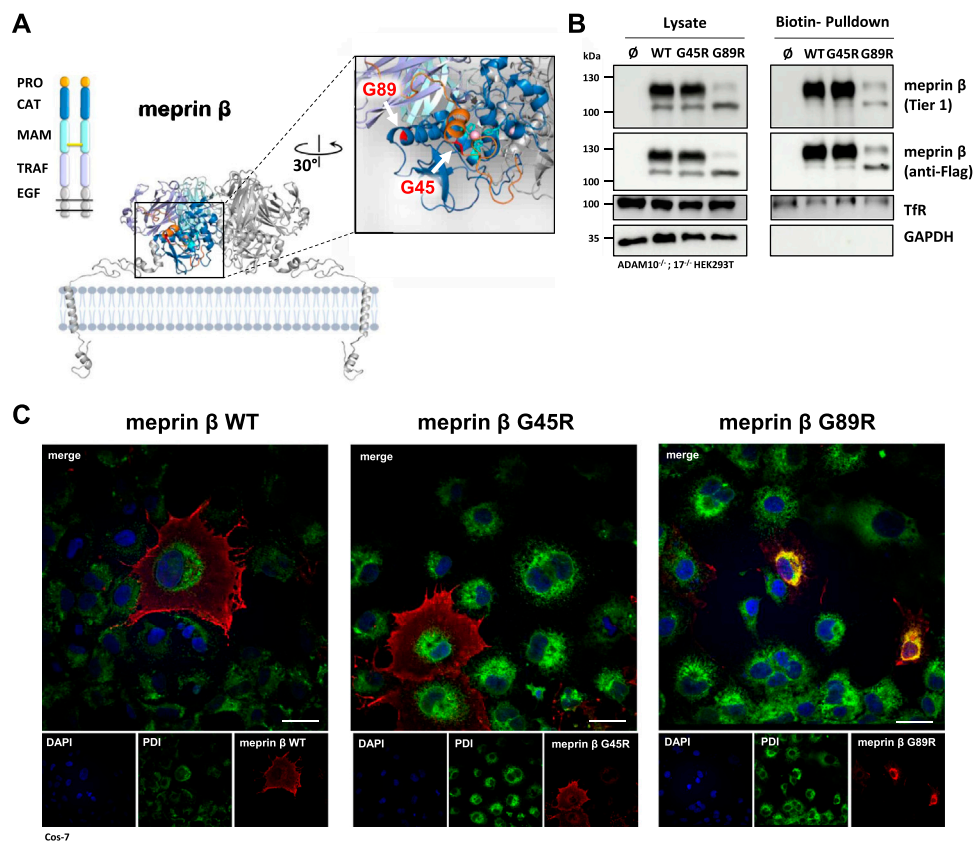


FIGURE 1 | Expression and localization of G45R, G89R, and wild-type meprin β . **(A)** Domain composition (left) and the dimeric structure of the metalloprotease meprin β (right). The cartoon representation of membrane-bound meprin β based on the crystal structure of the ectodomain of human pro-meprin β (PDB: 4GWM), with one monomer colored according to the domain composition and the other one in light gray. The close-up view on the catalytic domain (blue) in the right panel shows the pro-peptide (orange) and the three active site histidine residues (cyan) that coordinate the zinc ion (pink). The positions of the two amino acid exchange variants G45R and G89R are highlighted in red. Pro-peptide, CAT: catalytic domain, MAM: meprin A5 protein tyrosine phosphatase μ domain, TRAF: tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor domain, EGF: epidermal growth factor-like domain. The disulfide bridge between the MAM domains responsible for dimerization is indicated as a yellow bar. **(B)** Transfection of ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells with the indicated meprin β variants. Cell surface proteins were labeled by primary amine biotinylation, pulled down with streptavidin sepharose beads, and analyzed via immunoblotting. GAPDH and transferrin receptor (TfR) served as the loading controls. **(C)** Immunofluorescence images of Cos-7 cells expressing the indicated meprin β variants (red), with the endoplasmic reticulum marker protein disulfide isomerase (PDI, green) and DAPI-stained nuclei (blue). Scale bars, 20 μ m.

initially performed activity assays in cell lysates and at the cell surface of transiently transfected ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells (Figure 2A) using a meprin β -specific fluorogenic peptide (Figure 2B). Indeed, the meprin β G45R variant with a potential additional activation site did show significantly increased basal activity in cell lysates, while the cell surface activity was comparable to wild-type meprin β (Figure 2C). However, treating cell lysates and cells with the described pro-meprin β activator trypsin (Ohler et al., 2010; Jackle et al., 2015) did not result in increased proteolytic activity of meprin β G45R (Figure 2C). In the case of the G89R variant, the basal proteolytic activity in cell lysates and at the cell surface appeared to be very low (Figure 2C), which is likely also a result of the reduced expression rate. Nevertheless, the addition of trypsin showed that this meprin β variant can be activated (Figure 2C), indicating that the amino acid exchange of G89R does not lead to a complete loss of function mutation.

The Proteolytic Activity of Meprin β G45R and G89R Toward IL-6R, CD99, and APP

In addition to the fluorogenic peptide-based activity assays, we, in a next step, analyzed the proteolytic activity of the meprin β variants G45R and G89R toward three known membrane-bound meprin β protein substrates, namely, IL-6R, CD99, and APP.

IL-6R Shedding by Meprin β Variants

The soluble IL-6R plays an important role in cell proliferation and inflammation through trans-signaling (Rose-John, 2012). Not only ADAM10 and ADAM17 are capable of shedding the IL-6R (Mullberg et al., 1992) but also several other proteases, including meprin β (Arnold et al., 2017; Sammel et al., 2019). Similar to the single transfection of the three meprin β variants, the overall expression of meprin β G89R was also markedly reduced upon co-transfection with the IL-6R compared with the

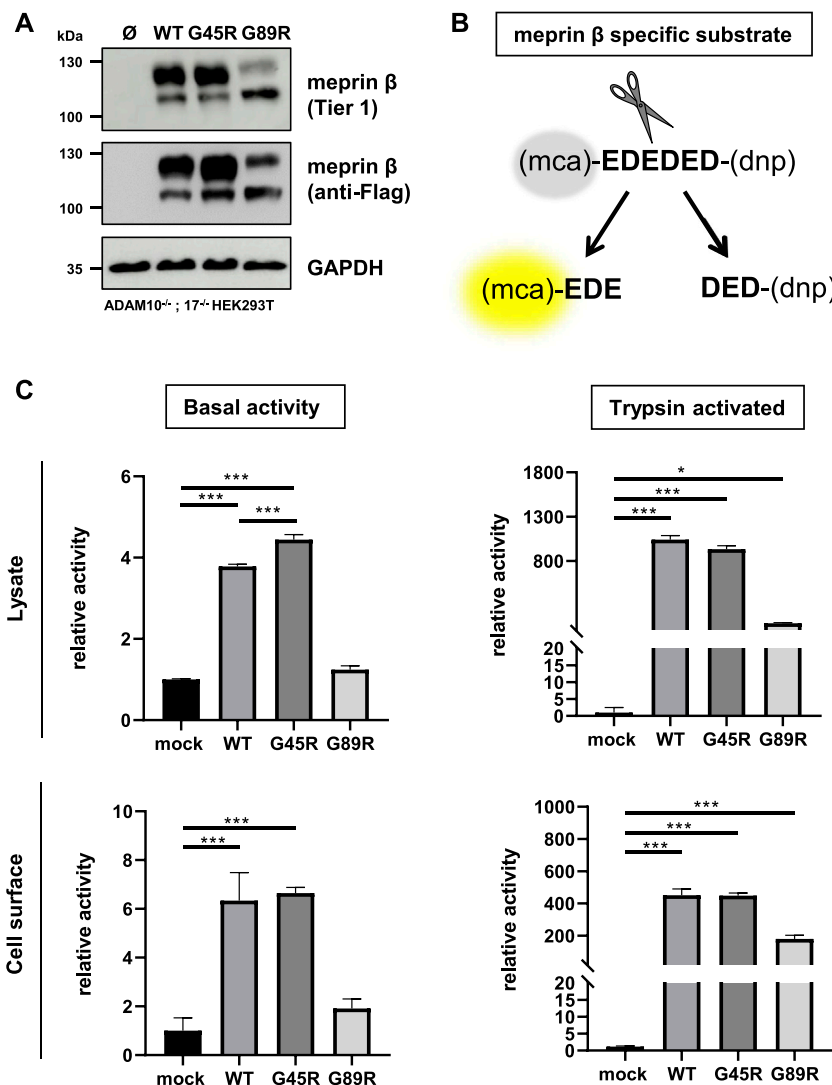


FIGURE 2 | Proteolytic activity of G45R, G89R, and wild-type meprin β toward a fluorogenic peptide. ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells were transiently transfected with a control plasmid (Ø) or one of the indicated meprin β variants. **(A)** Representative Western blot analysis of cell lysates. **(B)** Representation of the meprin β -specific quenched fluorogenic peptide used for activity assays. **(C)** Cell lysate and cell surface meprin β activity in the absence and presence of trypsin. Data are presented as means $\pm$ sd, and statistical analysis was assessed by the one-way ANOVA followed by Tukey's post-test from three biological replicates. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

other two meprin β variants (Figure 3A, Supplementary Figures S2A,B). In line with the observed increased activity measured in the cell lysates (Figure 2C), co-transfection of meprin β G45R and the IL-6R in ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells resulted in an increased release of the soluble IL-6R (sIL-6R) compared to wild-type meprin β (Figure 3A, Supplementary Figures S2A,B). Interestingly, meprin β G89R was also able to shed the IL-6R without further activation, albeit markedly less efficient than wild-type meprin β (Figures 2C, 3A; Supplementary Figures S2A,B). Normalizing the amount of generated sIL-6R to the IL-6R/meprin β levels of the cell lysate even suggests a similar proteolytic activity of meprin β G89R as wild-type meprin β (Supplementary Figure S2). However, this analysis might be

rather misleading due to the obvious strongly reduced overall expression level of meprin β G89R. Nonetheless, the results suggest that the substrate binding to this meprin β variant has a folding stabilizing effect that renders the protease as proteolytically active.

In order to analyze the biological activity of the generated sIL-6R by the different meprin β variants, Ba/F3-gp130 cells were used. This murine pro-B-cell line (Ba/F3) is stably transfected with the signal transducing receptor gp130 and does not express the IL-6R endogenously (Taga and Kishimoto 1997). Therefore, these cells require either the sIL-6R and IL-6 or hyper-IL-6 (a chimeric fusion protein of the sIL-6R and IL-6) to induce trans-signaling by the JAK/STAT-pathway via phosphorylation of

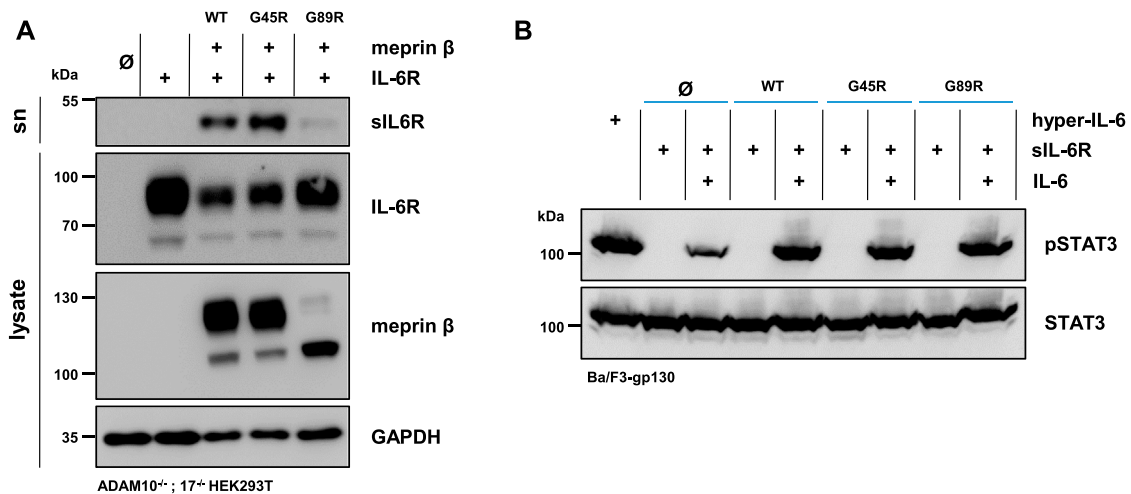


FIGURE 3 | Meprin β -dependent shedding of the IL-6R and induced trans-signaling. **(A)** Immunoblots of ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells transiently transfected with a control plasmid ($\emptyset$), IL-6R alone, and together with one of the indicated meprin β variants. Supernatants (sn) were ultracentrifuged and analyzed for sIL-6R. IL-6R and sIL-6R were detected with an antibody directed against the D1-domain of IL-6R and meprin β with an anti-Flag antibody. GAPDH served as the loading control. Of note, the amount of sIL-6R in the supernatant was increased upon the co-expression of G45R compared with meprin β WT. **(B)** Phosphorylation of STAT3 in Ba/F3-gp130 cells stably transfected with gp130. Cells were treated with ultracentrifuged supernatants from the experiments in **(A)** and the phosphorylation of STAT3 was analyzed in the presence and absence of 150 ng recombinant IL-6. The same amount of the fusion protein consisting of soluble IL-6R and IL-6 (hyper-IL-6) served as the positive control. Phosphorylation was detected with an antibody raised against phosphorylated STAT3 (pSTAT3). Total STAT3 protein served as the loading control. Western blot quantification of generated sIL-6R and pSTAT3 from three biologic replicates is presented in **Supplementary Figure S2**.

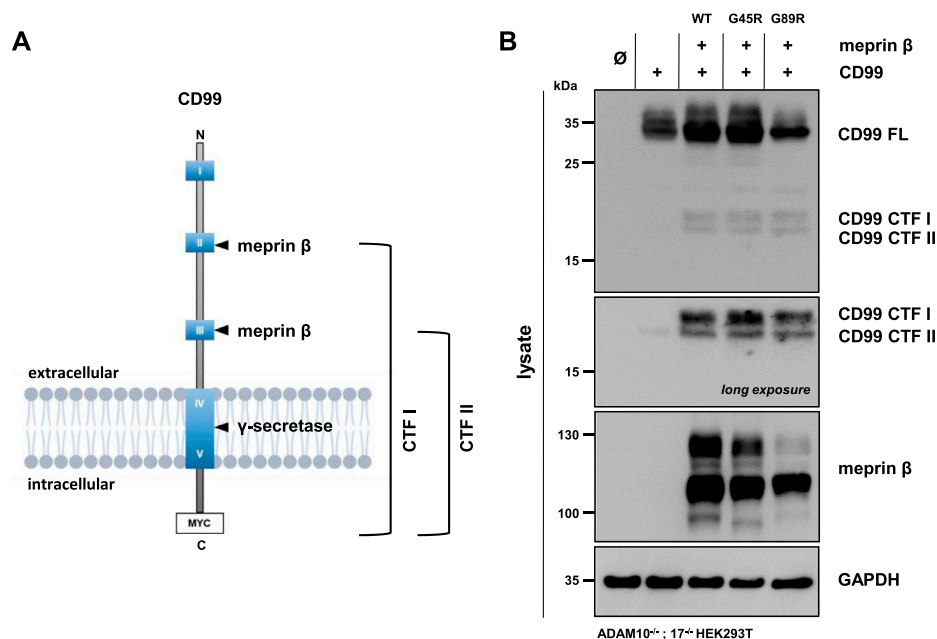


FIGURE 4 | CD99 shedding by the meprin β variants G45R and G89R. **(A)** CD99 construct used in this experiment, highlighting the highly conserved acidic regions (HCRs) as blue boxes with roman numerals, the two known cleavage sites of meprin β and the C-terminal Myc-tag. **(B)** ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells were transiently transfected with a control plasmid ($\emptyset$), CD99 alone, and together with one of the indicated meprin β variants. Cell lysates were analyzed by Western blotting using an anti-Flag antibody for meprin β and an anti-Myc antibody for CD99 detection (CD99 FL: CD99 full length; CD99 CTF I and CTF II: CD99 C-terminal fragments I and II). GAPDH served as the loading control. To determine the accumulation of γ -secretase-dependent cleavage products, the specific inhibitor DAPT was applied. Western blot quantification of generated CD99 CTFs from three biologic replicates is presented in **Supplementary Figure S3**.

STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). In accordance with the immunoblot analyses, Ba/F3-gp130 cells were incubated with conditioned media from ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells co-transfected with the IL-6R, and each of the three meprin β variants significantly induced STAT3 phosphorylation in dependence of the IL-6 in comparison to the mock control (Figure 3B, Supplementary Figure S2C).

CD99 Shedding by Meprin β Variants

Meprin β was shown to shed the adhesion molecule CD99, thereby promoting the transendothelial cell migration (TEM) of Lewis lung carcinoma (LLC) cells (Bedau et al., 2017a). The cleavage sites were identified in highly conserved acidic regions of CD99 (Bedau et al., 2017a). Comparable to JAM-A, ICAM-1, and L-selectin, CD99 controls the transendothelial migration of cells from the vessel lumen toward the interstitium for neutrophils, monocytes, and lymphocytes (Schenkel et al., 2002; Lou et al., 2007). Here, we investigated whether the meprin β variants G45R and G89R show altered cleavage efficiency of CD99. Therefore, ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells were transfected with a C-terminally tagged CD99 alone and together with the meprin β variants. CD99 shedding was analyzed by the accumulation of C-terminal fragments CTF I and CTF II in cell lysates *via* immunoblotting, as described previously (Bedau et al., 2017a) (Figure 4, Supplementary Figure S3). To block further processing of the CTF II by the γ -secretase, the γ -secretase inhibitor N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) was added to the transfected cells. As for the IL-6R, we observed that all variants of meprin β are capable of shedding CD99 and generating the fragments CTF I and CTF II (Figure 4B, Supplementary Figure S3). Similarly, the G45R variant showed a tendency of more efficient CD99 cleavage than wild-type meprin β , visualized by slightly increased levels of CTF I (Figure 4B, Supplementary Figure S3). In contrast, the G89R variant showed similar CD99 shedding capacity compared with wild-type meprin β , even without considering the normalization of the reduced expression of G89R relative to CD99 (Figure 4B, Supplementary Figure S3).

APP Shedding by Meprin β Variants

The altered glycosylation pattern of the meprin β variant G89R in cell lysates and biotinylated cell surface fractions together with its significantly reduced cell surface localization as judged by immunofluorescence microscopy has been similarly described for the meprin β variant D204A (Arnold et al., 2015). This mutation likewise results in the expression of a less glycosylated meprin β ER-form and shows only little cell surface activity compared to wild-type meprin β . However, it has a very high β -secretase activity toward the well-described meprin β substrate, amyloid precursor protein (APP), demonstrated by increased A β peptide generation (Arnold et al., 2015). Of note, APP processing by meprin β , either at the β -secretase site or at the N-terminus releasing N-APP fragments, has been observed to take place at the cell surface and even on the secretory pathway (Figure 5A) (Schönherr et al., 2016; Scharfenberg et al., 2019). Additionally, at least meprin β activity in transiently transfected HEK293 cells correlates negatively with sAPP α levels (Armbrust et al., 2021). The observed proteolytic activity of the meprin β G89R variant towards CD99 and the IL-6R suggests substrate binding and processing already on the secretory pathway. Therefore, APP

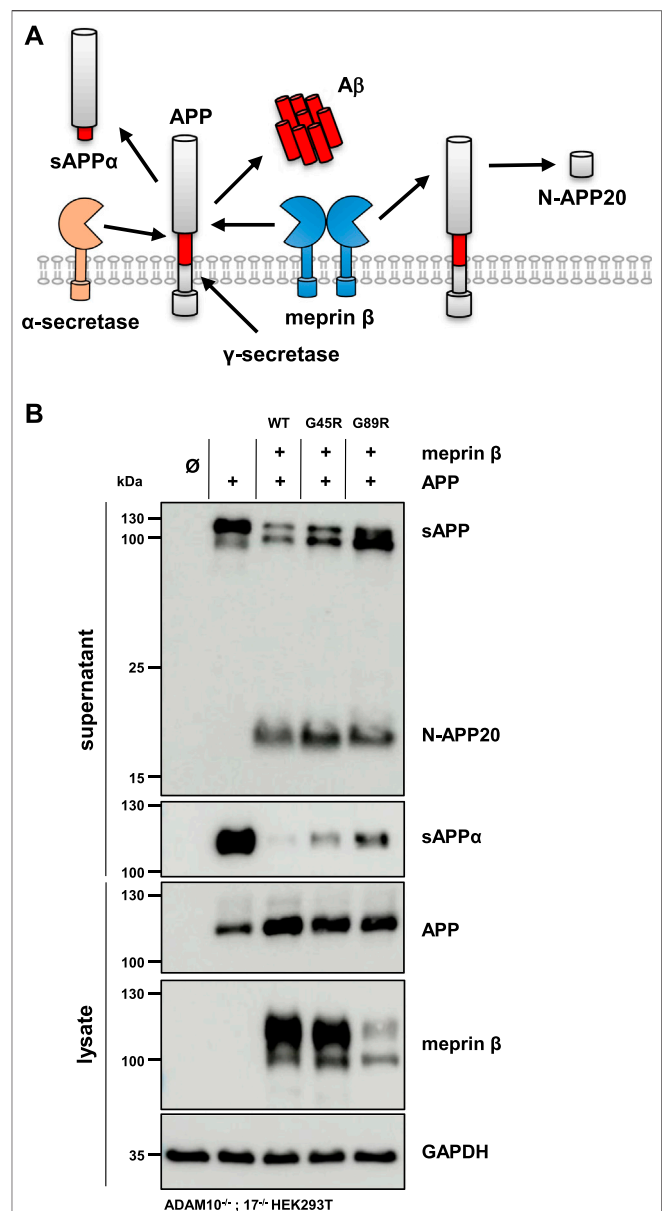
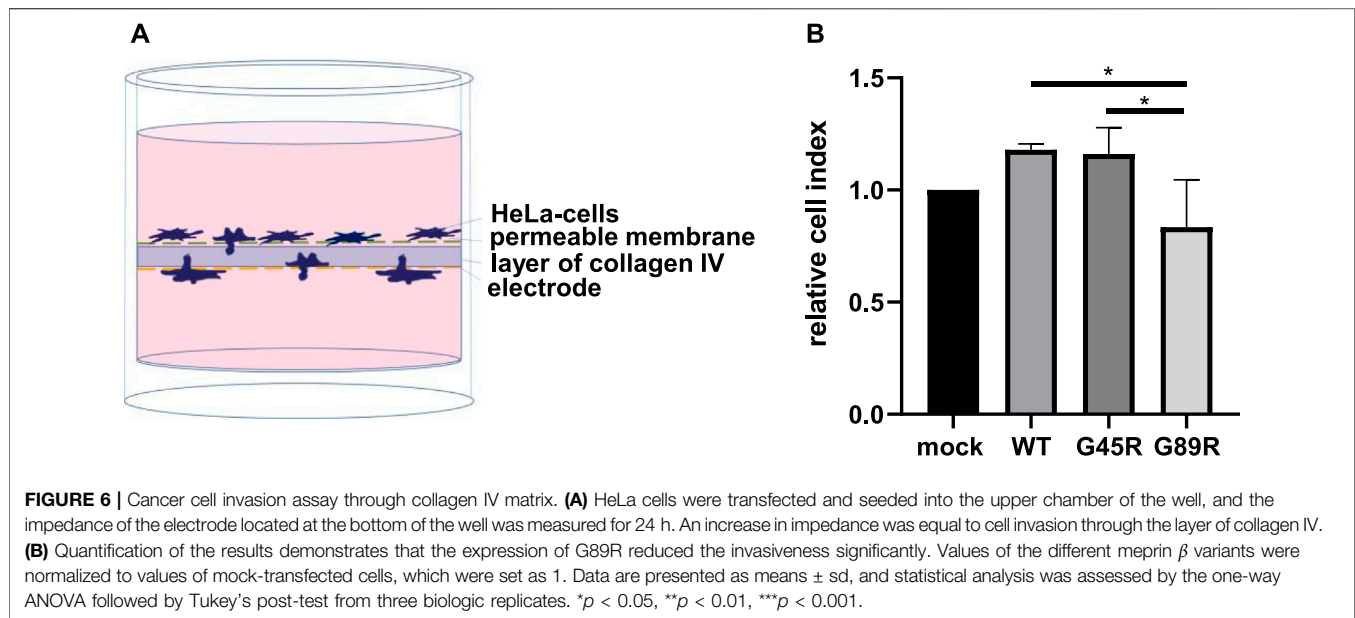


FIGURE 5 | APP processing shedding by the meprin β variants G45R and G89R. **(A)** APP is cleaved by meprin β in two distinct ways. On the one hand, non-amyloidogenic N-APP fragments are produced, and on the other hand, meprin β acts as a β -secretase, competing with α -secretase cleavage at the cell surface. **(B)** ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells were transiently transfected with a control plasmid ($\emptyset$), APP alone, and together with one of the indicated meprin β variants. Cell lysates and supernatants were analyzed by immunoblotting using an anti-Flag antibody for meprin β and specific APP antibodies (N-APP: 22C11, sAPP α : 6E10, and total APP in lysates: CT15). GAPDH served as the loading control. Western blot quantification of generated N-APP and sAPP α from three biologic replicates is presented in **Supplementary Figure S4**.

represented an ideal substrate to verify this hypothesis. In order to do so, ADAM10^{-/-}; 17^{-/-} HEK293T cells were transfected with APP alone or together with the meprin β variants. Even though these cells are deficient for the two α -secretases ADAM10 and ADAM17, APP processing at the α -secretase cleavage site is observed, most likely by a



compensatory endogenous alternative α -secretase like, e.g., ADAM9 (Asai et al., 2003). However, co-expression of wild-type meprin β and its variants resulted in the expected meprin β -dependent APP cleavage pattern (Figure 5B), with a comparable increase of N-APP20 fragments in the supernatant and decreased sAPP α levels (Figure 5B). Similarly, as observed for meprin β D204A, APP processing by meprin β G89R resulted in N-APP20 cleavage. However, in the case of meprin β G89R, sAPP α cleavage was higher compared to meprin β wild-type and G45R (Figure 5B). Similarly, as observed for CD99 shedding, the normalization of meprin β G45R proteolysis to overall expression levels would suggest that meprin β G45R is even more active than wild-type meprin β (Supplementary Figure S4B). Taken together, these findings suggest that meprin β G89R is, indeed, mainly proteolytically active on the secretory pathway.

Meprin β G89R Diminishes the Invasion of Cancer Cells Through Collagen IV

Since invasiveness is an important characteristic of cancer cells, we investigated whether meprin β variants identified in certain tumors have an influence on this process. Collagen IV is a major component of the basal lamina and thus part of an important barrier separating the epithelia from underlying tissues. It has been observed that meprin β is capable of cleaving collagen IV, which may contribute to cancer cell invasiveness (Kruse et al., 2004). Therefore, we analyzed the invasive mobility of cells passing through a semipermeable membrane coated with collagen IV (Figure 6). HeLa cells transfected with meprin β WT, G45R, and G89R or mock as negative control were transferred into wells with two chambers, divided by a layer of collagen IV (Figure 6A). Cells passing through that layer changed the impedance of the electrode placed on the bottom side. Therefore, the change in impedance was equal to the number of cells, which had passed through the layer of collagen IV. In contrast to the cell surface-expressed meprin β WT and G45R, the expression of the

meprin β G89R variant significantly diminished the invasiveness of HeLa cells (Figure 6B).

DISCUSSION

The dysregulation of proteolytic enzymes is often associated with tumor progression and metastasis, for instance, by matrix metalloproteases (MMP) degrading extracellular matrix (Winer et al., 2018). This is often caused by an increased expression of proteases by certain cancers, which may induce proliferation or mobility of these cells. Latest genomic approaches revealed that malignant hyperplasia exhibits a number of different driver or bystander mutations and several of these were identified in protease genes. Here, we investigated two cancer-associated variants of the metalloprotease meprin β , namely, G45R and G89R, both leading to an exchange of the amino acid glycine to arginine. We functionally characterized these variants in biochemical and cell biological approaches to determine possible consequences for cancer cell invasiveness.

Based on the crystal structure of meprin β (Arolas et al., 2012), we decided to investigate the biochemical properties and enzymatic functions of the meprin β variants G45R and G89R. The G45R mutation is located within the propeptide of meprin β . Knowing that the cleavage of the propeptide occurs C-terminal of the arginine at position 61 (Jackle et al., 2015), the insertion of another arginine in close proximity could lead to an enhanced activation of meprin β . For the G89R variant, we presumed that the insertion of arginine with a big positively charged sidechain into the very tight area between the catalytic domain and the TRAF domain would have a negative effect on the proteolytic activity due to impaired folding of the protein.

Indeed, we observed decreased levels of fully glycosylated G89R in cell lysates and at the plasma membrane compared to wild-type meprin β . Along the same lines, we detected higher amounts of the less glycosylated ER-form of meprin β in the case of the G89R variant. This indicates that the G89R variant was partially stuck on the

secretory pathway, which could be confirmed by the immunofluorescence analysis where an ER-marker (PDI) showed strong co-localization with G89R. This observation was further supported by a markedly reduced proteolytic activity of this meprin β variant on the plasma membrane of living cells. Nonetheless, considering the protein substrate analyses including APP processing, it turned out that substrate binding on the secretory pathway seems to have a folding stabilizing effect, which enables G89R activation and, therefore, proteolytic activity toward substrates before reaching the cell surface.

Analyzing the meprin β G45R variant, we expected the protease to be faster activated due to the inserted arginine in position 45, representing a potential additional activation site, besides the arginine in position 61 that is cleaved by pancreatic trypsin and matriptase 2 (Ohler et al., 2010; Jackle et al., 2015). This was, indeed, true for the basal activity; however, we did not observe increased proteolytic activity on cells expressing the G45R variant when incubated with trypsin. In studies investigating a meprin β G32R variant, the additional arginine, indeed, resulted in increased cell surface activity of meprin β (Schäffler et al., 2019). Analyzing the proteolytic processing of protein substrates, G45R showed a tendency of increased activity compared to wild-type meprin β . One explanation why G45R is less prone to an increased activation than G32R could be the position of the mutation within the propeptide. In pro-meprin β , the propeptide interacts *via* two salt bridges on the prime site (D30-R146 and D34-R146) and two on the non-prime site (R54-E137 and D56-R131) with the catalytic domain (Arolas et al., 2012). Therefore, it is possible that G32R has a more destabilizing impact by disrupting the prime site interaction than G45R, which is located in the middle of the two important interaction sites. Consequently, G32R leads to more pronounced meprin β activity at the cell surface, while the effect of G45R is rather moderate.

IL-6 classic- and trans-signaling are important mechanisms in immunomodulation, promoting immune cell differentiation and proliferation (Rose-John, 2012). For trans-signaling cleavage of the IL-6 receptor by ectodomain sheddases, such as ADAM17 or meprin β , it is mandatory to act on cells that do not express the receptor endogenously (Arnold et al., 2017; Sammel et al., 2019). The pro-B-cell line Ba/F3-gp130 is dependent on IL-6 trans-signaling as an inducer of proliferation (Sammel et al., 2019). In this study, we could show that the IL-6R cleavage was increased by the meprin β variant G45R in comparison to the wild-type enzyme, which could influence cancer and immune cell proliferation.

The meprin β substrate CD99 was observed to promote cancer cell extravasation (Bedau et al., 2017a; Bedau et al., 2017b). However, whether the persistent cleavage by the G45R and G89R variants as shown in this study has influence on cell migration in melanoma has to be further demonstrated (Wilkerson et al., 2006).

Natural tissue barriers such as the basal membrane are important factors for tumor progression and tumor metastasis (Tanjore and Kalluri 2006). Meprin β has been shown to hydrolyze collagen IV (Kruse et al., 2004), a major component of the basement membrane. Therefore, we investigated whether one of the protease variants would have an impact on the invasiveness of tumor cells *in vitro*. Testing the invasiveness of Hela cells expressing the different variants of meprin β revealed that meprin β in its active form on the cell surface (variant G45R und WT) is more capable of passing through a layer of collagen

IV. Although the difference was not huge, an alternation of the proteolytic activity of meprin β likely affects the invasiveness of tumor cells. This result was in line with the results of the G32R variant (Schäffler et al., 2019), thus indicating a possible pro-metastatic function of meprin β .

Taken together, here we characterized biochemically and in cell-based assays the two annotated cancer-associated meprin β amino exchange variants G45R and G89R, indicating controversial functions on cancer progression. On the one hand, we identified potentially cancer-promoting functions of G45R, such as increased proteolytic activity at the cell surface. On the other hand, G89R showed overall reduced expression levels and was mainly active on the secretory pathway and only partially reached the plasma membrane. This rather indicates antitumorigenic properties particularly for meprin β substrates, which can be processed solely at the plasma membrane or substrates of the extracellular matrix, as shown by the cell invasion assay. Hence, future studies will show if the characterized meprin β variants are bystanders or driver mutations in melanoma.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**; further inquiries can be directed to the corresponding author.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AG, FS, MS, FreS, PA, and FP designed and performed experiments. AG, FS, and CB-P analyzed the data and wrote the manuscript. OH, SS, FA, JL, and CG provided material and technical support.

FUNDING

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) SFB877 (Proteolysis as a Regulatory Event in Pathophysiology, Projects A9, A13, A14, and A15). The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Jessica Falkowski und Melanie Boß for excellent technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.702341/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Armbrust, F., Bickenbach, K., Koudelka, T., Tholey, A., Pietrzik, C., and Becker-Pauly, C. (2021). Phosphorylation of Meprin β Controls its Cell Surface Abundance and Subsequently Diminishes Ectodomain Shedding. *FASEB J.* 35 (7), e21677. doi:10.1096/fj.202100271R
- Arnold, P., Boll, I., Rothaug, M., Schumacher, N., Schmidt, F., Wichert, R., et al. (2017). Meprin Metalloproteases Generate Biologically Active Soluble Interleukin-6 Receptor to Induce Trans-signaling. *Sci. Rep.* 7, 44053. doi:10.1038/srep44053
- Arnold, P., Schmidt, F., Prox, J., Zunke, F., Pietrzik, C., Lucius, R., et al. (2015). Calcium Negatively Regulates Meprin β Activity and Attenuates Substrate Cleavage. *FASEB J.* 29 (8), 3549–3557. doi:10.1096/fj.15-272310
- Arolas, J. L., Broder, C., Jefferson, T., Guevara, T., Sterchi, E. E., Bode, W., et al. (2012). Structural Basis for the Sheddase Function of Human Meprin Metalloproteinase at the Plasma Membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (40), 16131–16136. doi:10.1073/pnas.1211076109
- Asai, M., Hattori, C., Szabó, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S.-i., et al. (2003). Putative Function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP-secretase. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 301 (1), 231–235. doi:10.1016/s0006-291x(02)02999-6
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and Cancer: Back to Virchow? *The Lancet* 357 (9255), 539–545. doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0
- Becker-Pauly, C., Höwel, M., Walker, T., Vlad, A., Aufenvenne, K., Oji, V., et al. (2007). The α and β Subunits of the Metalloprotease Meprin Are Expressed in Separate Layers of Human Epidermis, Revealing Different Functions in Keratinocyte Proliferation and Differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 127 (5), 1115–1125. doi:10.1038/sj.jid.5700675
- Bedau, T., Peters, F., Prox, J., Arnold, P., Schmidt, F., Finkernagel, M., et al. (2017a). Ectodomain Shedding of CD99 within Highly Conserved Regions Is Mediated by the Metalloprotease Meprin β and Promotes Transendothelial Cell Migration. *FASEB J.* 31 (3), 1226–1237. doi:10.1096/fj.201601113R
- Bedau, T., Schumacher, N., Peters, F., Prox, J., Arnold, P., Koudelka, T., et al. (2017b). Cancer-associated Mutations in the Canonical Cleavage Site Do Not Influence CD99 Shedding by the Metalloprotease Meprin β but Alter Cell Migration *In Vitro*. *Oncotarget* 8 (33), 54873–54888. doi:10.18632/oncotarget.18966
- Biasin, V., Marsh, L. M., Egemnazarov, B., Wilhelm, J., Ghanim, B., Klepetko, W., et al. (2014). Meprin β , a Novel Mediator of Vascular Remodelling Underlying Pulmonary Hypertension. *J. Pathol.* 233 (1), 7–17. doi:10.1002/path.4303
- Broder, C., Arnold, P., Vadon-Le Goff, S., Konerding, M. A., Bahr, K., Muller, S., et al. (2013). Metalloproteases Meprin and Meprin Are C- and N-Procollagen Proteinases Important for Collagen Assembly and Tensile Strength. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (35), 14219–14224. doi:10.1073/pnas.1305464110
- Broder, C., and Becker-Pauly, C. (2013). The Metalloproteases Meprin α and Meprin β : Unique Enzymes in Inflammation, Neurodegeneration, Cancer and Fibrosis. *Biochem. J.* 450 (2), 253–264. doi:10.1042/BJ20121751
- Carr, J. C., Sherman, S. K., Wang, D., Dahdaleh, F. S., Bellizzi, A. M., O'Dorisio, M. S., et al. (2013). Overexpression of Membrane Proteins in Primary and Metastatic Gastrointestinal Neuroendocrine Tumors. *Ann. Surg. Oncol.* 20 (Suppl. 3), 739–746. doi:10.1245/s10434-013-3318-6
- Dingerissen, H. M., Torcivia-Rodriguez, J., Hu, Y., Chang, T.-C., Mazumder, R., and Kahsay, R. (2018). BioMuta and BioXpress: Mutation and Expression Knowledgebases for Cancer Biomarker Discovery. *Nucleic Acids Res.* 46 (D1), D1128–D1136. doi:10.1093/nar/gkx907
- Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P. G., Kallen, K.-J., Wollmer, A., et al. (1997). A Bioactive Designer Cytokine for Human Hematopoietic Progenitor Cell Expansion. *Nat. Biotechnol.* 15 (2), 142–145. doi:10.1038/nbt0297-142
- Fisher, D. T., Appenheimer, M. M., and Evans, S. S. (2014). The Two Faces of IL-6 in the Tumor Microenvironment. *Semin. Immunol.* 26 (1), 38–47. doi:10.1016/j.smim.2014.01.008
- Gearing, D. P., Ziegler, S. F., Comeau, M. R., Friend, D., Thoma, B., Cosman, D., et al. (1994). Proliferative Responses and Binding Properties of Hematopoietic Cells Transfected with Low-Affinity Receptors for Leukemia Inhibitory Factor, Oncostatin M, and Ciliary Neurotrophic Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (3), 1119–1123. doi:10.1073/pnas.91.3.1119
- Huguenin, M., Müller, E. J., Trachsel-Rösmann, S., Oneda, B., Ambort, D., Sterchi, E. E., et al. (2008). The Metalloprotease Meprin β Processes E-Cadherin and Weakens Intercellular Adhesion. *PLoS One* 3 (5), e2153. doi:10.1371/journal.pone.0002153
- Jäckle, F., Schmidt, F., Wichert, R., Arnold, P., Prox, J., Mangold, M., et al. (2015). Metalloprotease Meprin β Is Activated by Transmembrane Serine Protease Matrilysin-2 at the Cell Surface Thereby Enhancing APP Shedding. *Biochem. J.* 470 (1), 91–103. doi:10.1042/BJ20141417
- Jefferson, T., auf dem Keller, U., Bellac, C., Metz, V. V., Broder, C., Hedrich, J., et al. (2013). U. Auf Dem KellerThe Substrate Degradome of Meprin Metalloproteases Reveals an Unexpected Proteolytic Link between Meprin β and ADAM10. *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (2), 309–333. doi:10.1007/s00018-012-1106-2
- Kronenberg, D., Bruns, B. C., Moali, C., Vadon-Le Goff, S., Sterchi, E. E., Traupe, H., et al. (2010). Processing of Procollagen III by Meprins: New Players in Extracellular Matrix Assembly? *J. Invest. Dermatol.* 130 (12), 2727–2735. doi:10.1038/jid.2010.202
- Kruse, M.-N., Becker, C., Lottaz, D., Köhler, D., Yiallourous, I., Krell, H.-W., et al. (2004). Human Meprin Alpha and Beta Homo-Oligomers: Cleavage of Basement Membrane Proteins and Sensitivity to Metalloprotease Inhibitors. *Biochem. J.* 378 (Pt 2), 383–389. doi:10.1042/BJ20031163
- Lou, O., Alcaide, P., Luscinskas, F. W., and Muller, W. A. (2007). CD99 Is a Key Mediator of the Transendothelial Migration of Neutrophils. *J. Immunol.* 178 (2), 1136–1143. doi:10.4049/jimmunol.178.2.1136
- Manara, M., Pasello, M., and Scotlandi, K. (2018). CD99: A Cell Surface Protein with an Oncojanus Role in Tumors. *Genes* 9 (3), 159. doi:10.3390/genes9030159
- Müllberg, J., Schoolink, H., Stoyan, T., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1992). Protein Kinase C Activity Is Rate Limiting for Shedding of the Interleukin-6 Receptor. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 189 (2), 794–800. doi:10.1016/0006-291x(92)92272-y
- Ohler, A., Debel, M., Wagner, S., Magdolen, V., and Becker-Pauly, C. (2010). Analyzing the Protease Web in Skin: Meprin Metalloproteases Are Activated Specifically by KLK4, 5 and 8 Vice Versa Leading to Processing of proKLK7 Thereby Triggering its Activation. *Biol. Chem.* 391 (4), 455–460. doi:10.1515/BC.2010.023
- Pasello, M., Manara, M. C., and Scotlandi, K. (2018). CD99 at the Crossroads of Physiology and Pathology. *J. Cel Commun. Signal.* 12 (1), 55–68. doi:10.1007/s12079-017-0445-z
- Perl, A.-K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., and Christofori, G. (1998). A Causal Role for E-Cadherin in the Transition from Adenoma to Carcinoma. *Nature* 392 (6672), 190–193. doi:10.1038/32433
- Peters, F., and Becker-Pauly, C. (2019). Role of Meprin Metalloproteases in Metastasis and Tumor Microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* 38 (3), 347–356. doi:10.1007/s10555-019-09805-5
- Peters, F., Scharfenberg, F., Colmorgen, C., Armbrust, F., Wichert, R., Arnold, P., et al. (2019). Tethering Soluble Meprin α in an Enzyme Complex to the Cell Surface Affects IBD-associated Genes. *FASEB J.* 33 (6), 7490–7504. doi:10.1096/fj.201802391R
- Riethmueller, S., Ehlers, J. C., Lokau, J., Düsterhöft, S., Knittler, K., Dombrowsky, G., et al. (2016). Cleavage Site Localization Differentially Controls Interleukin-6 Receptor Proteolysis by ADAM10 and ADAM17. *Sci. Rep.* 6, 25550. doi:10.1038/srep25550
- 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. doi:10.7150/ijbs.4989
- Sammel, M., Peters, F., Lokau, J., Scharfenberg, F., Werny, L., Linder, S., et al. (2019). Differences in Shedding of the Interleukin-11 Receptor by the Proteases ADAM9, ADAM10, ADAM17, Meprin α , Meprin β and MT1-MMP. *Ijms* 20 (15), 3677. doi:10.3390/ijms20153677
- Schäffler, H., Li, W., Helm, O., Krüger, S., Böger, C., Peters, F., et al. (2019). The Cancer Associated Meprin β Variant p.G32R Provides an Additional Activation Site and Promotes Cancer Cell Invasion. *J. Cel Sci* 132 (11), jcs220665. doi:10.1242/jcs.220665
- Scharfenberg, F., Armbrust, F., Marengo, L., Pietrzik, C., and Becker-Pauly, C. (2019). Regulation of the Alternative β -secretase Meprin β by ADAM-Mediated

- Shedding. *Cel. Mol. Life Sci.* 76 (16), 3193–3206. doi:10.1007/s00018-019-03179-1
- Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R. M., and Muller, W. A. (2002). CD99 Plays a Major Role in the Migration of Monocytes through Endothelial Junctions. *Nat. Immunol.* 3 (2), 143–150. doi:10.1038/ni749
- Schmidt, S., Schumacher, N., Schwarz, J., Tangermann, S., Kenner, L., Schleder, M., et al. (2018). ADAM17 Is Required for EGF-R-Induced Intestinal Tumors via IL-6 Trans-signaling. *J. Exp. Med.* 215 (4), 1205–1225. doi:10.1084/jem.20171696
- Schönherr, C., Bien, J., Isbert, S., Wichert, R., Prox, J., Altmeyen, H., et al. (2016). Generation of Aggregation Prone N-Terminally Truncated Amyloid β Peptides by Meprin β Depends on the Sequence Specificity at the Cleavage Site. *Mol. Neurodegeneration* 11, 19. doi:10.1186/s13024-016-0084-5
- Schroers, A., Hecht, O., Kallen, K. J., Pacht, M., Rose-John, S., and Grotzinger, J. (2005). Dynamics of the Gp130 Cytokine Complex: a Model for Assembly on the Cellular Membrane. *Protein Sci.* 14 (3), 783–790. doi:10.1110/ps.041117105
- Schumacher, N., and Rose-John, S. (2019). ADAM17 Activity and IL-6 Trans-signaling in Inflammation and Cancer. *Cancers* 11 (11), 1736. doi:10.3390/cancers11111736
- Taga, T., and Kishimoto, T. (1997). Gp130 and the Interleukin-6 Family of Cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 797–819. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.797
- Tanjore, H., and Kalluri, R. (2006). The Role of Type IV Collagen and Basement Membranes in Cancer Progression and Metastasis. *Am. J. Pathol.* 168 (3), 715–717. doi:10.2353/ajpath.2006.051321
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., et al. (2018). SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes. *Nucleic Acids Res.* 46 (W1), W296–W303. doi:10.1093/nar/gky427
- Wichert, R., Ermund, A., Schmidt, S., Schweinlin, M., Ksiazek, M., Arnold, P., et al. (2017). Mucus Detachment by Host Metalloprotease Meprin β Requires Shedding of its Inactive Pro-form, Which Is Abrogated by the Pathogenic Protease RgpB. *Cel. Rep.* 21 (8), 2090–2103. doi:10.1016/j.celrep.2017.10.087
- Wilkerson, A. E., Glasgow, M. A., and Hiatt, K. M. (2006). Immunoreactivity of CD99 in Invasive Malignant Melanoma. *J. Cutan. Pathol.* 33 (10), 663–666. doi:10.1111/j.1600-0560.2006.00524.x
- Winer, A., Adams, S., and Mignatti, P. (2018). Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures into Future Successes. *Mol. Cancer Ther.* 17 (6), 1147–1155. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0646

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Gellrich, Scharfenberg, Peters, Sammel, Helm, Armbrust, Schmidt, Lokau, Garbers, Sebens, Arnold and Becker-Paul. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Publikationen

Original Arbeiten

- Werny L, Grogro A, Bickenbach K, Bülck C, Armbrust F, Koudelka T, Pathak K, Scharfenberg F, **Sammel M**, ..., Becker-Pauly C. MT1-MMP and ADAM10/17 exhibit a remarkable overlap of shedding properties. **FEBS J**. 2022 Jul 30
- Gellrich A, Scharfenberg F, Peters F, **Sammel M**, ..., Becker-Pauly C. Characterization of the Cancer-Associated Meprin Beta Variants G45R and G89R. **Front Mol Biosci**. 2021 Oct 6
- Scharfenberg F, Helbig A, **Sammel M**, ..., Becker-Pauly C. (2020) Degradome of soluble ADAM10 and ADAM17 metalloproteases. **Cell Mol Life Sci**. 2020 Jan
- **Sammel M**, Peters F, Lokau J, Scharfenberg F, Werny L, Linder S, Garbers C, Rose-John S, Becker-Pauly C. (2019) Differences in Shedding of the Interleukin-11 Receptor by the Proteases ADAM9, ADAM10, ADAM17, Meprin α , Meprin β and MT1-MMP. **Int J Mol Sci**. 2019 Jul 26

Vorträge und Posterpräsentationen

Vorträge

- 37th Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, Tiers Italien
“Ectodomain shedding of the interleukin-6/11 receptors”
März 2020
- 36th Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, Tiers Italien
“Ectodomain shedding of the interleukin-11 receptor by metalloproteases”,
März 2019
- 35th Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, Tiers Italien
“Ectodomain shedding of interleukin receptors”
März 2018

Posterpräsentationen

Sammel M, Peters F, Lokau J, Scharfenberg F, Werny L, Linder S, Garbers C, Rose-John S, Becker-Pauly C. Differences in Shedding of the Interleukin-11 Receptor by the Proteases ADAM9, ADAM10, ADAM17, Meprin α , Meprin β and MT1-MMP
SFB 877 Summerschool: Degradomics, Protease Web in Health & Disease, Kiel, September 2019