

**Erkennungssequenzen und strukturelle Elemente
als Determinanten der
regulierten Spaltung von Membranproteinen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Katja Althoff
geb. in Nürnberg
Mainz, 2000

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Limitierte Proteolyse von Membranproteinen.....	1
1.1.1	Physiologische Bedeutung.....	1
1.1.2	Die proTNF α Konvertase (TACE).....	4
1.1.2.1	Proteolytische Freisetzung von TNF α	4
1.1.2.2	TACE als Mitglied der Familie der Metalloproteasen-Disintegrine	5
1.1.3	Weitere Vertreter der ADAM-Familie mit aktiver Metalloprotease-Domäne ..	7
1.1.4	Charakterisierung der ADAMs	8
1.1.5	Regulation des Sheddings	11
1.1.5.1	Induktion und Inhibition	11
1.1.5.2	Postulierter Spaltmechanismus.....	13
1.1.5.3	Bedeutung von Spaltstellensequenzen.....	14
1.2	Signalweiterleitung über den IL-6/IL-6R Komplex.....	16
1.2.1	Physiologische Funktionen von Interleukin-6 (IL-6)	16
1.2.2	Der IL-6 Rezeptor (IL-6R)	17
1.2.3	Entstehung des IL-6/IL-6R Komplexes	18
1.2.4	Signalweiterleitung über gp130.....	20
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Chemikalien	23
2.2	Enzyme	23
2.3	Antiseren und Antikörper	23
2.4	cDNAs und rekombinante Proteine.....	23
2.5	Zellkultur und transiente Transfektion	24
2.6	Molekularbiologische Techniken.....	24
2.7	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Fluorographie und Western Blot	25
2.8	ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	25
2.9	Immunpräzipitation.....	25
2.10	Entfernung N-glykosidisch gebundener Oligosaccharid-Seitenketten.....	26

2.11	Analyse der Tyrosinphosphorylierung	26
2.12	Konstruktion der Expressionsvektoren.....	26
2.12.1	Konstruktion der proTNF α /IL-6R Expressionsvektoren	26
2.12.2	Konstruktion der IL-6R/proTNF α Expressionsvektoren	27
2.12.3	Konstruktion der gp130 Spaltstellenchimären in Expressionsvektoren.....	28
3	Ergebnisse.....	23
3.1	Beteiligung von TACE am Shedding von IL-6R	30
3.2	Austausch von Spaltstellen zwischen spaltbaren Proteinen	33
3.2.1	ProTNF α -Chimären mit IL-6R Spaltstelle	33
3.2.1.1	Unspaltbarkeit der ProTNF α Chimären.....	34
3.2.1.2	Zelloberflächenexpression der proTNF α Chimären	36
3.2.2	IL-6R Chimären mit proTNF α Spaltstelle	37
3.2.2.1	Shedding der IL-6R Chimären	38
3.2.2.2	Deglykosylierung der Chimären und des IL-6R.....	39
3.2.2.3	Spontane Spaltung der IL-6R Chimären in TACE ^{-/-} Fibroblasten.....	41
3.3	Membrannahe Sequenzen als Determinanten für proteolytische Spaltung .	42
3.3.1	Chimären aus gp130 mit Spaltstellen verschiedener Proteine.....	42
3.3.1.1	PMA-induzierte Spaltung der generierten Chimären.....	44
3.3.1.2	Zelloberflächenexpression der chimären Proteine	45
3.3.1.3	Signaltransduktion der chimären Proteine	47
3.3.2	Keine Übertragung von Spaltbarkeit durch Punktmutation	48
3.3.2.1	Keine Spaltbarkeit durch Punktmutation	49
3.3.2.2	Signaltransduktion der Mutante	50
3.3.3	Spaltbarkeit durch eingeengte Spaltstellenpeptide	51
3.3.3.1	PMA-induzierte Spaltung der Chimären.....	53
3.3.3.2	Signaltransduktion der Chimären.....	54
3.3.4	Spaltbarkeit von gp130 durch LIFR Peptide	55
3.3.4.1	Spaltung von LIFR Peptid-Chimären	56
3.3.4.2	Signaltransduktion der Chimären.....	57
4	Diskussion.....	30
4.1	Beteiligung von TACE am PMA-induzierten Shedding des IL-6Rs	59
4.2	Vermittlung von Spaltbarkeit nicht nur durch Spaltstellenpeptide	60

4.3	Übertragung von Spaltbarkeit durch membrannahe Sequenzen spaltbarer Proteine	63
4.4	Biologische Relevanz löslicher Membranproteine.....	69
4.5	Ausblick	73
5	Zusammenfassung	59
6	Literaturverzeichnis.....	75
7	Anhang	94
7.1	Abkürzungen.....	94
7.2	Abkürzungen der Aminosäuren.....	95
	Danksagung	96
	Lebenslauf.....	97

1 Einleitung

1.1 Limitierte Proteolyse von Membranproteinen

1.1.1 Physiologische Bedeutung

Biologische Membranen bestehen aus einer Doppelschicht aus Phospholipiden, in die eine Vielzahl von Proteinen eingelagert ist. Diese Proteine ermöglichen es den Zellen, ihre verschiedenen Aufgaben zu erfüllen. Membranproteine können in zwei grobe Kategorien eingeordnet werden, in integrale (intrinsische) und periphere (extrinsische) Membranproteine. Integrale Membranproteine sind so tief in die Membran eingebettet, dass ihre hydrophoben Regionen von den Fettsäureketten der Lipide umgeben sind. Manche integralen Membranproteine ragen nur ein Stück weit in die Membran, andere, die Transmembranproteine, durchspannen sie ganz. Periphere Membranproteine sind nicht in die Membran eingelagert, sondern lediglich mit ihrer Oberfläche assoziiert, und zwar häufig mit den integralen Proteinen.

Mechanismen, welche die Expression von Membranproteinen regulieren, sind kritisch für die Biologie der Zelle; Veränderungen dieser Mechanismen können zu zellulären Dysfunktionen führen (97). Wie das auch für andere Proteine der Fall ist, wird die Expression von Membranproteinen an vielen Punkten während des biosynthetischen Weges von der DNA zum posttranslatorisch modifizierten Protein kontrolliert. Zusätzliche regulatorische Mechanismen können beteiligt sein, wenn es zu einer Herunterregulation von Membranproteinen kommt (63). Membrangebundene Rezeptoren können z. B. durch Endozytose internalisiert werden, um daraufhin entweder in intrazellulären Vesikeln gelagert oder abgebaut zu werden (63). Neben der Herunterregulation von Membranproteinen existieren noch weitere Mechanismen, die Rezeptorfunktionen regulieren. Es besteht die Möglichkeit, dass Membranproteine in eine lösliche Form überführt werden. Bisher sind zwei verschiedene Wege bekannt, die zu der Bildung dieser löslichen Proteine führen.

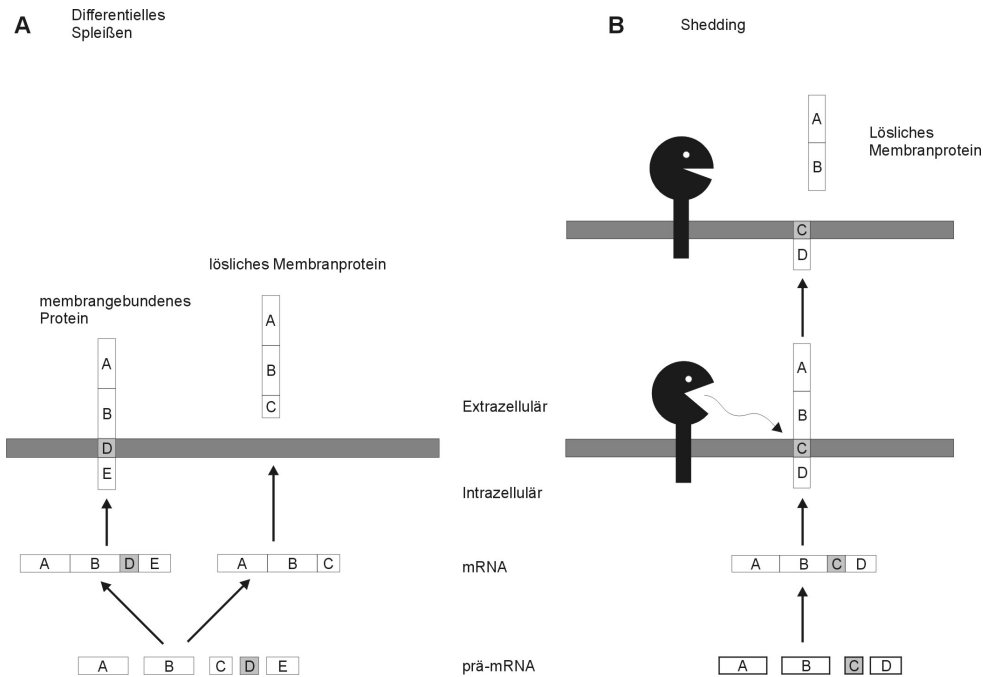


Abb. 1.1 Mechanismen der Generierung löslicher Rezeptoren. (A) Membrangebundene und lösliche Formen von Rezeptoren werden durch Translation alternativ gespleißter prä-mRNA generiert. Exons sind als Rechtecke dargestellt, die mit A, B, C, D und E gekennzeichnet sind. (B) Die lösliche Form des Rezeptors wird durch limitierte Proteolyse eines einzigen Transmembranproteins generiert. (aus Rose-John et al. (1994) (151)).

Zum einen können lösliche Formen von Membranproteinen durch differentielles Spleißen der Prä-mRNA translatiert werden (Abb. 1.1A). Alternativ kann die extrazelluläre Domäne einer Vielzahl von verschiedenen Membranproteinen durch proteolytische Spaltung in den extrazellulären Raum freigesetzt werden (73, 111, 151) (Abb. 1.1B). An diesem Prozess, der zumeist als Ektodomänen-Shedding oder kurz Shedding bezeichnet wird, sind Proteasen beteiligt, die als Konvertasen oder Sekretasen bezeichnet werden. Er betrifft viele Transmembranproteine, die nicht miteinander verwandt sind. Zu diesen gehören unter anderem Zytokinrezeptoren (5, 37, 124), membranverankerte Wachstumsfaktoren (171, 180), Zelladhäsionsproteine (19, 50) und Ektoenzyme (46). Einen Überblick verschafft Tabelle 1.

Tab. 1.1 Integrale Membranproteine, deren lösliche Isoformen durch limitierte Proteolyse generiert werden. Abkürzungen: APP, „amyloid precursor protein“; ANF, „atrial natriuretic factor“; CSF, „colony-stimulating factor“; GH, „growth hormone“; ICAM, „intracellular cell-adhesion molecule“; IL, Interleukin; MHC, „major histocompatibility complex“; NGF, „nerve growth factor“; PDGF, „platelet-derived growth factor“; VCAM, „vascular cell-adhesion molecule“; VSV, „vesicular-stomatitis virus“ (Verändert aus Hooper et al. (1997) (73))

Typ	Protein	Topologie	Referenz
Zelladhäsionsmoleküle	CD14	Typ I	(18)
	CD8	Typ I	(54)
	L-Selektin	Typ I	(85)
	VCAM-1	Typ I	(94)
	ICAM-3	Typ I	(40)
	NG2 Proteoglykan	Typ I	(128)
Leukozyten-Antigene	Klasse I MHC	Typ I	(148)
	IL-2R	Typ I	(147)
	Fc γ RIII-1	GPI	(145)
	IgE Rezeptor	Typ II	(95)
	Fc γ RII	Typ I	(157)
	CD43	Typ I	(16)
	CD44	Typ I	(15)
Rezeptorliganden	TGF α	Typ I	(133)
	TNF α	Typ II	(112)
	Kit Ligand	Typ I	(76)
	CSF-1	Typ I	(41)
	CD40	Typ I	(64)
	Fas	Typ II	(172)
Rezeptoren	TNFR-I	Typ I	(26)
	TNFR-II	Typ I	(142)
	NGF Rezeptor	Typ I	(43)
	CSF-1 Rezeptor	Typ I	(44)
	Transferrin Rez.	Typ II	(33)
	Poly-Ig Rezeptor	Typ I	(118)
	ANF Rezeptor	Typ I	(1)
	IL-1R	Typ I	(36)
	IL-6R	Typ I	(124)
	TGF β Rezeptor	Typ I	(102)
	PDGF Rezeptor	Typ I	(175)
	Syndecan	Typ I	(20)
	CD27	Typ I	(100)
Ectoenzyme	ACE	Typ I	(46)
	Sialyltransferase	Typ II	(92)
virale Membranproteine	Leukemogenes Glykoprotein	Typ I	(58)
	VSV Glykoprotein	Typ I	(32)
Verschiedene	β APP	Typ I	(49)
	Glykoprotein Ib	Typ I	(101)

Ein angemessenes Gleichgewicht zwischen membrangebundenen und löslichen Formen dieser Proteine scheint für deren normale physiologische Rolle wichtig zu sein. Beispielsweise führt eine Störung der korrekten Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) dazu, dass sich das β -Amyloid Peptid ($A\beta$) bildet. Es existieren drei Schnittstellen, die jeweils von der α -, β - und λ -Sekretase erkannt werden. Normalerweise wird APP zunächst von der α -Sekretase und im folgenden von der λ -Sekretase gespalten, wodurch ein großes lösliches Fragment ($sAPP\alpha$) und das nicht-pathogene p3-Peptid freigesetzt werden. Kommt es statt des Schnitts der α -Sekretase in vermehrtem Umfang zu einer Spaltung durch die β -Sekretase, führt die darauf folgende Spaltung der λ -Sekretase zu der Bildung des pathogenen $A\beta$ (161). Dieses Peptid ist die Hauptkomponente der amyloiden Plaques in Gehirnen von Patienten, die unter der Alzheimerschen Krankheit leiden (93). Die weite Verbreitung des Sheddings, zumindest zwei bis fünf Prozent aller Membranproteine werden durch limitierte Proteolyse freigesetzt (7), spricht stark dafür, dass die Freisetzung von Membranproteinen durch proteolytische Spaltung von beträchtlicher physiologischer Bedeutung ist. Im Falle von Rezeptoren und Zelladhäsionsmolekülen, zum Beispiel, führt die Freisetzung durch eine veränderte Besetzung der Zelloberfläche und durch die Generierung löslicher Antagonisten oftmals zu einer Aufhebung von Signalweiterleitung bzw. Adhäsionsvorgängen (45). Im Gegensatz dazu agieren viele lösliche Rezeptoren der IL-6-artigen Zytokine als Agonisten (152). Viel verschiedenen Zellen benötigen lösliche Zytokinrezeptoren, um auf IL-6-artige Zytokine reagieren zu können. Hierzu gehören hämatopoetische Vorläuferzellen (139, 168), Endothelzellen (150), Zellen der glatten Muskulatur (89) und neurale Zellen (109).

1.1.2 Die proTNF α Konvertase (TACE)

1.1.2.1 Proteolytische Freisetzung von TNF α

Bemühungen, Proteasen zu finden, die an der Spaltung von Membranproteinen beteiligt sind, haben kürzlich zu der Identifizierung und Klonierung eines Enzyms geführt, das verantwortlich für die Spaltung des Vorläufers von Tumor Nekrose Faktor Alpha (proTNF α) ist. TNF α ist ein hauptsächlich von aktivierten Monozyten/Macrophagen freigesetztes Zytokin (129), das eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Antworten auslösen kann. Hierunter fallen zum einen lokale Effekte wie Wachstumsinduktion, Differenzierung und Antitumoraktivität, zum anderen

systemische, wie Sepsis und Multiple Sklerose (81). Das Protein liegt als trimerer membrangebundener Vorläufer (173) mit einem Molekulargewicht von 26 kDa vor, das durch die Metalloprotease TACE ($\text{TNF}\alpha$ Converting Enzyme) zwischen Ala₇₆ und Val₇₇ gespalten werden kann, um das reife 17 kDa große $\text{TNF}\alpha$ freizusetzen (2).

1.1.2.2 TACE als Mitglied der Familie der Metalloproteasen-Disintegrine

TACE, das parallel von zwei Gruppen kloniert worden war (21, 117), gehört zu einer Familie von Membranproteinen, die eine hohe Homologie zu löslichen zinkabhängigen Metalloproteasen aufweisen, die in Schlangengiften vorhanden sind (165, 183). Die Bezeichnung der Schlangengifttoxine als Adamalysine geschah in Anlehnung an Adamalysin II, einem Enzym aus der Klapperschlange *Crotalus adamanteus* (61). Die homologen Säugetierenzyme wurden daraufhin in die Familie der ADAMs gruppiert (A Disintegrin and Metalloprotease). TACE wird nun auch ADAM 17 genannt. (23, 183). Adamalysine und Säuger-ADAMs sind sich sehr ähnlich und haben praktisch denselben Aufbau. Abb. 1.2 veranschaulicht den die typische Domänenstruktur dieser Proteine am Beispiel von TACE.

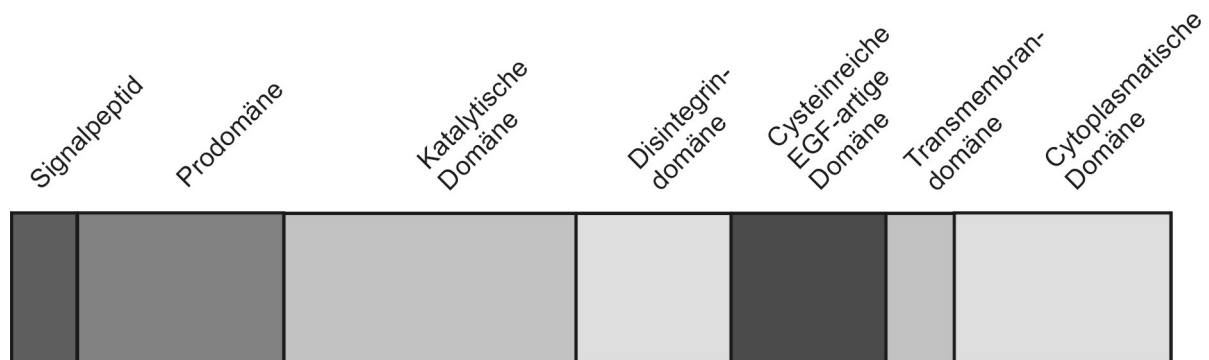


Abb. 1.2 Domänenstruktur von TACE. Der Balken repräsentiert das Protein TACE. Die einzelnen Domänen werden durch die verschieden gefärbten Rechtecke dargestellt.

Auf ein 17 Aminosäuren langes Signalpeptid folgt eine Prodomäne aus etwa 200 Aminosäuren, die vor der Aktivierung der Protease proteolytisch entfernt werden muss (117). Die katalytische Domäne von TACE enthält eine in Zink-abhängigen Metalloproteasen hoch konservierte Sequenz, das sogenannte „HEXXHXXGXXH(D)-

Motiv“ (165). Die darin enthaltenen drei Histidinreste sind an der Bindung des katalytisch essentiellen Zink-Ions beteiligt. Die Disintegrindomäne verdankt ihren Namen kurzen löslichen Disintegrinen, die zunächst in Schlangengiften identifiziert worden waren (77, 113). Diese Disintegrine binden fest an das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ der Blutplättchen und fungieren als kompetitive Inhibitoren der Blutplättchenaggregation, da sie die Bindung der Blutplättchen an das Plasmaprotein Fibrin während der Blutgerinnung verhindern (113). Der Name Disintegrin bezieht sich auf die Unterbrechung der Integrinbindung (62). Die Funktion der Disintegrin- und der cysteinreichen „Epidermal Growth factor“- (EGF) ähnlichen Domänen sind bislang nicht bekannt. Im Gegensatz zu den Metalloproteasen aus dem Schlangengift besitzt TACE eine Transmembranregion und einen cytoplasmatischen Schwanz von etwa 100 Aminosäuren. Maskos et al. (110) konnten die Kristallstruktur der katalytischen Domäne von TACE kürzlich lösen. (Abb. 1.3A) Es zeigte sich, dass TACE eine typische zinkabhängige Metalloprotease ist (165). Die größte Ähnlichkeit hat sie zu katalytischen Domänen der Metalloproteasen aus dem Schlangengift wie beispielsweise Adamalysin II. Dies wird daran deutlich, dass sich etwa 175 der 359 Aminosäurereste von TACE mit der äquivalenten Region von Adamalysin überlagern lassen (Abb. 1.3B). Die katalytische Domäne von TACE ist länger als die der anderen Adamalysine/ADAMs. Die durch die zusätzlichen Aminosäuren gebildeten zwei Schleifen besitzt außer TACE nur ADAM 10, das am nächsten verwandte Mitglied der ADAM Familie (119). Durch die Untersuchung von TACE-defizienten Mäusen, die TACE mit deletierter katalytischer Domäne besaßen, konnten Peschon et al. (137) zeigen, dass diese Metalloprotease neben der Spaltung von $\text{proTNF}\alpha$ auch wichtig für das Shedding von Molekülen wie dem Adhäsionsprotein L-Selektin und dem Wachstumsfaktor pro-„Tumour Growth Factor Alpha“ ($\text{TGF}\alpha$) ist. Diese Tiere waren nicht nur nicht in der Lage, $\text{proTNF}\alpha$ zu prozessieren, sie zeigten auch erhebliche Mängel in der Spaltung dieser Proteine.

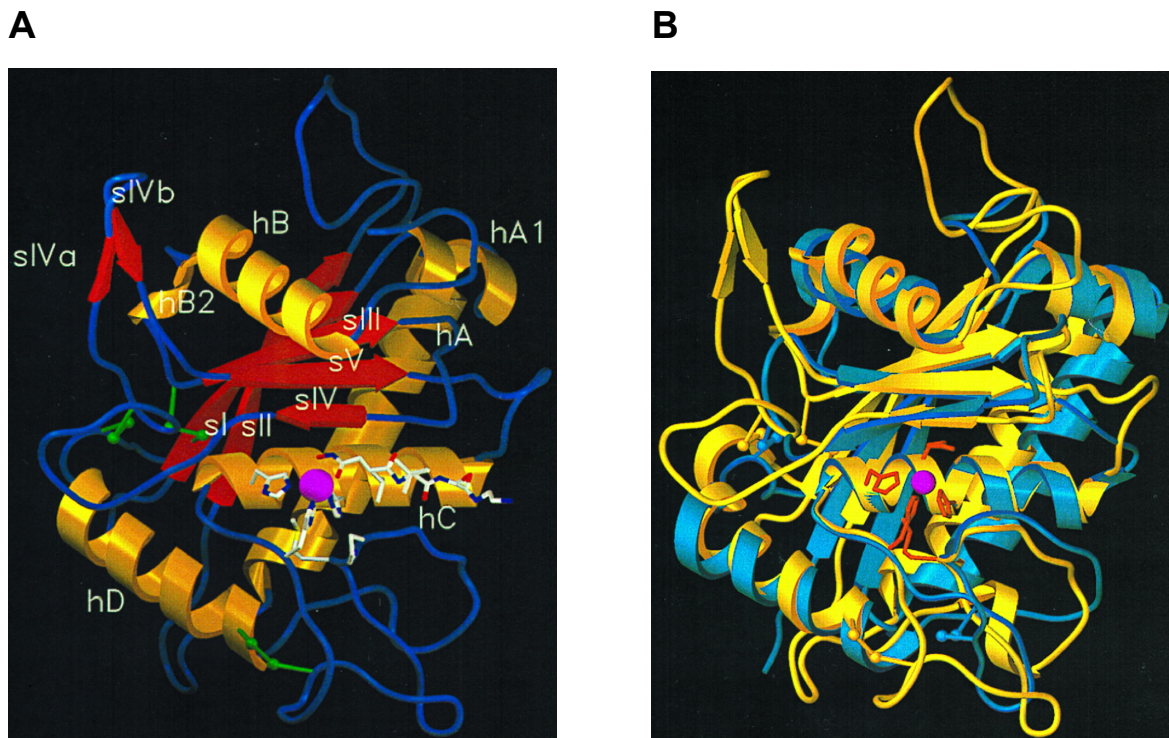


Abb. 1.3 Bändermodell katalytischen Domäne von TACE (A) und in Superposition mit Adamalysin (B). (A) Die Kette beginnt bzw. endet an der linken unteren bzw. oberen Rückseite. Die drei Disulfidbrücken sind als grüne Verbindungen und das katalytische Zink als pinke Kugel dargestellt. His₄₀₅, His₄₀₉, His₄₁₅, Met₄₃₅, Pro₄₃₇ und der mit der Domäne kristallisierte Inhibitor (weiß) sind in voller Struktur dargestellt. Die Abbildung wurde mit SETOR (48) hergestellt. (B) Überlagerung des Bändermodells der katalytischen Domänen von TACE (Gold) und Adamalysin (Blau) (59, 60). Ebenso gezeigt sind das katalytische Zink von TACE (Pink) und drei (TACE) bzw. zwei (Adamalysin) Disulfidbrücken. Die Orientierung ist dieselbe wie in (A). Die Abbildung wurde mit GRASP generiert (135). (aus Maskos et al. (1998) (110))

1.1.3 Weitere Vertreter der ADAM-Familie mit aktiver Metalloprotease-Domäne

Ein weiteres Mitglied aus der Familie der ADAMs mit proteolytischer Fähigkeit ist ADAM10 (MADM/Reprolysin/KUZ) (75). Die erste proteolytische Aktivität, die für dieses Proteine entdeckt wurde, war die Spaltung des Myelin basischen Proteins (31), das vermutlich nicht das physiologische Substrat dieses Enzyms darstellt. Rosendahl et al. (153) konnten nachweisen, das ADAM 10 in der Lage ist, ein die Zellmembran durchspannendes Peptid, das die Spaltsequenz von proTNF α enthält, zu spalten. Ob diese Protease allerdings tatsächlich an der Prozessierung von proTNF α beteiligt ist, bleibt ungewiss. Allerdings sprechen Untersuchungen an TACE defizienten (TACE^{-/-})

Mäusen gegen eine solche Beteiligung, da in ihnen die Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ um 80-90 % reduziert ist (137). Außerdem konnten subletal bestrahlte Mäuse, die mit einem $\text{TACE}^{-/-}$ hämatopoetischen System rekonstituiert worden waren, kein $\text{TNF}\alpha$ mehr freizusetzen (22). Lammich et al. (93) konnten kürzlich zeigen, dass ADAM 10 ein möglicher Kandidat für die α -Sekretase, die APP prozessiert, ist. Durch Überexpression von ADAM 10 in humanen embryonalen Nierenzellen konnte die α -Sekretase Aktivität um ein vielfaches gesteigert werden. Die Transfektion mit einem dominant negativen ADAM 10 führte zu einer Inhibition endogener α -Sekretase Aktivität.

Innerhalb der stets wachsenden Familie der ADAMs existieren zumindest zwei weitere aktive Metalloproteasen. Izumi et al. (80) konnten zeigen, dass ADAM 9 (Meltrin γ /MDC 9) an dem Protein Kinase $\text{C}\delta$ ($\text{PKC}\delta$) abhängigen Shedding von Heparin bindendem EGF-ähnlichen Wachstumsfaktor (HB-EGF) beteiligt ist. HB-EGF bindet an und stimuliert die Phosphorylierung des EGF Rezeptors. Das Substrat von ADAM 12 (Meltrin α) konnte noch nicht identifiziert werden. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass ADAM 12 eine aktive Metalloprotease ist (98), vermutlich eine Rolle bei der Tumorzelladhäsion (78) und der Myogenese (57) spielt.

1.1.4 Charakterisierung der ADAMs

Mitglieder der ADAM Proteinfamilie sind dadurch charakterisiert, dass sie sowohl eine Metalloprotease- als auch eine Disintegrimdomäne enthalten (184). Obwohl bereits zumindest 30 Vertreter dieser Familie kloniert worden sind, wird die Gewebeverteilung und Funktion einiger dieser Proteine erst langsam entschlüsselt (Tab. 1.2) (21). Verschiedene ADAMs wie Fertilin α/β und Cyritestin sind an der Befruchtung und/oder der Spermatogenese beteiligt (34, 190). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ADAMs an der Myoblastenfusion und der neuronalen Entwicklung beteiligt sind (23, 185).

Tab. 1.2 Familie der ADAM Metalloproteasen. Die Tabelle stammt von der Internetseite: <http://www.med.virginia.edu/~jag6n/adams.html/>. ^aUnter Berücksichtigung des phylogenetischen Stammbaums der ADAM-Familie kann angenommen werden, dass verschiedene Mitglieder ohne eine enzymatisch aktive Metalloproteasedomäne von Vorfahren abstammen, die ein aktives zinkbindendes Motiv besaßen. Daher haben diese Familienmitglieder das funktionale zinkbindende Motiv und damit die Metalloproteaseaktivität vermutlich sekundär verloren (30).

cDNA	Metalloprotease-aktivität	Andere Bezeichnungen	Physiologische Funktion
ADAM 1	deduziert	PH-30 alpha; Fertilin alpha	Akrosomenreaktion
ADAM 2		PH-30 beta; Fertilin beta	Akrosomenreaktion
ADAM 3		Cyritestin; tMDC I	
ADAM 4	sekundär verloren ^a	tMDCV	
ADAM 5		tMDC II	
ADAM 6	sekundär verloren ^a	tMDC IV	
ADAM 7	sekundär verloren ^a	EAP I	
ADAM 8	deduziert	MS2	
ADAM 9	demonstriert	MDC9, meltrin gamma	Shedding; EGF-artiger Wachstumsfaktor
ADAM 10	demonstriert	MADM; kuzbanian	Shedding, neuronale Entwicklung in <i>D. melanogaster</i>
ADAM 11	sekundär verloren ^a	MDC	
ADAM 12	demonstriert	Meltrin alpha	Myoblastenfusion
ADAM 13	deduziert		
ADAM 14		adm-1	
ADAM 15	deduziert	Metargidin; MDC 15	
ADAM 16	deduziert	MDC 16	
ADAM 17	demonstriert	TACE	Shedding von proTNF α und anderer Membranproteine
ADAM 18		tMDCIII	
ADAM 19	deduziert	Meltrin beta	
ADAM 20	deduziert		
ADAM 21	deduziert		
ADAM 22	sekundär verloren ^a	MDC 2	
ADAM 23	sekundär verloren ^a	MDC 3	
ADAM 24	deduziert	Testase-1	
ADAM 25	deduziert	Testase-2	
ADAM 26	deduziert	Testase-3	
ADAM 27		identisch zu	ADAM 18
ADAM 28	deduziert	eMDCII, MDC-Lm, MDC-Ls	
ADAM 29	sekundär verloren ^a		
ADAM 30	deduziert		

Während der Biosynthese werden katalytisch aktive ADAMs als größere, inaktive Vorläufer generiert, bei denen die Prodomäne mit der katalytischen Domäne assoziiert ist (99, 149) (Abb. 1.4). Es wird angenommen, dass hieran ein sogenannter „Cysteine-switch“ Mechanismus beteiligt ist, bei dem eine Sulfhydrylgruppe einer ungeraden Anzahl an Cysteinen in der Prodomäne mit dem Zn^{2+} Ion in der katalytischen Tasche interagiert, wodurch das Enzym inhibiert wird (176). Sobald eine furinartige Proprotein-Konvertase die Prodomäne entfernt hat, wird das Enzym aktiv (98) und kann im folgenden sein Substrat prozessieren. Außer als Inhibitor der Proteasedomäne scheint die Prodomäne wichtig für die richtige Reifung und den intrazellulären Transport zumindest einiger ADAMs zu sein (99, 149).

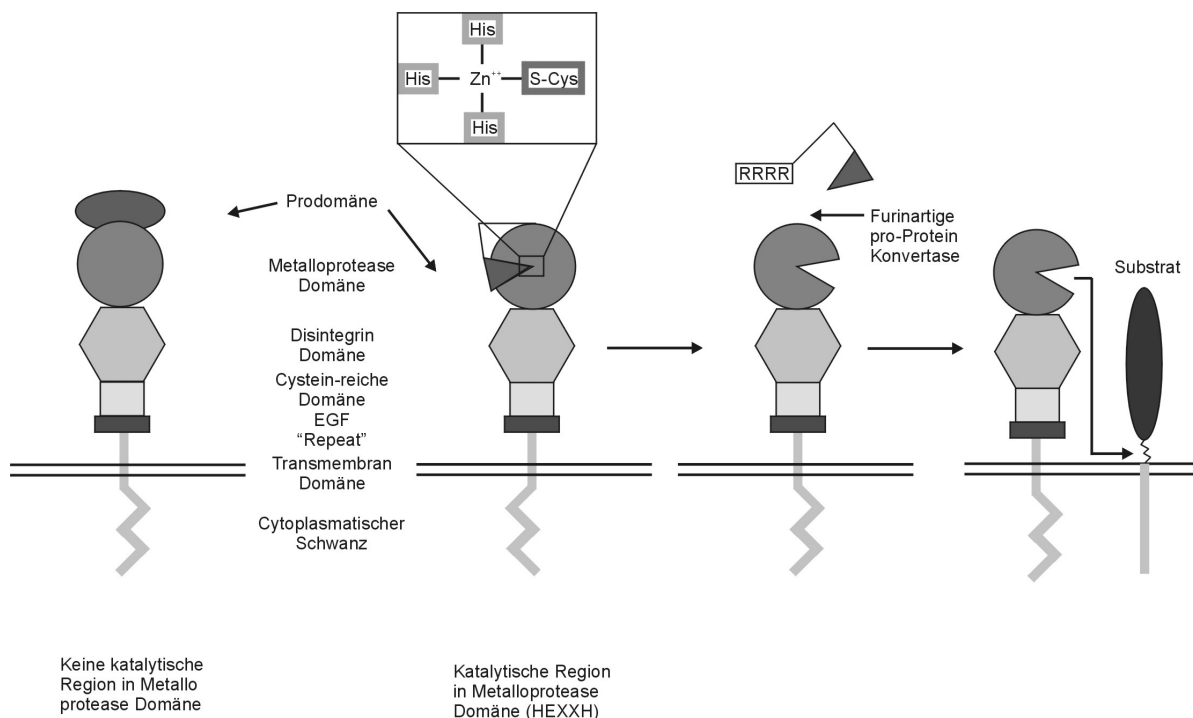


Abb. 1.4 Domänenstruktur und angenommener Aktivierungsmechanismus der ADAMs. Links ist ein ADAM ohne katalytische Konsensussequenz dargestellt. Bei katalytisch aktiven ADAMs fungiert die Prodomäne als Inhibitor. Das Zn^{2+} ist durch drei Histidine in der katalytischen Tasche koordiniert. Die freie Sulfhydrylgruppe des Cysteins der Prodomäne liefert die vierte Koordinierungsstelle. Dadurch bleibt das Enzym inaktiv, bis die Prodomäne durch eine furinartige Protease abgespalten wird (adaptiert von Schlondorff et al. (1999) (159)).

Viele Mitglieder der ADAM Familie besitzen eine Metalloprotease-Domäne, in der die Konsensussequenz HEXXH fehlt, so dass sie keine katalytische Aktivität besitzen. Im

Falle von Fertilin wird die nicht-katalytische Metalloprotease-Domäne während der Spermienreifung entfernt. Bis jetzt ist unklar, ob die Metalloprotease-Domäne an der Bindung von Integrin beteiligt ist oder ob die Disintegrin-Domäne eine Rolle beim Shedding spielt (119). Allerdings weisen einige kürzlich gewonnene Erkenntnisse darauf hin, dass beide Domänen wichtig für die Funktion der Proteine sind. Das ADAM Protein KUZ (das *Drosophila melanogaster* Homolog zu ADAM 10), von dem gezeigt worden war, dass es eine Rolle bei der Regulierung des neuronalen Zellschicksals in *Drosophila melanogaster* spielt (189), konnte durch eine verkürzte Form von KUZ inhibiert werden, bei der die Metalloprotease-Domäne fehlte. Diese verkürzte Form von KUZ fungierte als dominant negativer Inhibitor, was darauf hindeutet, dass KUZ sein Substrat über die Disintegrin-Domäne bindet (132). Die Substrate von KUZ scheinen Komponenten des Notch Signalweges zu sein (132, 144), der für die korrekte Entwicklung neuronaler Zellen in *D. melanogaster* wichtig ist. Zolkiewska et al. (192) konnten für die Disintegrindomäne von ADAM 12 nachweisen, dass es sich hierbei um eine aktive Zelladhäsionsdomäne handelt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass in diesen Proteinen ein Zusammenspiel zwischen der Metalloprotease-Domäne und der Disintegrin-Domäne existiert.

1.1.5 Regulation des Sheddings

1.1.5.1 Induktion und Inhibition

Trotz der biomedizinischen Relevanz verschiedener Substrate des Shedding Systems ist über seine Regulation erst wenig bekannt. Es existiert weder eine Sequenzhomologie an der Spaltstelle noch wurden strukturell ähnliche Merkmale entdeckt. Trotzdem konnte durch mehrere Studien angenommen werden, dass es eine allgemeine Spaltmaschinerie gibt, um zellgebundene Proteine freizusetzen (115, 123): Die meisten Sheddingprozesse können durch PMA, einem starken Aktivator der Protein Kinase C, beschleunigt werden (111, 125, 151) (Abb. 1.5). Sie werden durch auf Hydroxamaten basierende Metalloproteaseinhibitoren blockiert, die ursprünglich entwickelt worden waren, um die Proteolyse von proTNF α zu inhibieren (z. B. TAPI) (56, 112).

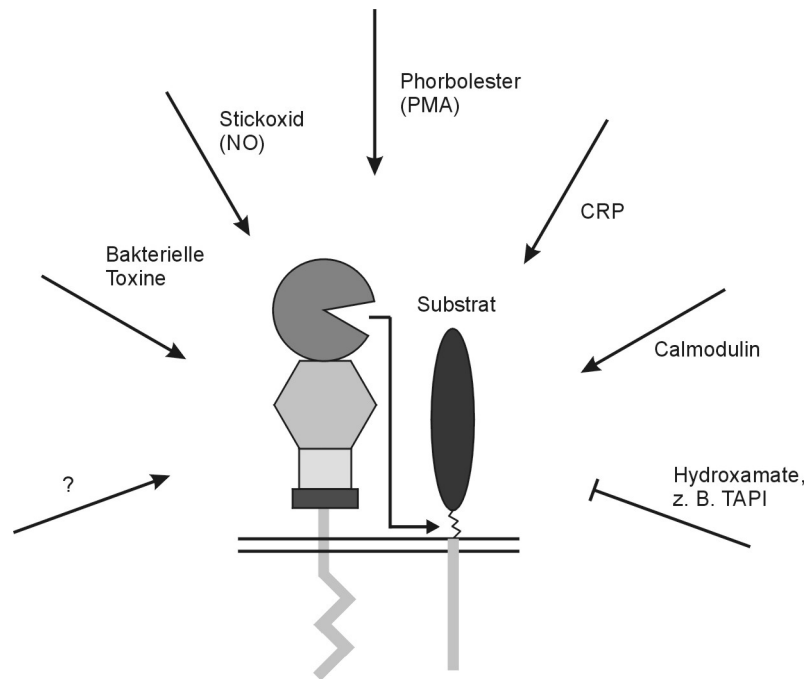


Abb. 1.5 Stimulation und Inhibition von Sekretasen. Die stimulatorisch auf den Sheddingprozess wirkenden Faktoren sind durch einen Pfeil dargestellt. Das Fragezeichen soll veranschaulichen, dass noch nicht alle Faktoren bekannt sind. Inhibitorisch wirken Hydroxamate.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass weitere Stimulationsmechanismen existieren: Bakterielle Toxine können die Spaltung verschiedener Membranproteine auslösen (179). Allerdings werden hierbei alternative Spaltstellen verwandt, was darauf hindeutet, dass Proteine durch Shedding an verschiedenen Spaltstellen in ihre lösliche Form überführt werden können. Diese Studien veranschaulichten einen neuen Mechanismus, wie mikrobielle Proteasen wahrscheinlich langanhaltende biologische Effekte im Wirtsorganismus bewirken können (178). Des Weiteren konnten Jones et al. (84) nachweisen, dass die Freisetzung von löslichem IL-6R durch das Akutphase-Protein C-reaktives Protein (CRP) induziert wird. Erst kürzlich wurde nachgewiesen, dass auch Calmodulin Inhibitoren (42) und Stickoxid (191) die Spaltung von Membranproteinen stimulieren. Ebenfalls für einen allgemeinen Mechanismus spricht, dass mutante Zell-Linien, die auf ein Fehlen an proTGF α Shedding selektiert worden waren, auch eine defekte Freisetzung verschiedener miteinander nicht verwandter Ektodomänen aufwiesen (7, 9).

1.1.5.2 Postulierter Spaltmechanismus

Über den Spaltmechanismus an sich und dessen regulierende Komponenten ist bislang wenig bekannt. Kenntnisse über die Struktur von proTNF α und die katalytische Domäne von TACE erlaubten es, vorläufige Modelle für die Bindung von TACE an proTNF α am Computer zu entwickeln (110). Das hieraus abgeleitete wahrscheinlichste Modell ist schematisch in Abb. 1.6 dargestellt und zeigt die Interaktion der beiden Membranproteine proTNF α und TACE.

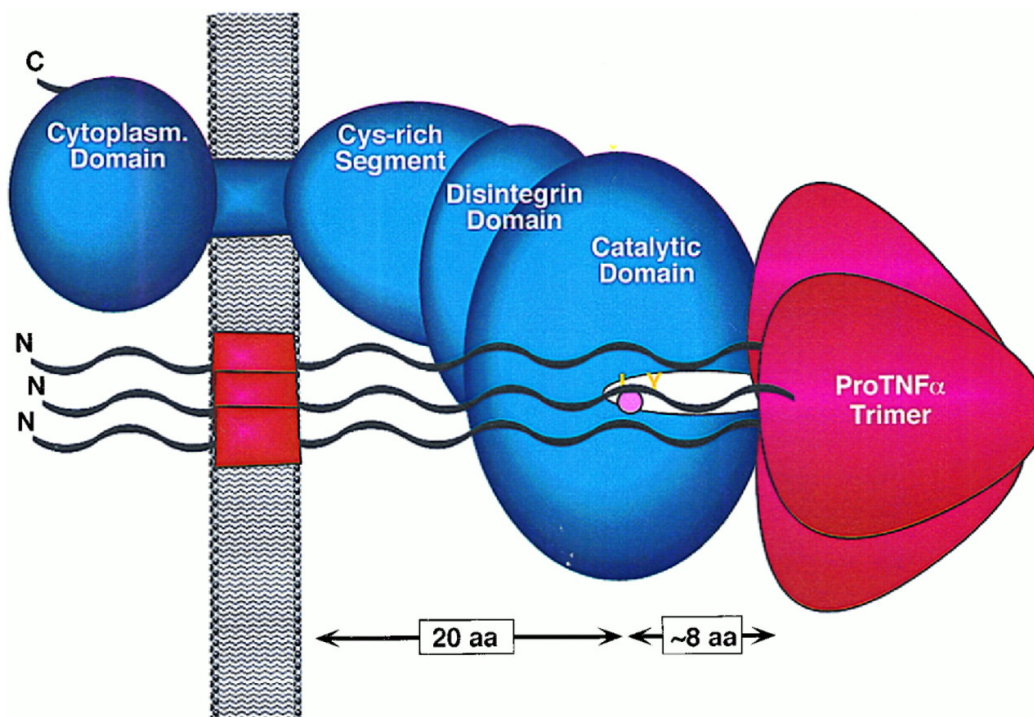


Abb. 1.6 Schematisches Modell des hypothetischen proTNF α -TACE-Komplexes. Trimeres proTNF α besteht aus intrazellulärer und Transmembrandomäne, sowie einem 26 bis 28 Reste langen Stiels und dem kompakten trimeren TNF α Konus (83). TACE und proTNF α sind möglicherweise in der Art in der Membran verankert, dass der TNF α -Konus an der „rechten“ Seite der katalytischen Domäne angefügt ist, so dass die Bindung an der Spaltstelle Ala₇₆Val₇₇ eines proTNF α -Strangs oberhalb der katalytischen Tasche platziert wird. (Aus Maskos et al. (1998) (110)).

Die aktive Tasche der katalytischen Domäne von TACE bindet die Spaltstellenregion eines Moleküls des proTNF α -Trimers. Dass es bevorzugt zu einer Spaltung bei Ala₇₆Val₇₇ durch TACE kommt, kann teilweise durch günstige Interaktionen in der Umgebung der aktiven Tasche erklärt werden (110). Des weiteren wird angenom-

men, dass die katalytische Domäne von TACE mit dem Konus des proTNF α Trimers interagiert (83). Die Disintegrindomäne scheint in der Substrat-Enzym Interaktion, wie sie für proTNF α und TACE angenommen wird, nicht beteiligt zu sein. Wichtig für die Spaltung scheint allerdings nicht nur eine Interaktion der katalytischen Domäne der Protease mit der Spaltstellenregion des zu prozessierenden Proteins zu sein, sondern auch die Interaktionen des Enzyms mit Regionen, die distal zu der eigentlichen Spaltstellenregion liegen. Dies konnte sowohl für proTGF α (8) als auch für „Angiotensin Converting Enzyme“ (ACE) (155) gezeigt werden.

1.1.5.3 Bedeutung von Spaltstellensequenzen

Proteine, die durch die postulierte allgemeine Sheddingmaschinerie gespalten werden, zeigen keine Übereinstimmungen in der Sequenz der Spaltstellenregion. Dies lässt vermuten, dass entweder mehrere unterschiedliche Proteasen an dem Vorgang beteiligt sind oder dass das Enzym keine strikte Sequenzspezifität aufweist. Bisher konnte gezeigt werden, dass Deletionen in der Spaltstellenregion eine Spaltung verhindern. Hierbei zeigte sich, dass die analysierten Proteine unterschiedlich sensibel auf die durchgeführten Deletionen reagierten. Im Falle vom IL-6R (124), L-Selektin (116), proTGF α (26) und „Colony-Stimulating Factor“ (CSF-1) (41) führten schon kleine Deletionen von etwa fünf Aminosäuren dazu, dass die Proteinen nicht mehr gespalten werden konnten. proTNF α wurde erst nach einer Deletion von 20 Aminosäuren nicht mehr gespalten (174). Im Falle von ACE führte eine Deletion von 24 Aminosäuren zu einer verlangsamten Prozessierung des Proteins. Erst die komplette Deletion der Spaltstellenregion (47 Aminosäuren) führte zu einer Blockierung des Sheddings (46). Für alle diese Proteine konnte des weiteren gezeigt werden, dass Punktmutationen im Bereich der Spaltstelle zu keiner Reduktion der Spaltung führten, was vermuten lässt, dass es keine strikte Sequenzspezifität gibt. Die gewonnenen Erkenntnisse führten zu der Vermutung, dass ein ausreichend großer Abstand zwischen Zellmembran und erster extrazellulärer Domäne existieren muss (der sog. Stiel), so dass die Protease Zugang zur Spaltstelle erhält (174). Es wurde postuliert, dass die Freisetzung eines Membranproteins durch die entsprechende Protease/Sekretase eine offene oder zumindest zugängliche Stielregion von mindestens 11 Aminosäuren benötigt (Abb. 1.7). Hierbei müsste ein minimaler Abstand von drei Aminosäuren zur proximalen extrazellulären Domäne und von mindestens acht Aminosäuren zur Membran vorliegen (46). Membranproteine mit kürzeren Stielsequenzen

wären demzufolge schlechte Substrate für die Sheddingmaschinerie. Dies konnte am Beispiel von P- und E-Selektin bzw. von Integrin β -Untereinheiten gezeigt werden, die Stiellängen von acht, sieben bzw. fünf Resten aufweisen (85, 88).

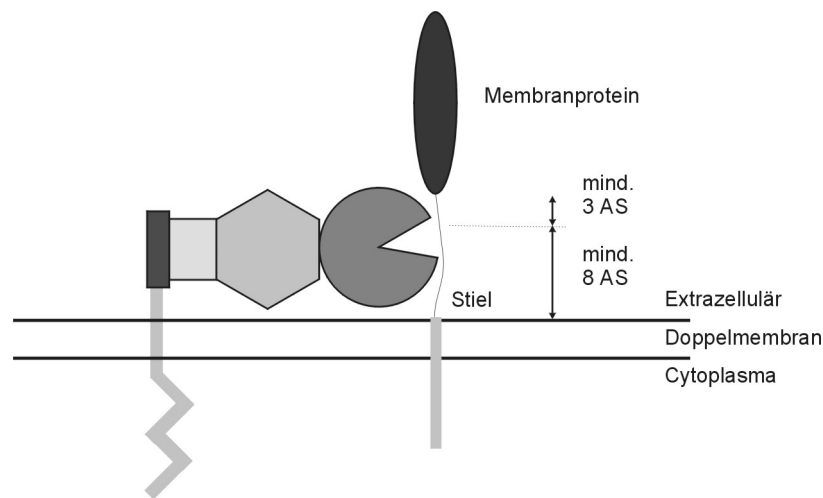


Abb. 1.7 Hypothetisches Modell über die minimale Länge des Stiels eines spaltbaren Membranproteins. Die Konvertase benötigt einen Stiel von zumindest 11 Aminosäuren Länge, um Zugang zur Spaltstelle (gestrichelte Linie) zu erhalten. Die Spaltung findet in mindestens acht Aminosäuren Entfernung von der Zellmembran statt und mindestens drei Reste von der proximalen extrazellulären Domäne statt.

Daraufhin wurde untersucht, ob die Aminosäuresequenz der Spaltstellenregion überhaupt eine Rolle als Determinante der Spaltspezifität hat. Arribas et al. (8) hatten gezeigt, dass kurze membrannahe Sequenzen aus APP und proTGF α in der Lage waren, das nicht spaltbare Proteoglykan Betaglykan (Typ III TGF β Rezeptor) der Spaltmaschinerie zugänglich zu machen. Im Gegensatz hierzu konnten Sadhukhan et al. (155) im Falle von ACE nachweisen, dass die distale extrazelluläre Domäne sowohl für die Erkennung als auch für die Spaltung durch die beteiligte Protease ausreichend ist. Ein Transfer dieser Domäne auf das nicht spaltbare Protein CD4 führte zu einer PMA-induzierten Spaltung dieses Moleküls (155).

1.2 Signalweiterleitung über den IL-6/IL-6R Komplex

1.2.1 Physiologische Funktionen von Interleukin-6 (IL-6)

Für die Steuerung von Stoffwechselfvorgängen sowie Proliferation und Differenzierung von Zellen im gesamten Organismus ist ein Informationsaustausch zwischen Zellen und Organen lebenswichtig. Diese Information wird über Zell-Zell-Kontakte oder über humorale Medien ausgetauscht. Zu den letzteren gehören Hormone und Zytokine. Zytokine sind extrazelluläre Proteine, die vor allem die Immunabwehr, Hämatopoese und neuronale Entwicklung steuern. Zu ihnen gehören Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren, koloniestimulierende Faktoren, Tumor-Nekrose Faktoren und Chemokine. Das gleiche Zytokin kann von verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. Zytokine aktivieren ihre Zielzellen über spezifische Rezeptoren auf der Membran.

Interleukin-6 (IL-6) ist ein multifunktionelles Zytokin, das eine zentrale Rolle als Differenzierungs- und Wachstumsfaktor für hämatopoetische Vorläuferzellen, B- und T-Zellen, Keratinozyten, neuronale Zellen, Osteoclasten und Endothelzellen (4, 11) spielt. Außerdem moduliert IL-6 die Transkription von verschiedenen Leber spezifischen Genen bei akuten und chronischen entzündlichen Zuständen (55). Bei gesunden Menschen ist das Zytokin im Serum kaum messbar (< 10 pg/ml). Pathologisch veränderte IL-6 Spiegel in Größenordnungen bis zu einigen µg/ml im Serum wurden dagegen für verschiedene hämatologische Krankheitsbilder beschrieben, z. B. Plasmozytom (167), Castleman'sche Krankheit (28), Osteoporose (82), Rheumatoide Arthritis (70), Sepsis (68) und AIDS (72, 140).

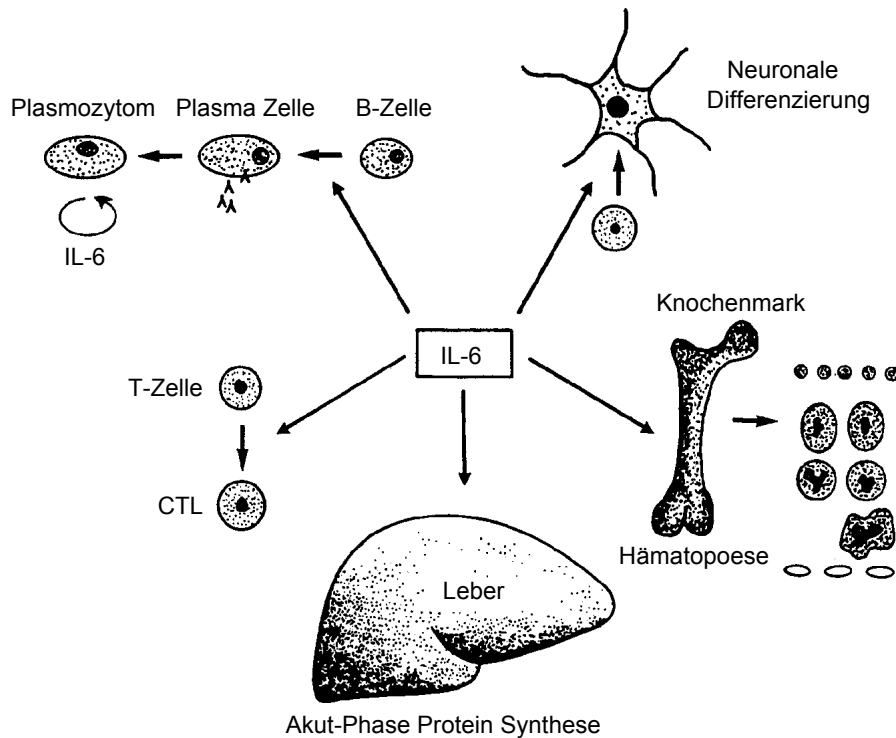


Abb. 1.8 IL-6 als multifunktionelles Zytokin. IL-6 ist ein Wachstums- und Differenzierungsfaktor für eine Vielzahl von Zelltypen und induziert bei entzündlichen Prozessen die Expression von Akut-Phase-Proteinen in der Leber (aus Heinrich et al (1990) (69)).

1.2.2 Der IL-6 Rezeptor (IL-6R)

Am Aufbau des IL-6-Rezeptorkomplexes sind zwei unterschiedliche Proteine beteiligt. Beide Untereinheiten sind Membranproteine vom Typ I, d. h. ihr N-Terminus befindet sich außerhalb der Zelle, der C-Terminus im Zytoplasma. Bei der IL-6 bindenden Untereinheit (IL-6R) handelt es sich um ein Glykoprotein von 80 kDa, dessen cDNA erstmals aus einer cDNA Bibliothek der humanen „Natural Killer“-Zell-Linie YT kloniert worden war (187). Die zweite Untereinheit des Komplexes ist das ubiquitär vorkommende Glykoprotein gp130, das seinen Namen aufgrund seines Molekulargewichts erhalten hat. Dieses Membranprotein, das aus cDNA Bibliotheken von Plazenta und U266-Zellen kloniert werden konnte (71), ist für die Weiterleitung des Signals in der Zelle verantwortlich (169). Beide Rezeptorproteine gehören aufgrund ihrer Struktur zu der „Hemopoietic Receptor Family“ (HRF) (13, 14), zu der u. a. auch die

Rezeptoren von „Leukaemia Inhibitory Factor“ (LIF), „Ciliary Neurotrophic Factor“ (CNTF) und IL-4 gehören.

Unter Hinzunahme des 19 Aminosäuren langen Signalpeptids besteht der IL-6R aus 468 Aminosäuren. Die N-terminalen 90 Aminosäuren des Proteins weisen große Homologien zu Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie auf. Für die Transmembrandomäne konnte mittels Hydrophobizitätsanalysen die ungewöhnliche Länge von 28 Aminosäuren ermittelt werden (187). Von bisher unbekannter Funktion ist die keine Homologie zu bekannten Strukturen anderer Rezeptoren aufweisende cytoplasmatische Domäne aus 82 Aminosäuren (169).

Die zweite Komponente des IL-6R-Komplexes (gp130) besteht aus 918 Aminosäuren. Rezeptoren für LIF, „Oncostatin M“ (OSM), „Granulocyte-Colony Stimulating Factor“ (G-CSF) und Leptin zeigen eine hohe Homologie zu gp130. Sie werden daher in einer gp130-Subfamilie der Klasse-I-Zytokinrezeptoren zusammengefasst (170).

1.2.3 Entstehung des IL-6/IL-6R Komplexes

Der lösliche IL-6R agiert im Gegensatz zu vielen anderen löslichen Zytokinrezeptoren in agonistischer Weise, d. h. der lösliche Rezeptor kann nach Binden an IL-6 ebenso zur Signalauslösung führen wie der membrangebundene Rezeptor (Abb. 1.9). Hierbei bildet freies IL-6 zunächst einen niedrig affinen Komplex ($K_D = 10^{-9}$ M) mit dem spezifischen IL-6R in membrangebundener (Abb. 1.9A) oder löslicher Form (Abb. 1.9B) (187); dieser Komplex assoziiert mit hoher Affinität ($K_D = 10^{-11}$ M) mit mindestens einem gp130-Molekül (71, 187). Die darauf folgende kovalente Dimerisierung zweier gp130-Moleküle durch Disulfidbrückenbindung führt schließlich zur Auslösung eines intrazellulären Signals (126). Eine Zelle, die zwar gp130 exprimiert aber keinen membrangebundenen IL-6R, kann nicht auf IL-6 reagieren. Sie wird jedoch durch eine weitere Zelle, die den spezifischen Rezeptor freisetzt, responsiv für das Zytokin. Dieses Prinzip wurde als 'Transsignalling' bezeichnet (151).

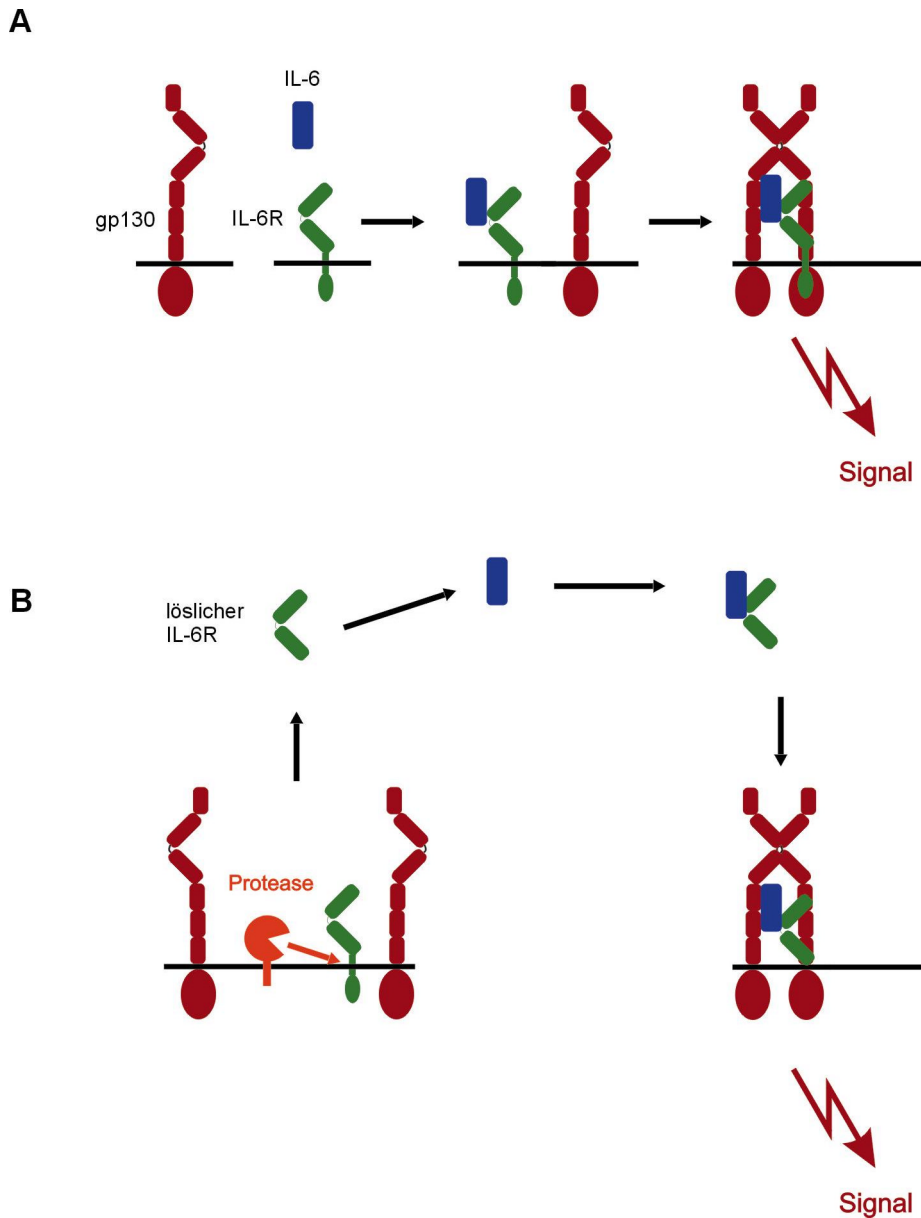


Abb. 1.9 gp130 Stimulation durch löslichen oder membrangebundenen IL-6R. (A) IL-6 bindet an den membrangebundenen IL-6R. Dieser Komplex assoziiert mit einem Molekül gp130. Dies führt zu einer Homodimerisierung zweier gp130-Moleküle und zum Signal. (B) Eine IL-6R produzierende Zelle setzt den löslichen IL-6R frei, der daraufhin an IL-6 binden kann. Dieser Komplex löst die Homodimerisierung von gp130 auf Zellen aus, die zwar gp130 aber keinen IL-6R exprimieren (aus Peters et al. (1998) (138)).

1.2.4 Signalweiterleitung über gp130

Im Gegensatz zu einer Vielzahl von Wachstumsfaktorrezeptoren besitzen Zytokinrezeptoren der gp130-Subfamilie keine intrinsische Kinaseaktivität. Es konnte allerdings festgestellt werden, dass Zytokinrezeptoren dennoch in der Lage sind, über ihre zytoplasmatische Domäne Ligandenbindung mit der Tyrosinphosphorylierung von zytoplasmatischen Substraten zu koppeln. Dies führte zu der Identifikation von Proteintyrosinkinasen, die mit Zytokinrezeptoren assoziiert sind und nach Ligandenbindung aktiviert werden (134, 182). Diese gehören zu der Familie der Janus Kinasen (JAKs) (79). JAK1 und JAK2 sind konstitutiv mit der zytoplasmatischen Region von gp130 assoziiert und werden infolge der Zytokinbindung aktiviert (105). Die ligandeninduzierte Dimerisierung führt zunächst zu der intrazellulären Tyrosinphosphorylierung von gp130, das nun Transkriptionsfaktoren der „Signal Transducer and Activator of Transcription“ (STAT)-Familie binden kann (164) (schematisch dargestellt in Abb. 1.10).

Die Rekrutierung von STAT3 und, in geringerem Maß, STAT1, führt zu deren Tyrosinphosphorylierung durch JAK-Kinasen und anschließender Dimerisierung über SH2-Domänen (162). Neben der Aktivierung von STAT-Faktoren führt die Stimulation von gp130 zu Veränderungen in der GTPase-Aktivität des „rat sarcoma“-Proteins (RAS) (158). Der erhöhte Anteil von regulatorisch aktivem RAS-GTP führt zur Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von Raf-1, einer Serin/Threonin-Kinase, die ihrerseits zur Phosphorylierung einer weiteren Serin/Threonin-Kinase, Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP), beiträgt (25, 38). Die Signalkette des RAS/MAPK-Weges führt schließlich zur Threoninphosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-IL-6, welcher an Typ1-Promotorregionen der Akut-Phase-Proteine bindet und deren Expression initiiert (3, 127). STAT-Dimere aktivieren ebenfalls die Expression von Akut-Phase-Proteinen nach Bindung an Typ2-Promotorregionen (Abb. 1.10) (141, 181).

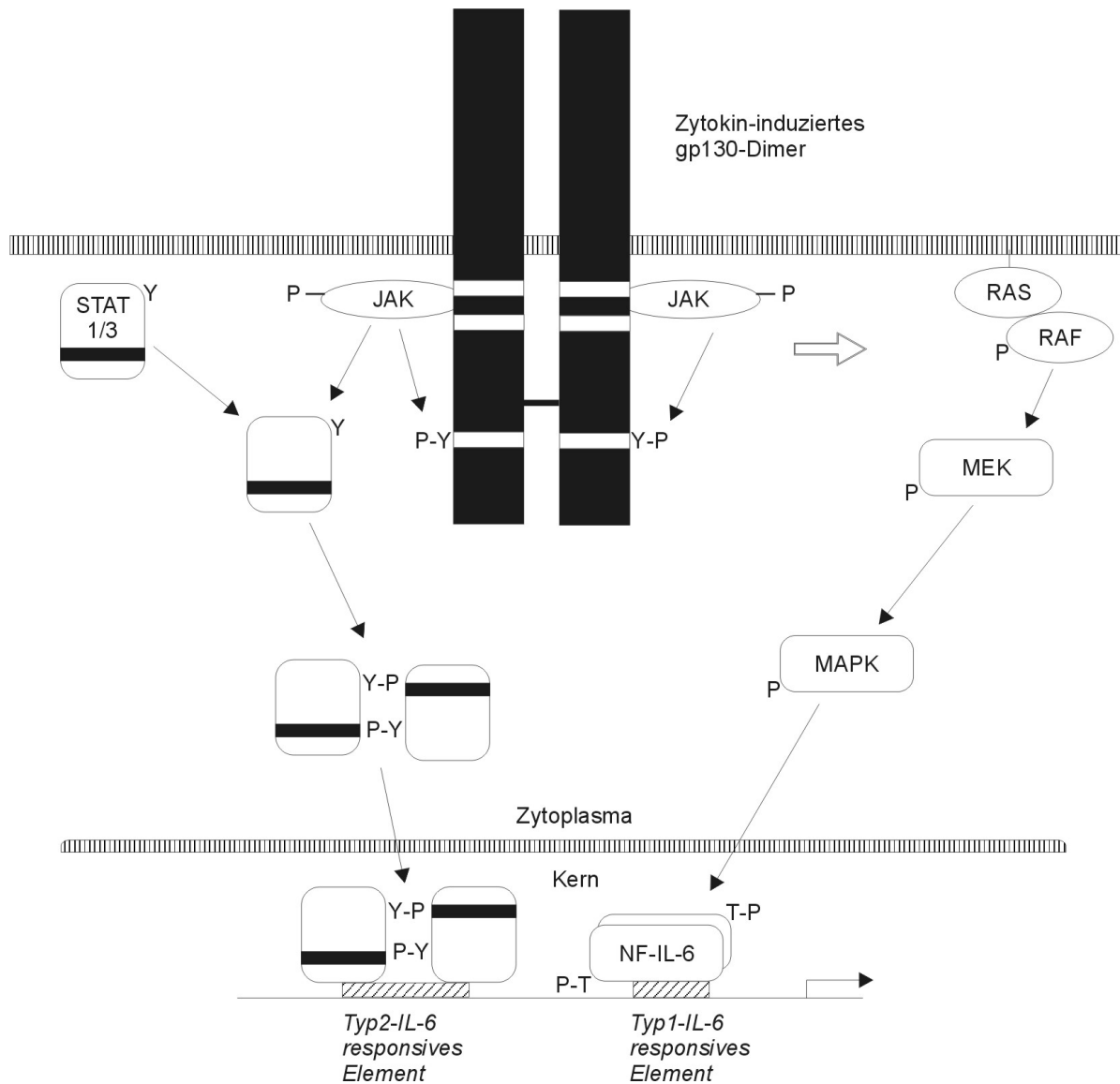


Abb. 1.10 gp130-Signalweg über JAK/STAT und RAF/MAPK. Nach der Zytokin-induzierten Dimerisierung von gp130 werden Tyrosinkinasen der JAK-Familie aktiviert, die im zytoplasmatischen Bereich des gp130-Moleküls assoziiert sind. Die anschließende Phosphorylierung von Tyrosinseitenketten im *box3*-Motiv des gp130 durch JAKs führt zur Rekrutierung von STAT-Faktoren, die nach Phosphorylierung durch die benachbarten JAKs dimerisieren und in den Kern wandern. Dort erfolgt die positive Regulation von Akut-Phase-Genen über „IL-6-responsive elements“ vom Typ1. Ein zweiter Signalweg verläuft über eine Kaskade von Ser/Thr-Kinasen, die initial durch RAS aktiviert wird und endet in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-IL-6 (aus Taga & Kishimoto (1997) (170)).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die extrazelluläre Domäne einer Vielzahl nicht miteinander verwandter Proteine kann durch limitierte Proteolyse von der Zellmembran abgespalten werden. Dieser als Shedding bezeichnete Prozess, der von hoher biomedizinischer Relevanz ist, wird bislang in seinem Mechanismus erst ansatzweise verstanden.

Die Protease, die für die Spaltung von proTNF α verantwortlich ist, konnte kürzlich identifiziert werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle in der Freisetzung von TGF α und L-Selektin spielt. Da bislang noch keine Veröffentlichungen darüber existierten, ob TACE an der Spaltung des IL-6R beteiligt ist, sollte dies in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Obwohl der Prozess des Sheddings zumeist durch Phorbolester, die Protein Kinase C aktivieren, stimuliert und durch Hydroxamate wie beispielsweise den TNF α Protease Inhibitor TAPI inhibiert werden, existieren im Bereich der Spaltstellen keine Ähnlichkeiten untereinander. Mit der vorliegenden Arbeit sollten Untersuchungen über die Wichtigkeit und Austauschbarkeit von Spaltstellenregionen verschiedener Proteine durchgeführt werden. Als Ansatz wurde die Generierung chimärer Proteine gewählt. Zum einen sollten die Spaltstellenregionen zweier spaltbarer Proteine, proTNF α und IL-6R, untereinander ausgetauscht werden, um zu untersuchen, ob sich dieser Eingriff auf das Spaltverhalten dieser Proteine auswirkt. Des Weiteren sollten die Spaltregionen von proTNF α , proTGF α und IL-6R in ein Protein eingesetzt werden, das nicht durch die regulierte Spaltmaschinerie freigesetzt wird. Hierdurch sollte untersucht werden, ob bereits diese kurzen Peptide in der Lage sind, ein solches Protein spaltbar zu machen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Es wurden, soweit erhältlich, ausschließlich Chemikalien des Reinheitsgrades *pro analysi* der Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Fluka (Buchs), Sigma (Deisenhofen) und Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. „Tran[³⁵S] Label“ wurde von ICN Biomedicals GmbH (Meckenheim) bezogen. Der auf Hydroxamat basierende Metalloprotease-Inhibitor TAPI (56, 112) wurde freundlicherweise von Immunex Corp. (Seattle, Wa, USA) zur Verfügung gestellt.

2.2 Enzyme

Enzyme zur Modifikation von DNA wurden von Roche Diagnostics (Mannheim), Biolabs (Frankfurt) oder AGS (Heidelberg) bezogen. PCR-Reaktionen wurden mit Vent-Polymerase (Biolabs, Schwalbach) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3 Antiseren und Antikörper

Die spezifische Detektion des IL-6R erfolgte durch einen polyklonalen Antikörper (6.2) (166). TNF α wurde durch einen polyklonalen Antikörper von Genzyme (Rüsselsheim) detektiert. Anti-Kaninchen-IgG-POD stammte von Sigma (Deisenhofen), anti-Maus-IgG-POD von Biosource (Calmarillo, Ca, USA). Die Detektion von gp130 erfolgte sowohl durch einen polyklonalen Antikörper #SC655 von Santa Cruz (Santa Cruz, Ca, USA) als auch durch einen monoklonalen Antikörper B-S12 von Cloneteck (Besançon, Frankreich). Der monoklonale Anti-STAT3 Antikörper stammte von Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA), der monoklonale anti-Phosphotyrosin Antikörper (4G10) wurde von UBI (Lake Placid, NY, USA) erworben.

2.4 cDNAs und rekombinante Proteine

gp130 wurde in den Expressionsvektor p409 subkloniert, der freundlicherweise von Immunex Corp. (Seattle, Wa, USA) zur Verfügung gestellt worden war. Der humane

IL-6R befand sich in pCDM8, proTNF α in pcDNA3.1(-) (beide Invitrogen, Leek, Niederlande) und humanes STAT3 im pSVL (Pharmacia Biotech, Freiburg).

Rekombinantes humanes IL-6 wurde wie zuvor beschrieben exprimiert und gereinigt (27) und von Martina Fischer freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.5 Zellkultur und transiente Transfektion

TACE defiziente Fibroblastenzelllinien wurden durch retrovirale Transformation mit anschließender limitierter Verdünnung aus Ohrfibroblasten einer TACE^{-/-} Maus gewonnen (130, 137). Diese Zelllinie sowie eine TACE defiziente Zelllinie, in die TACE wieder hineintransfiziert worden war (TACE^{-/-}:TACE), wurde uns freundlicherweise von Immunex Corp. (Seattle, Wa, USA) zur Verfügung gestellt. Die adhärent wachsende Affennierenzelllinie COS-7 wurde von ATTC (Manassas, VA, USA) bezogen. Zellen wurden in DMEM (Life Technologies, Eggenstein) mit 50 U/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin (DMEM (Life Technologies, Eggenstein) und 10% Hitzeinaktiviertem FCS (Seromed, Berlin) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Transiente Transfektionen von COS-7 Zellen wurden unter Verwendung von DEAE/Dextran (Merck, Darmstadt) durchgeführt (114). Die Mausfibroblasten wurden unter Verwendung des LIPOFECTAMINE PLUS Reagenz von Life Technologies (Eggenstein) nach den Angaben des Herstellers transient transfiziert. Es wurden jeweils 5 μ g DNA pro 10 cm Kulturschale transfiziert.

2.6 Molekularbiologische Techniken

Alle molekularbiologischen Methoden wie Plasmidpräparationen, Restriktion und Ligation von DNA, Sequenzierung von DNA, Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese, Umklonierung von DNA-Restriktionsfragmenten und bakterielle Transformation wurden, falls nicht anders vermerkt, nach Standardvorschriften (156) durchgeführt.

2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Fluorographie und Western Blot

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Detektion von Proteinen wurde, wie von Laemmli beschrieben, gehandhabt (91). Die Durchführung der Fluorographie wurde von Bonner und Laskey (24) beschrieben. Die Zellen wurden hierfür vor der Lyse metabolisch markiert. Sie wurden zunächst für eine halbe Stunde ohne Cystein und Methionin inkubiert. Daraufhin wurde ihnen 50 μCi [^{35}S]-Cystein/Methionin für zwei Stunden zugesetzt. Anschließend erfolgte eine Kultivierung in cystein/methioninhaltigem Medium mit 0,5 % FCS für mindestens zwei weitere Stunden. Für einen immunologischen Nachweis durch Western Blot (90) wurden nicht-metabolisch markierte elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf PVDF- oder Nitrozellulose-Membranen übertragen, mit spezifischen Erstantikörpern und einem peroxydasekonjugierten Zweitantikörper inkubiert. Biotinylierte Proteine wurden mit einem an Peroxidase gekoppelten Streptavidin Substrat (Roche Dignostics, Mannheim) detektiert. Die Peroxydaseaktivität wurde mit Hilfe des ECL Western Blot Reagenz (Amersham Pharmacia, Uppsalla, Schweden) nachgewiesen.

2.8 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Die Mengen an löslichem IL-6R und $\text{TNF}\alpha$ in Zellkulturüberständen wurden mittels eines „sandwich ELISA“ (35) bei Raumtemperatur bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des ELISA-Kit Herstellers (CLB, Hiss Diagnostics, Freiburg)

2.9 Immunpräzipitation

Proteine wurden aus Zellkulturüberständen bzw. Lysaten detektiert. Lysiert wurden die Zellen in PBS mit 1 % Nonidet P-40 und den Proteaseinhibitoren Aprotinin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Leupeptin (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Pepstatin (0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und PMSF (0.2 mM). Die Detektion von Proteinen durch Immunpräzipitation erfolgte mit spezifischen Antikörpern wie bereits beschrieben (66). Ein Milliliter Überstand bzw. Lysat wurde nach einer Pansorbinbehandlung für 1 Stunde bei 4°C mit spezifischen Antikörpern (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Die Immunkomplexe wurden mit Protein A-Sepharose (Amersham Phar-

macia, Uppsalla, Schweden) gefällt, auf 7,5 - 12,5 % SDS Polyacrylamidgelen aufgetrennt und im folgenden durch Western Blot bzw. Fluorographie analysiert.

2.10 Entfernung N-glykosidisch gebundener Oligosaccharid-Seitenketten

Zur Entfernung N-glykosidisch gebundener Oligosaccharid-Seitenketten wurden [³⁵S]-markierte Proteine nach Immunpräzipitation mit 20 U „Peptide N-Glycosidase F“ (PNGaseF)/ml für 24 h bei 37 °C inkubiert. Deglykosylierte Proteine wurden durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Deglykosylierungspuffer: 20 mM Natriumphosphat pH7,2, 50 mM EDTA, 10 mM Natriumazid, 0,5 % Nonidet P-40.

2.11 Analyse der Tyrosinphosphorylierung

Transfizierte COS-7 Zellen wurden über Nacht ohne Serum inkubiert, bevor sie mit IL-6 stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen in 50 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, 50 mM Natrium Fluorid, 3 mM Natrium Orthovanadat und 1 % Nonidet P-40 lysiert. Nach folgender Immunpräzipitation wurden die Immunkomplexe mittels Western Blot analysiert, phosphoryliertes Tyrosin wurde mit einem monoklonalen anti-Phosphotyrosin Antikörper (4G10) nachgewiesen.

2.12 Konstruktion der Expressionsvektoren

2.12.1 Konstruktion der proTNF α /IL-6R Expressionsvektoren

Die Generierung der beiden proTNF α Chimären wurde mittels PCR durchgeführt. Da proTNF α sich in dem Expressionsvektor pcDNA3.1(-) befand, wurde als Primer 1 der T7 Primer verwendet. Eine Aval Schnittstelle, die sich in der Nähe zur proTNF α Spaltstelle befindet, wurde in den Oligonukleotidprimer eingefügt, der die IL-6R Spaltregion enthielt. Das resultierende PCR-Produkt wurde daraufhin in pcDNA3.1(-)/proTNF α über die Schnittstellen EcoRI/Aval eingefügt.

Verwendete Primer:

T7 Primer: 5' -TAATACGACTCACTATAGGG- 3'

proTNF/IL-6R: Ava I **IL-6R Spaltstellenregion**
5' –GTGTCACTCGGGGT**TGGTACTGAAGAAGAATCTTGCACT**
GGGAGGCTTGTGATTAGAGAGAGGTCCTGGG- 3'

proTNF/revIL-6R: Ava I **reverse IL-6R Spaltstellenregion**
5' – GTGTCACTCGGGGT**TGTGCTGAGTGGCACTTGATCAGAA**
GATGATACTGGGATTAGAGAGAGGTCCTGGG – 3'

2.12.2 Konstruktion der IL-6R/proTNF α Expressionsvektoren

Die zwei IL-6R Chimären wurden mittels doppelsträngiger Oligonukleotidadapter generiert, die in die IL-6R cDNA kloniert wurden. Hierzu wurde eine Bam HI Schnittstelle verwendet, die zuvor in die Transmembrandomäne des IL-6R einkloniert worden war (122), sowie eine SspI Restriktionsstelle in der extrazellulären Domäne nahe der Membran. Die verwendeten Oligonukleotide waren in 36 Basenpaaren verschieden zum IL-6R. Diese Basenpaare kodieren für die Spaltregion von proTNF α . Die Chimären wurden im folgenden über XbaI in den Expressionsvektor pcDNA3.1(-) umkloniert.

Verwendete Oligonukleotide

proTNF α Spaltstellenregion

IL-6R/proTNF α : 5' Sspl – ATTCTCTTCAGAGATTCTGCAAATGCGAGCCCTCTGGCC-
CAGGCAGTCAGATCATCTTCGCGACTGCCACATTCTGGTTGCTGGAG – Bam HI 3'

reverse proTNF α Spaltstellenregion

IL-6R/proTNF α rev: 5' Sspl – ATTCTCTTCAGAGATTCTGCAAATGCGCGATCGTCTTCA-
AGAGTCGCACAGGCCCTGCCTAGCCTGCCACATTCTGGTTGCTG-
GAG – Bam HI 3'

2.12.3 Konstruktion der gp130 Spaltstellenchimären in Expressionsvektoren

Die gp130 Spaltstellenchimären wurden mittels doppelsträngiger Oligonukleotidadapter generiert. Zunächst wurde eine NheI Schnittstelle sieben Aminosäuren N-terminal zur Membran eingefügt. Die Chimären wurden im folgenden mit Oligonukleotiden hergestellt, die über die NheI und EcoRI Schnittstellen eingefügt wurden. Im folgenden wurden die generierten Chimären über BamHI und XhoI in den Expressionsvektor p409 umkloniert.

Zur Einführung der Mutation wurde folgendes Oligonukleotid verwendet:

Q615S:

5' EcoRI – AATTCAC~~TTT~~TACTACCCAAAGTTTGCTAGCGGAGAAATTGAAGCCTAGTCG-
TGCCTGTTTGC – EspI 3'

Fett: eingefügte Mutation

Daraufhin wurden die folgenden Chimären generiert:

Bezeichnung	Kurzbeschreibung	Oligonukleotid (einzelsträngig)
gp130Q615S	gp130 Oligo ohne Veränderung	AATTCAC TTTTACTACCCCA - AAGTTTG
gpTN130	Oligo Kodiert Spaltstellenpeptid von proTNF α	AATTCAGCCCTCTGGCC <u>CAGGCAG</u> - <u>TCAGATCATCTTCGCGAG</u>
gpRT130	Oligo Kodiert reverses proTNF α Spaltstellenpeptid	AATTCCGATCGTCTTCAAG <u>AGTCG</u> - <u>CACAGGCCCTGCCTAGCG</u>
gpTG130	Oligo Kodiert proTGF α Spaltstellenpeptid	AATTCATGCGGACCTCCTGG <u>CCG</u> - <u>TGGTGGCTGCCAGCCAGG</u>
gpIL130	Oligo Kodiert IL-6R Spaltstellenpeptid	AATTCACAAGCCTCCAGTG <u>CAAG</u> - <u>ATTCTTCTTCAGTACCAG</u>
gp8IL130	Kodiert verkürztes IL-6R Peptid, enthält Spaltstelle	AATTCCTCCAGTG <u>CAAGATTCTT</u> - CTTCAG
gp4IL130	Kodiert verkürztes IL-6R Peptid, enthält Spaltstelle	AATTCGTG <u>CAAGATTCTG</u>
gp Δ 4IL130	Kodiert verkürztes IL-6R Peptid, enthält Spaltstelle nicht	AATTCACAAGCCTCCGATCTTCAG- TACCAG
gp Δ 8IL130	Kodiert verkürztes IL-6R Peptid, enthält Spaltstelle nicht	AATTCACAAGCGTACCAG
gpKLIFR130	Kodiert kurzes Peptid aus LIFR, korrespondierend zu gp130	AATTCAGTATGTATGTGGTGACA- AAGG
gpLLIFR130	Kodiert langes Peptid aus LIFR, korrespondierend zu gp130	AATTCAGTATGTATGTGGTGACA- AAGGAAAATG

Unterstrichen: Spaltstelle

3 Ergebnisse

3.1 Beteiligung von TACE am Shedding von IL-6R

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Metalloprotease TACE verantwortlich für die Prozessierung von proTNF α ist (29). Des Weiteren konnten Peschon et al. (137) nachweisen, dass TACE an dem Shedding verschiedener anderer Proteine wie z. B. L-Selektin und proTGF α beteiligt ist. Um zu überprüfen, ob diese Metalloprotease auch an der Prozessierung des IL-6Rs beteiligt ist, wurde dessen Shedding in Zellen untersucht, die über kein funktionelles TACE verfügen. Als Modellsystem boten sich TACE defiziente (TACE^{-/-}) Fibroblasten an, die aus Ohrenfibroblasten TACE^{-/-} Mäuse durch retrovirale Transformation mit anschließender Verdünnung generiert worden waren (130, 137). In diesen Zellen wurde der humane IL-6R überexprimiert und die PMA-induzierte Freisetzung von löslichem IL-6R sowie deren Inhibition durch das Hydroxamat TAPI untersucht (Abb. 3.1A). In Abwesenheit von PMA und TAPI konnte spontanes Shedding des IL-6Rs detektiert werden, da löslicher IL-6R in den Zellkulturüberständen nachgewiesen werden konnte. Die Stimulation mit PMA führte zu keiner weiteren Zunahme von löslichem IL-6R in den Überständen. Die spontane Freisetzung von löslichem IL-6R wurde teilweise durch den Metalloproteaseinhibitor TAPI blockiert. Um die hier erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen wurden im folgenden Zellysate von TACE^{-/-} Fibroblasten untersucht, die mit humaner IL-6R cDNA transient transfiziert worden waren (Abb. 3.1B). Untransfizierte Fibroblasten exprimierten keinen IL-6R (Spur 1), während eine Transfektion der Zellen in einer starken Expression des IL-6Rs resultierte (Spur 2). PMA-Stimulation führte zu keiner Reduktion an zellgebundenem IL-6R (Spuren 4 und 5). Inkubation der Zellen mit TAPI, entweder allein (Spur 3) oder in Kombination mit PMA (Spur 5), resultierte in einem geringen Anstieg an membrangebundenem IL-6R. Ein kreuzreaktives Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 65 kDa war in allen Spuren nachweisbar und entsprach der schweren Kette der zur Immunpräzipitation verwendeten Antikörper. Das Fehlen von PMA-induziertem Shedding in TACE defizienten (TACE^{-/-}) Fibroblasten zeigt, dass TACE eine Rolle an dem induzierten Shedding des IL-6Rs spielt. Die spontane Freisetzung von löslichem IL-6R weist darauf hin, dass noch weitere Proteasen an dem Vorgang beteiligt sind. Da die spontane Freisetzung des löslichen IL-6Rs zum Teil durch den Metalloproteaseinhibitor TAPI blockiert werden konnte,

kann geschlossen werden, dass das spontane IL-6R Shedding sowohl durch Metalloproteasen als auch durch andere Proteasen, die durch TAPI nicht inhibiert werden, vermittelt wird.

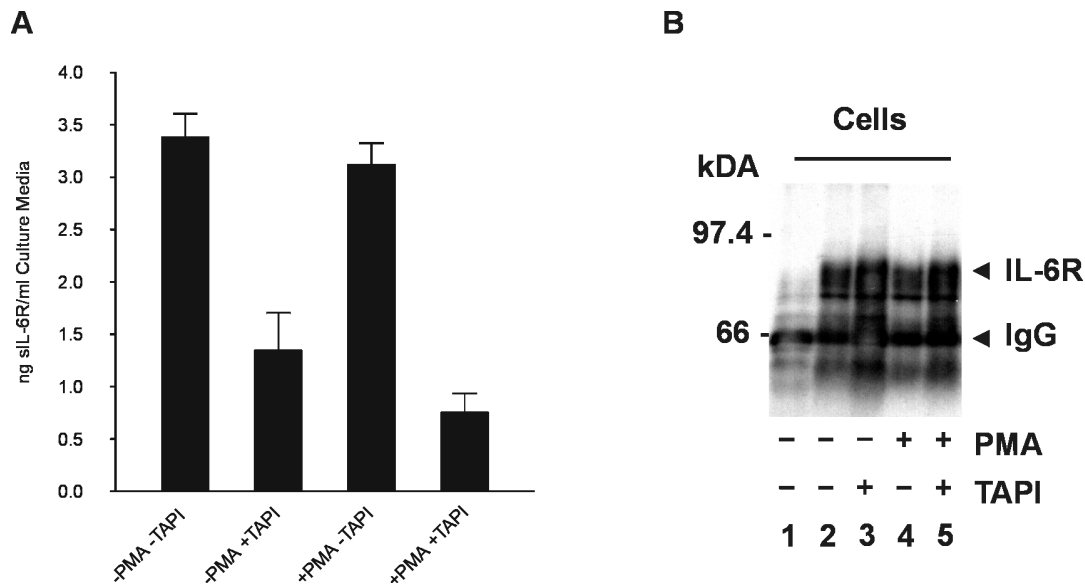


Abb. 3.1 IL-6R Shedding in TACE^{-/-} Fibroblasten. TACE^{-/-} Fibroblasten wurden transient mit humaner IL-6R cDNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit D-Biotinoyl- ϵ -aminocaproinsäure-N-hydroxysuccinimid für 15 min oberflächenbiotinyliert. Daraufhin wurden die Zellen mit 200 μ M TAPI bzw. 10^{-7} M PMA behandelt, wie in der Abbildung dargestellt. (A) Die Konzentrationen an löslichem IL-6R in den Kulturüberständen wurden durch einen spezifischen IL-6R ELISA bestimmt. Die Daten sind Durchschnittswerte \pm Standardabweichung aus Dreifachmessungen. (B) IL-6R wurde aus Zelllysaten mit einem spezifischen IL-6R Antiserum immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, bei dem an Streptavidin gekoppelte Peroxidase als Substrat verwendet wurde. Spur 1 zeigt untransfizierte Zellen.

Um den Beitrag, den TACE an der Spaltung des IL-6R hat, weiter zu untersuchen, wurden TACE^{-/-} Fibroblasten verwendet, die stabil mit TACE cDNA transfiziert worden waren (TACE^{-/-}:TACE). Es handelte sich bei diesen Zellen um die gleichen, die in dem Versuch zuvor verwendet worden waren, mit dem Unterschied, dass sie über ein funktionelles TACE verfügten. Im folgenden wurde die Prozessierung von IL-6R in TACE^{-/-} Fibroblasten mit der in TACE^{-/-}:TACE Zellen verglichen. Beide Zelllinien wurden transient mit IL-6R cDNA transfiziert und daraufhin mit PMA und TAPI behandelt (Abb. 3.2), um eine Prozessierung des IL-6Rs zu stimulieren bzw. zu inhibieren. Daraufhin wurden die Mengen an IL-6R sowohl in den Überständen als auch in

den Zelllysaten untersucht und der Quotient aus beidem gebildet. In unstimulierten Zellen ist bezüglich der IL-6R Prozessierung kein signifikanter Unterschied zwischen $TACE^{-/-}$ und $TACE^{-/-}:TACE$ Fibroblasten festzustellen. Beide Zelllinien wurden spontan prozessiert. Der Metalloproteaseinhibitor TAPI führte in beiden Zelllinien zu einer Blockierung des spontanen IL-6R Sheddings. Wie bereits zuvor beschrieben hatte PMA keinen stimulatorischen Effekt auf die Spaltung von IL-6R aus $TACE^{-/-}$ Fibroblasten, während stark erhöhte Mengen an löslichem IL-6R in den Überständen von $TACE^{-/-}:TACE$ Zellen nach der Stimulation mit PMA nachgewiesen werden konnten. Spontanes wie auch PMA induziertes Shedding konnte im folgenden sowohl in $TACE^{-/-}$ als auch in $TACE^{-/-}:TACE$ Fibroblasten durch Inkubation mit PMA und TAPI stark inhibiert werden.

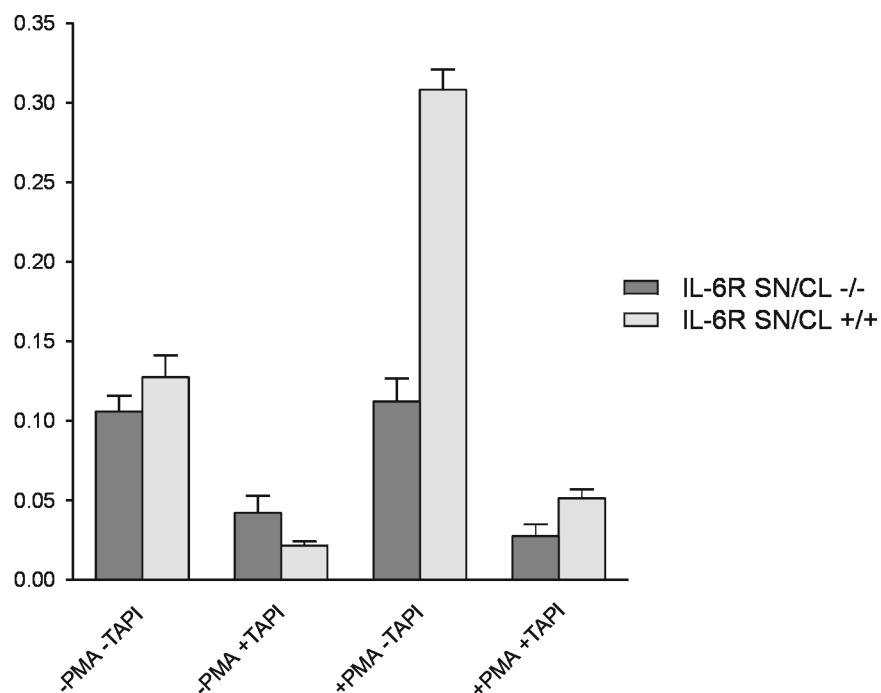


Abb. 3.2 Einfluss von TACE auf die IL-6R Prozessierung. $TACE^{-/-}$ und $TACE^{-/-}:TACE$ Fibroblasten wurden transient mit humaner IL-6R cDNA transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 200 μ M TAPI bzw. 10^{-7} M PMA behandelt, wie in der Abbildung dargestellt. Der IL-6R in den Überständen und in den Zelllysaten wurde mittels eines spezifischen IL-6R ELISA analysiert. Dargestellt sind jeweils die Quotienten aus Überstand und Lysat; die Daten sind Durchschnittswerte \pm Standardabweichung aus Dreifachmessungen.

Dieses Experiment zeigt, dass die PMA-Induzierbarkeit der IL-6R Prozessierung abhängig von der Anwesenheit von TACE ist. Diese Metalloprotease spielt offensichtlich eine entscheidende Rolle an der PMA-stimulierten Freisetzung des löslichen IL-6Rs, ist jedoch nicht an dem spontanen Shedding dieses Proteins beteiligt.

3.2 Austausch von Spaltstellen zwischen spaltbaren Proteinen

Durch die Untersuchung von Spaltstellenmutanten von proTNF α und IL-6R konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuresequenz an der Spaltstelle nicht der einzige Faktor ist, der über die Spaltbarkeit eines Membranproteins bestimmt. Selbst erhebliche Mutationen im Bereich der Spaltstellen von IL-6R und proTNF α resultierten in spaltbaren Proteinen (124, 174). Deletionen mehrerer Aminosäuren im Bereich der Spaltstelle hatten zu einer starken Reduktion der Prozessierung geführt. Im folgenden wurde untersucht, welche Auswirkungen auf die Spaltbarkeit von IL-6R und proTNF α ein Austausch von Spaltstellenregionen untereinander hätte. Die Spaltstelle beider Membranproteine liegt in der membranproximalen, ungefalteten Domäne, dem Stiel. Da der Aufbau beider Proteine im Bereich der Spaltstelle sehr ähnlich ist, wurde angenommen, dass ein Austausch von Spaltstellenpeptiden zwischen diesen beiden Proteinen zu Chimären führen würde, die ebenfalls spaltbar wären.

3.2.1 ProTNF α -Chimären mit IL-6R Spaltstelle

Es wurden zwei chimäre proTNF α Proteine hergestellt, die statt der eigenen Spaltstelle die des IL-6Rs enthielten (Abb. 3.3). Hierbei wurden Peptide von jeweils 12 Aminosäuren ausgetauscht. Da proTNF α im Gegensatz zum IL-6R ein Typ II Transmembranprotein ist, dessen N-Terminus intrazellulär liegt, wurde das Peptid mit der IL-6R Spaltstelle in zwei Orientierungen in proTNF α eingesetzt, um zu untersuchen, ob sich hieraus Unterschiede im Spaltverhalten der chimären Proteine ergeben würden. proTNF α /IL enthält das IL-6R Spaltpeptid in derselben Orientierung wie im IL-6R. proTNF α /RIL enthält dasselbe Peptid, allerdings mit umgedrehter Aminosäurereihenfolge.

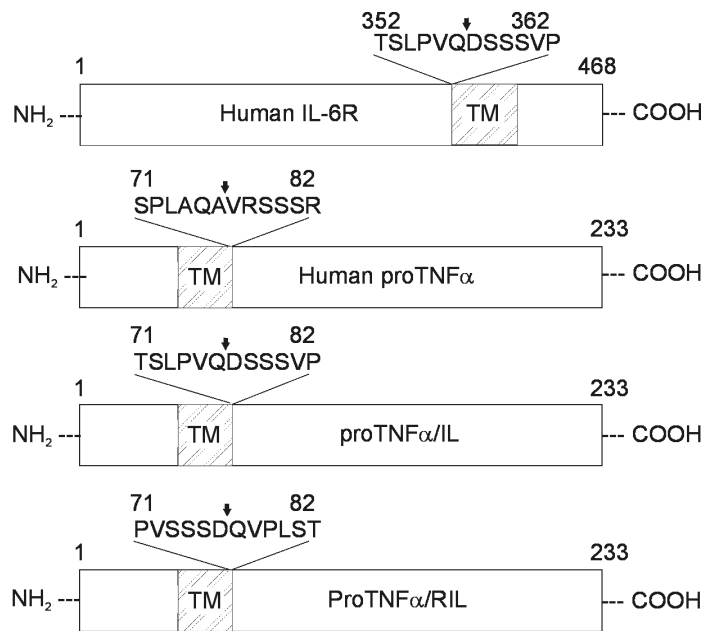


Abb. 3.3 Schematische Darstellung der proTNF α Chimären im Vergleich zu den Wildtyp Proteinen. Die Proteine sind als Balken dargestellt, mit der Transmembran-domäne (TM) als schraffierte Boxen. Die Spaltstellenregion ist im Einbuchstabenco-de oberhalb der Balken aufgetragen, die Spaltstelle selber ist durch einen Pfeil hervorgehoben. Da der IL-6R ein Transmembranprotein vom Typ I ist, liegt der C-Terminus im Cytoplasma; proTNF α ist ein Membranprotein vom Typ II, dessen C-Terminus intrazellulär liegt. Die ursprüngliche 12 Aminosäuren lange Spaltstellenregion von proTNF α war ausgetauscht worden gegen die entsprechende gleichlange Region aus dem IL-6R. ProTNF α /IL enthält die IL-6R Spaltstellenregion, die vom N-Terminus aus gesehen wie bei IL-6R mit einem Threonin beginnt. ProTNF α /RIL enthält die umgedrehte Spaltstellenregion des IL-6R, das Threonin liegt distal zur Membran.

3.2.1.1 Unspaltbarkeit der ProTNF α Chimären

Die Chimären Proteine wurden im folgenden daraufhin untersucht, ob sie noch für die Spaltmaschinerie zugänglich sind. Zu diesem Zweck wurden die cDNAs dieser Proteine bzw. zum Vergleich von proTNF α in COS-7 Zellen überexprimiert. Diese Zellen wurden daraufhin metabolisch markiert und in Ab- oder Anwesenheit von PMA, das die Freisetzung von TNF α induziert, inkubiert. Eine anschließende Präzipitation der Zelllysate und Überstände mit einem Antikörper gegen TNF α resultierte in den Ergebnissen, die in Abb. 3.4 dargestellt sind.

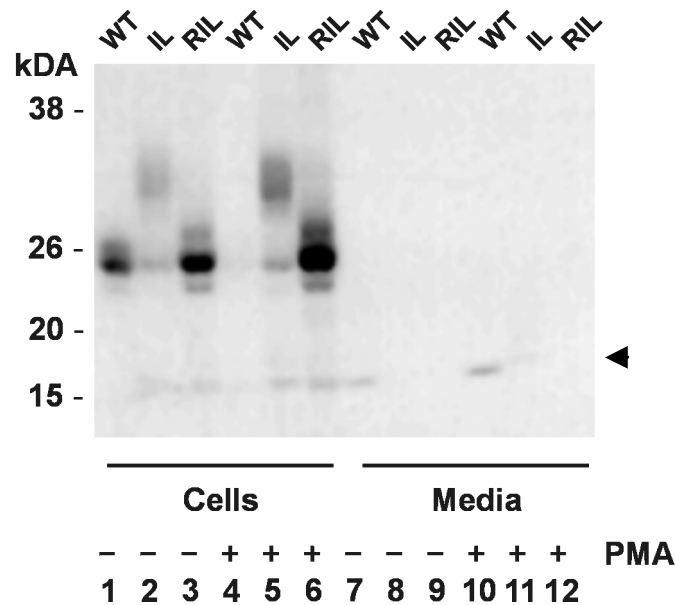


Abb. 3.4 Shedding der proTNF α chimären Proteine. COS-7 Zellen wurden transient mit der cDNA von humanem proTNF α bzw. der Chimären proTNF α /IL und proTNF α /RIL transfiziert. Die Zellen wurden für zwei Stunden metabolisch mit 50 μ Ci Tran[³⁵S]Label markiert und daraufhin für weitere zwei Stunden mit 10⁻⁷ M PMA behandelt, wie in der Abbildung dargestellt. TNF α wurde aus Zelllysaten (Spuren 1 bis 6) und Überständen (Spuren 7 bis 12) mit einem polyklonalen anti-TNF α Antikörper immunpräzipitiert. Spuren 1, 4, 7 und 10 repräsentieren Wildtyp TNF α (WT); Spuren 2, 5, 8, und 11, proTNF α /IL (IL); Spuren 3, 6, 9 und 12, proTNF α /RIL (RIL).

Die Chimären wiesen ein zu proTNF α verschiedenes Expressionsmuster auf. Dem Wildtyp (Spur 1) am ähnlichsten war das Biosyntheseprofil von proTNF α /RIL (Spur 3). Beide Proteine weisen eine dominante Form auf, die bei 26 kDa läuft. ProTNF α zeigte weiterhin eine etwas langsamere Form und in sehr geringen Mengen eine Form von etwas höherer elektrophoretischer Mobilität. Diese beiden zusätzlichen Formen waren bei proTNF α /RIL wesentlich stärker nachweisbar als bei dem Wildtyp. ProTNF α /IL wurde insgesamt schlechter exprimiert als die beiden anderen Proteine (Spur 2). Außer der bei 26 kDa laufenden Form wurde in gleicher Menge eine weitere Bande detektiert, die bei etwa 35 kDa lief. Dies war möglicherweise durch eine andere posttranslatorische Modifikation entstanden. In Abwesenheit von PMA wurde nur wenig TNF α ins Medium freigesetzt (Spur 7). Keine der Chimären wurde unter diesen Bedingungen prozessiert (Spuren 8 und 9). Eine Induktion mit PMA führte zu einem fast vollständigen Verlust von zellgebundenem proTNF α (Spur 4) und zu einer verstärkten Zunahme an reifem TNF α im Medium (Spur 10). Die zelluläre Expression beider Chimären war nach PMA-Stimulation leicht erhöht (Spuren 5 und 6). Es konn-

te kein proTNF α /RIL nach PMA-Stimulation im Medium nachgewiesen werden (Spur 12). Jedoch konnte ein immunreaktives Protein mit einer etwas geringeren elektrophoretischen Mobilität als reifes TNF α in geringer Menge in den Überständen von mit proTNF α /IL transfizierten Zellen detektiert werden (Spur 11, Pfeilspitze). Dieses Protein wurde möglicherweise durch den Gebrauch einer alternativen oder kryptischen Spaltstelle generiert. Das Vorhandensein von geringen Mengen an 17 kDa großem TNF α in den Zelllysaten ist wahrscheinlich auf eine intrazelluläre Protease zurückzuführen.

3.2.1.2 Zelloberflächenexpression der proTNF α Chimären

Da Proteine in Zelllysaten nicht nur von der Zelloberfläche stammen, sondern auch aus intrazellulären Kompartimenten und dem Zytosol, wurde spekuliert, ob das Fehlen von Spaltbarkeit der Chimären auf verminderte Oberflächenexpression zurückzuführen wäre. Aus diesem Grund wurden die Oberflächenproteine von COS-7 Zellen biotinyliert, die zuvor mit diesen Chimären bzw. mit proTNF α transfiziert worden waren (Abb. 3.5). Der hierzu verwendete Biotinester kann die Zellmembran nicht durchdringen.

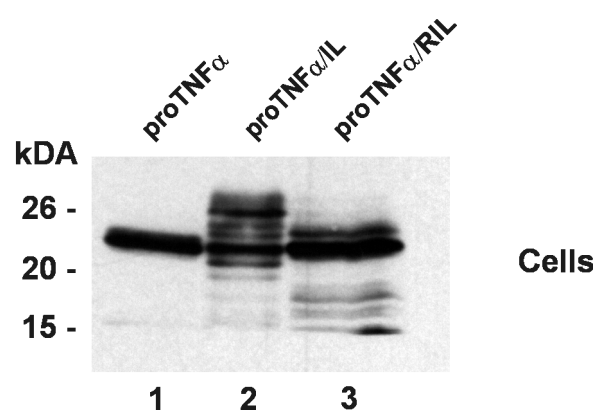


Abb. 3.5 Chimäre Proteine werden auf der Zelloberfläche exprimiert. COS-7 Zellen wurden transient mit der cDNA von humanem proTNF α bzw. der Chimären proTNF α /IL und proTNF α /RIL transfiziert und für 15 min mit D-Biotinoyl- ϵ -aminocaproinsäure-N-hydroxysuccinimid biotinyliert. TNF α wurde aus den Zelllysaten mit einem polyklonalen anti-TNF α Antikörper immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE mit nachfolgendem Western Blot analysiert. Als Substrat wurde an Streptavidin gekoppelte Peroxidase verwendet.

Immunpräzipitation mit einem polyklonalen Antikörper gegen $\text{TNF}\alpha$ und anschließender Western Blot ergaben, dass beide Chimären auf der Zelloberfläche exprimiert wurden. Verglichen mit dem Wildtyp $\text{proTNF}\alpha$ (Spur 1) wurde $\text{proTNF}\alpha/\text{RIL}$ gut auf der Zelloberfläche exprimiert (Spur 3), zeigte jedoch zahlreiche Degradationen. $\text{ProTNF}\alpha/\text{IL}$ zeigte eine schwächere Expression des 26 kDa Proteins, und einige Proteinbanden von höherem Molekulargewicht (Spur 2). Interessanterweise war zuvor gezeigt worden, dass diese Chimäre in geringen Mengen von der Zellmembran gespalten wurde und im Überstand als ein Protein von etwas geringerer elektrophoretischer Mobilität als $\text{TNF}\alpha$ nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.4, Spuren 2 und 5). Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass unabhängig von der Orientierung der Austausch der eigenen Spaltstellenregion gegen die des IL-6R in chimären nicht-spaltbaren $\text{proTNF}\alpha$ Proteinen resultierte, die allerdings korrekt gefaltet zur Zelloberfläche transportiert wurden.

3.2.2 IL-6R Chimären mit $\text{proTNF}\alpha$ Spaltstelle

$\text{ProTNF}\alpha$ Chimären, deren Spaltstellen gegen die des IL-6Rs ausgetauscht worden waren, wurden nicht von der Zellemembran gespalten. Daher war es von großem Interesse, die Spaltbarkeit von IL-6R Chimären zu untersuchen, deren Spaltstellenregion gegen die von $\text{proTNF}\alpha$ ausgetauscht worden waren.

Es wurden zwei IL-6R Chimären generiert, bei denen eine 12 Aminosäuren lange die Spaltstelle enthaltende Sequenz gegen entsprechende Peptide aus $\text{proTNF}\alpha$ ersetzt wurden. IL-6R ist ein Typ I Transmembranprotein (N-Terminus extrazellulär), während $\text{proTNF}\alpha$ vom Typ II ist (Abb. 3.6). Aus diesem Grund wurde das $\text{proTNF}\alpha$ Spaltpeptid in zwei Orientierungen in den IL-6R eingefügt. IL-6R/TN enthält die $\text{proTNF}\alpha$ Spaltstelle in derselben Orientierung wie in $\text{proTNF}\alpha$ selber, IL-6R/RTN in reverser Orientierung. Die generierten Chimären sind im Vergleich zu IL-6R und $\text{proTNF}\alpha$ schematisch in Abb. 3.6 dargestellt.

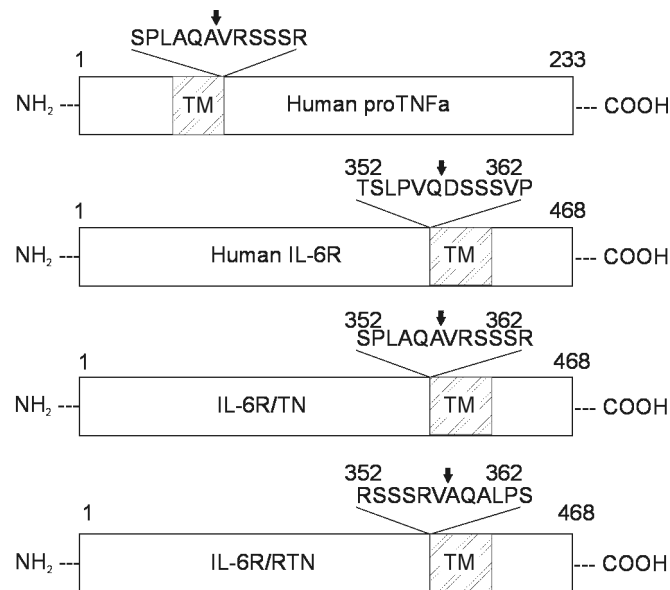


Abb. 3.6 Schematische Darstellung der IL-6R Chimären im Vergleich zu den Wildtypproteinen. Die Proteine sind als Balken dargestellt, mit der Transmembrandomäne (TM) als schraffierte Boxen. Die Spaltstellenregion ist im Einbuchstabencode oberhalb der Balken aufgetragen, die Spaltstelle selber ist durch einen Pfeil hervorgehoben. Da der IL-6R ein Transmembranprotein vom Typ I ist, liegt der C-Terminus im Cytoplasma; proTNF α ist ein Membranprotein vom Typ II, dessen C-Terminus intrazellulär liegt. Die 12 Aminosäuren lange Spaltstellenregion des IL-6R war gegen die gleich lange Spaltstellenregion von proTNF α ausgetauscht worden. IL-6R/TN enthält die proTNF α Spaltstellenregion in derselben Orientierung wie proTNF α , das beginnende Arginin liegt in beiden Fällen C-Terminal. IL-6R/RTN enthält die proTNF α Spaltstelle in umgedrehter Orientierung, das Arginin liegt N-Terminal.

3.2.2.1 Shedding der IL-6R Chimären

Um zu untersuchen, ob die generierten Chimären spaltbar wären, wurden COS-7 Zellen transient mit der cDNA der IL-6R Chimären bzw. des IL-6Rs transfiziert. Nachdem die Zellen zur besseren Detektion metabolisch markiert und mit oder ohne anschließender PMA-Stimulation inkubiert worden waren, wurden Zelllysate und Zellkulturüberstände genommen. Die folgende Präzipitation mit einem Antikörper gegen IL-6R ergab, dass sowohl der IL-6R als auch die Chimären in gleichem Maße exprimiert wurden. Beide Chimären wurden von der Zelloberfläche abgespalten und ins Medium freigesetzt (Abb. 3.7).

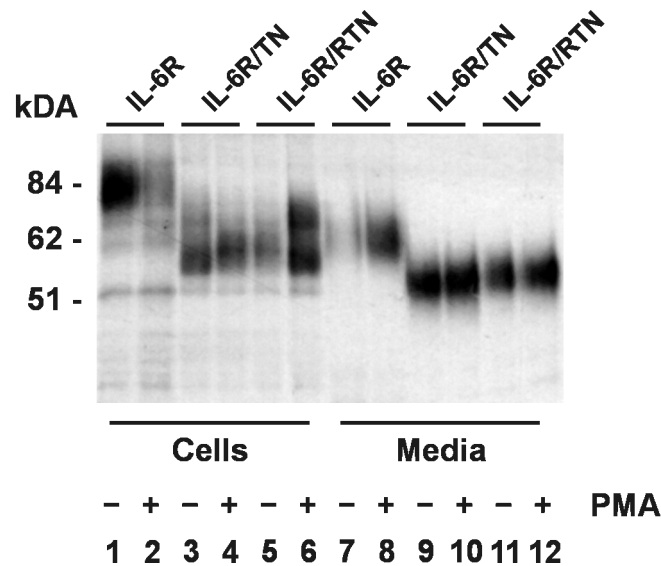


Abb. 3.7 Shedding des IL-6R und der IL-6R/proTNF α chimären Proteine. COS-7 Zellen wurden transient mit der cDNA von humanem IL-6R bzw. von IL-6R/TN und IL-6R/RTN transfiziert und mit 10^{-7} M PMA inkubiert, wie in der Abbildung dargestellt. Metabolische Markierung, gefolgt von Immunpräzipitation mit einem IL-6R spezifischen Antiserum wurden durchgeführt wie in der Legende zu Abb. 3.4 beschrieben.

Der IL-6R wurde in Abwesenheit von PMA kaum prozessiert. Es konnte nur wenig löslicher Rezeptor im Überstand nachgewiesen werden (Spuren 1 und 3). PMA Stimulation führte zu einer fast vollständigen Freisetzung löslichen IL-6Rs von der Zellmembran (Spuren 2 und 4). COS-7 Zellen, die mit IL-6R/TN bzw. IL-6R/RTN transfiziert worden waren, exprimierten Proteine mit geringerem Molekulargewicht als Zellen, die mit dem IL-6R transfiziert worden waren (Spuren 3 bis 6). Die Chimären wurden vergleichbar gut exprimiert wie der IL-6R. PMA Stimulation führte zu keiner signifikanten Reduktion von zellassozierten Proteinen (Spuren 4 und 6). Beide Chimären wurden spontan ins Medium freigesetzt und als 55 kDa große Proteine detektiert (Spuren 9 und 11). PMA Stimulation führte zu keinem weiteren Anstieg an löslichem Protein im Überstand (Spuren 10 und 12).

3.2.2.2 Deglykosylierung der Chimären und des IL-6R

Beide Chimären, IL-6R/TN und IL-6R/RTN, wiesen eine geringere elektrophoretische Mobilität als der Wildtyp IL-6R auf. Durch den Austausch der Spaltstellenregion gegen die von proTNF α war die membranproximale N-Glykosylierungsstelle (Asn₃₅₀Ala₃₅₁Thr₃₅₂) des IL-6Rs (122) verändert worden zu Thr532Ser in IL-6R/TN

bzw. zu Thr532Arg in IL-6R/RTN. Da die Konsensussequenz für eine potentielle N-Glykosylierungsstelle Asn-Ala-Thr/Ser ist, war durch diese Veränderung die Glykosylierungsstelle in IL-6R/RTN zerstört worden. In IL-6R/TN hatte sich hierdurch allerdings eine neue potentielle N-Glykosylierungsstelle gebildet (Asn₃₅₀Ala₃₅₁Ser₃₅₂). Um eventuelle Veränderungen in der Glykosylierung zu untersuchen, wurden der lösliche IL-6R und die löslichen Formen beider Chimären mit N-Glykosidase-F (PNGaseF) behandelt und die N-verknüpfte Oligosaccharidseitenketten entfernt. Inkubation des IL-6Rs und der Chimären mit PNGaseF führte in allen drei Fällen zu einem Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa (Abb. 3.8, Spuren 4-6).

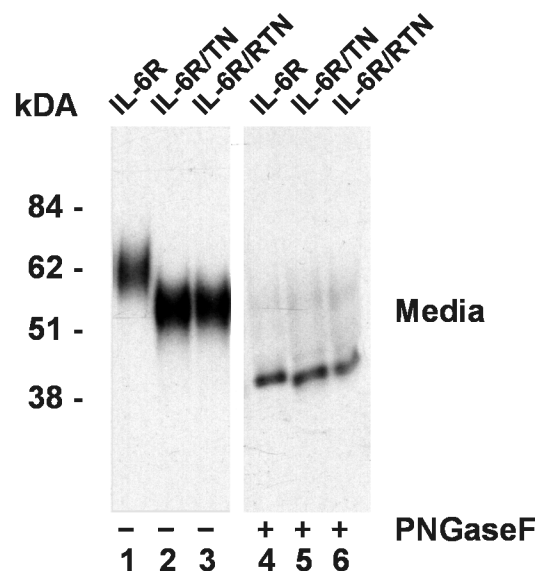


Abb. 3.8 Deglycosylierung des IL-6R und der Chimären. COS-7 Zellen wurden transient mit der cDNA von IL-6R bzw. von IL-6R/TN und IL-6R/RTN transfiziert. Die metabolisch markierten Überstände wurden mit einem IL-6R spezifischen Antiserum immunpräzipitiert und daraufhin mit PNGaseF inkubiert wie in der Abbildung dargestellt.

Hieraus kann man zum einen schließen, dass auch die Chimären Glykosylierungen aufwiesen, die nach der Behandlung mit PNGaseF entfernt worden waren. Allerdings wiesen sie eine N-verknüpfte Oligosaccharidseitenkette weniger auf als der IL-6R, denn erst nach Entfernung aller N-verknüpften Glykosylierungen waren die Chimären ebenso groß wie der deglykosylierte IL-6R. Da die Chimären nur im Bereich der membranproximalen N-Glykosylierungsstelle verschieden zu dem IL-6R waren, kann angenommen werden, dass die Chimären im Gegensatz zum IL-6R (122) diese Gly-

kosylierungsstelle nicht nutzen konnten. Dies erklärt ihre gesteigerte elektrophoretische Mobilität, die im vorangegangenen Versuch aufgefallen war.

3.2.2.3 Spontane Spaltung der IL-6R Chimären in TACE^{-/-} Fibroblasten

Da beide IL-6R Chimären PMA-unabhängig aus COS-7 Zellen gespalten worden waren, sollte im folgenden herausgefunden werden, ob TACE eine Rolle bei diesem Prozess spielt. Aus diesem Grund wurden TACE^{-/-} Fibroblasten, die über kein funktionelles TACE verfügen, transient mit IL-6R/TN und IL-6R/RTN transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere zwei Stunden in An- oder Abwesenheit von PMA und TAPI inkubiert, woraufhin die Zellüberstände sowie Lysate abgenommen wurden. In einem IL-6R ELISA wurden im folgenden die Mengen an den Chimären gemessen.

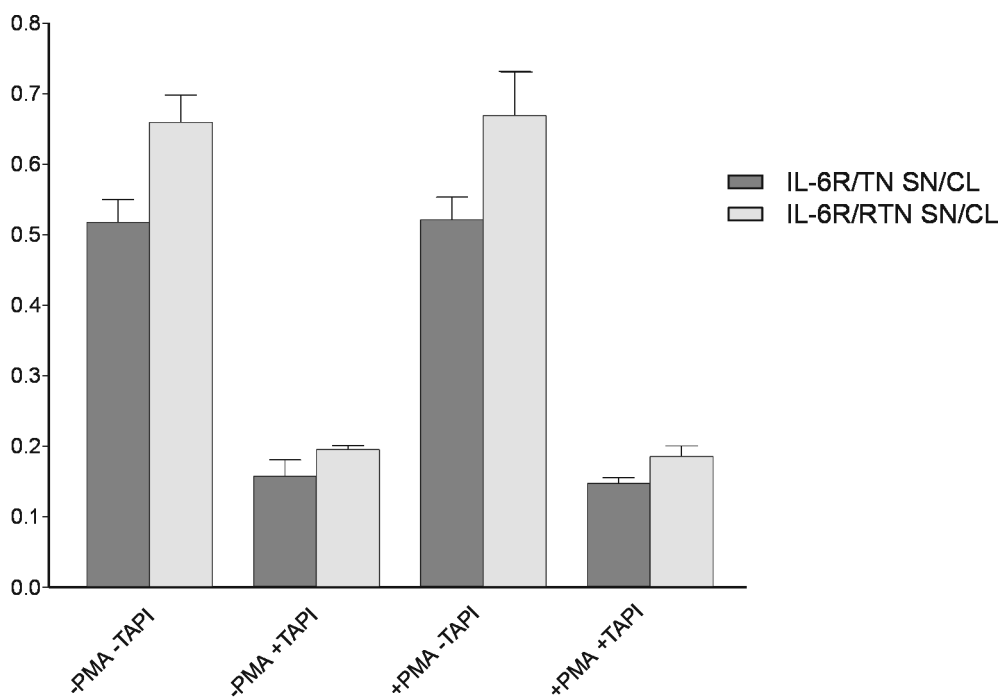


Abb. 3.9 TACE ist nicht an der Spaltung der Chimären beteiligt. TACE^{-/-} Fibroblasten wurden transient mit der cDNA von IL-6R/TN bzw. IL-6R/RTN transfiziert und im folgenden mit 200 μ M TAPI bzw. 10^{-7} M PMA behandelt. Die Menge an IL-6R in den Zelllysaten und Überständen wurden mit einem spezifischen IL-6R ELISA ermittelt. Dargestellt sind jeweils die Quotienten aus Überstand und Lysat; die Daten sind Durchschnittswerte +/- Standardabweichung aus Dreifachmessungen.

Das Verhältnis der Mengen an IL-6R aus Überstand zu Zellysat ist für beide Chimären in Abb. 3.9 dargestellt. Ebenso wie in COS-7 Zellen wurden beide chimären Proteine spontan von der Zellmembran freigesetzt. Die Stimulation mit PMA führte zu keiner gesteigerten Prozessierung der Chimären. Hieraus kann geschlossen werden, dass TACE keine Rolle in der Prozessierung der Chimären spielt. Da allerdings der Metalloproteaseinhibitor TAPI zu einer signifikanten Abnahme an löslichen IL-6R Chimären in den Überständen führte, kann ebenfalls angenommen werden, dass „TACE-ähnliche“ Metalloproteasen an der Spaltung der IL-6R Chimären beteiligt waren, die jedoch unsensitiv gegenüber PMA waren. Da TAPI die Spaltung nicht völlig inhibierte, sondern nur um etwa den Faktor 3 verminderte, kann ebenfalls gefolgert werden, dass weitere Nicht-Metalloproteasen an diesem Shedding beteiligt sind.

3.3 Membrannahe Sequenzen als Determinanten für proteolytische Spaltung

3.3.1 Chimären aus gp130 mit Spaltstellen verschiedener Proteine

Vor einiger Zeit konnte gezeigt werden, dass das Einfügen eines 14 Aminosäuren langen Peptids von APP bzw. proTGF α in die membrannahe Region von Betaglykan die Spaltbarkeit dieses sonst nur wenig spaltbaren Proteins bewirkt (8). Betaglykan (Typ III TGF β Rezeptor) ist ein membranverankertes Proteoglykan (kohlenhydratreiches Glykoprotein der extrazellulären Matrix), das an den Wachstumsfaktor TGF β bindet und die Interaktion mit seinen signaltransduzierenden Rezeptoren erleichtert (103). Um zu untersuchen, ob diese Spaltbarkeit an dem Testprotein Betaglykan lag oder ob diese Übertragung nur mit den Spaltstellen von APP und proTGF α möglich war, wurden im folgenden weitere Proteinchimären hergestellt. Hierbei wurde als Ausgangsprotein gp130 gewählt, da dieses Protein in Vergleich zu Betaglykan in noch geringerem Maße von der Zellmembran gespalten wird (120). Ebenso wie bei Betaglykan geschieht diese Spaltung nicht PMA-induziert. Im Gegensatz zu spaltbaren Proteinen enthält gp130 keinen Stiel zwischen Membran und membranproximaler Domäne, die unmittelbar im Anschluss an die Membran anschließt. 12 Aminosäuren lange Spaltstellenpeptide von proTGF α , proTNF α und IL-6R wurden im Aus-

tausch gegen sieben Aminosäuren in gp130 in unmittelbare Nähe zur Membran ausgetauscht.

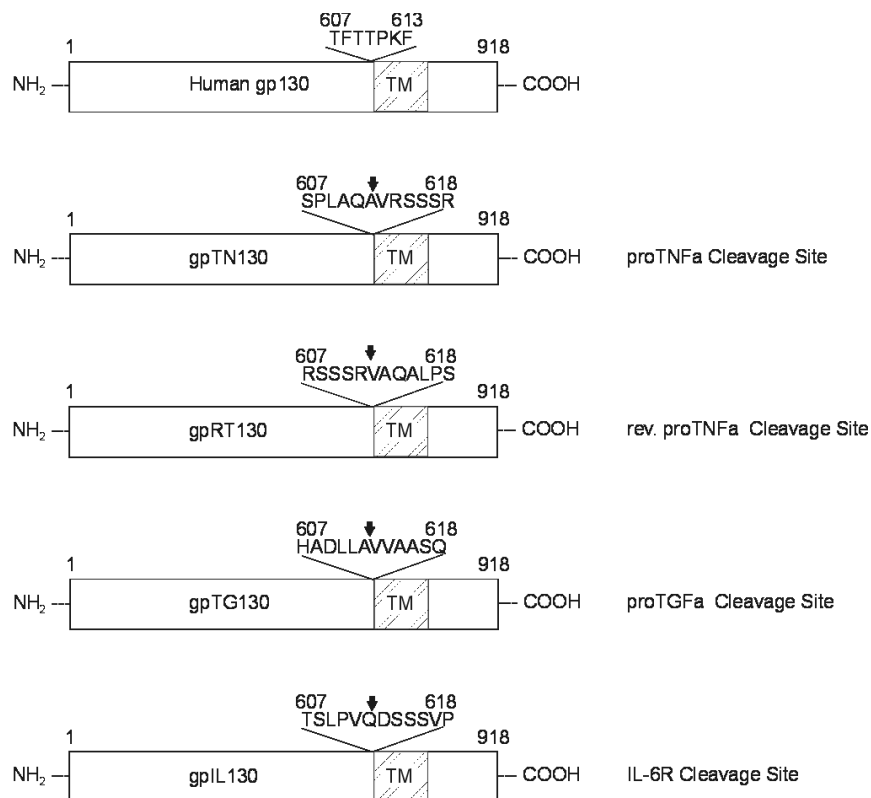


Abb. 3.10 Schematische Darstellung der gp130 Chimären. Die Proteine sind als Balken dargestellt, mit der Transmembrandomäne (TM) als schraffierte Boxen. 12 Aminosäuren lange Spaltstellenpeptide, im Einbuchstabencode dargestellt, aus proTNF α , proTGF α und IL-6R wurden in die membranproximale Region von gp130 eingesetzt. Die Spaltstellen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Es wurden mehrere verschiedene chimäre Proteine hergestellt, um zu untersuchen, ob sich die Spaltbarkeit auf gp130 übertragen ließe. Abb. 3.10 veranschaulicht den Austausch von 7 Aminosäuren aus der membranproximalen Region von gp130 (Thr₆₀₇ bis Gln₆₁₅) gegen die 12 Aminosäuren langen Spaltstellenregionen von proTNF α , proTGF α und IL-6R. Ebenso wie gp130 sind proTGF α und IL-6R Typ I Transmembranproteine, d. h. ihr N-Terminus befindet sich extrazellulär. proTNF α ist ein Membranprotein vom Typ II mit reverser Orientierung. Aus diesem Grund wurde das Spaltstellenpeptid aus proTNF α in zwei Orientierungen in gp130 eingesetzt. gpTN130 enthält die proTNF α Spaltstelle in der ursprünglichen Orientierung, während gpRT130 die Aminosäuren der Spaltregion in umgedrehter Reihenfolge auf-

weist. Das Spaltstellenpeptid aus proTGF α ist in gpTG130 enthalten und gpIL130 beinhaltet 12 Codons der IL-6R Spaltstelle.

3.3.1.1 PMA-induzierte Spaltung der generierten Chimären

Im folgenden wurde untersucht, ob die generierten chimären Proteine als Substrat für die Sheddingmaschinerie dienen, ob sie folglich PMA-induziert von der Zellmembran abgespalten werden. Hierzu wurden COS-7 Zellen mit gp130 bzw. den Chimären transient transfiziert, metabolisch markiert und für zwei Stunden mit oder ohne 10^{-7} M PMA inkubiert. Zelllysate und Überstände wurden mit einem Antikörper gegen gp130 präzipitiert und nach SDS-PAGE mittels Fluorographie analysiert.

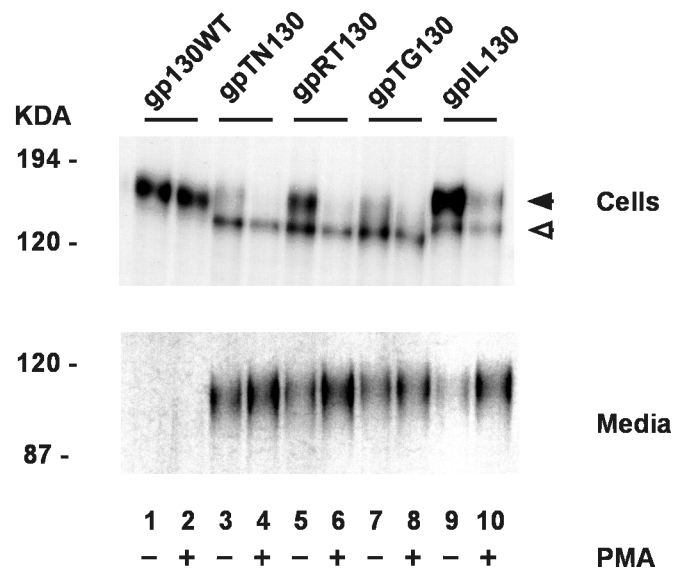


Abb. 3.11 Shedding der gp130 Spaltstellenpeptide. COS-7 Zellen wurden transient mit der cDNA von humanem gp130 bzw. der generierten gp130 Chimären transfiziert und mit 50 μ Ci Tran 35 S]Label für zwei Stunden metabolisch markiert. Daraufhin wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von 10^{-7} M PMA inkubiert. gp130 Proteine wurden aus Zelllysaten und Überständen immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE mit nachfolgender Fluorographie analysiert.

Abb. 3.11 zeigt, dass gp130 von den COS-7 Zellen exprimiert wurde. Eine Bande von etwa 130 kDa ist im Zelllysate nachweisbar (Spuren 1 und 2). PMA hat keinen

Einfluss auf die Spaltung von gp130 (Spur 2): es konnte kein lösliches Protein in den Überständen detektiert werden. Ganz anders verhielt es sich mit den chimären Proteinen. Die Chimären wurden als Doppelbande in den Zelllysaten detektiert. Zusätzlich zu der Bande bei 130 kDa (schwarze Pfeilspitze) wurde eine weitere Bande bei etwa 120 kDa nachgewiesen (weiße Pfeilspitze). Alle Chimären waren als lösliche Proteine in den Zellkulturüberständen nachzuweisen (Spuren 3 bis 10), allerdings wiesen sie unterschiedliche Charakteristika bezüglich der Induktion der Spaltung auf. Die Chimäre gpTN130 (Spuren 3 und 4) wurde auch ohne PMA nur schwach auf der Zellmembran exprimiert, der Großteil des Proteins befand sich bereits als lösliches Protein im Überstand (Spur 3). Nach der Stimulation mit PMA konnte kein Protein mehr in den Zelllysaten nachgewiesen werden; stattdessen hatte sich das Signal in den Überständen etwa um den Faktor 2 verstärkt. Im Gegensatz dazu wurde gpRT130 in wesentlich geringerem Maße spontan gespalten (Spur 5). Ohne Stimulation mit PMA wurde ein Großteil der Proteine auf der Zellmembran exprimiert. Nur wenig lösliches gpRT130 war im Überstand nachweisbar. Stimulation mit PMA (Spur 6) resultierte in vollständigem Shedding der Chimäre. Es waren keine gpRT130 Proteine mehr im Zelllysate nachweisbar. Die Menge an löslichem gpRT130 nahm etwa um den Faktor 10 zu. Die Expression von gpTG130 (Spuren 7 und 8) war ähnlich wie die von gpTN130. Bereits ohne PMA-Stimulation wurde ein großer Anteil der Proteine von der Zellmembran abgespalten. Dieses spontane Shedding wurde weiter durch die Gabe von PMA verstärkt, die Menge an löslichem gpTG130 nahm etwa um den Faktor 2 zu. Die Expression von gpIL130 war gut, und das Protein wurde kaum spontan von der Zellmembran freigesetzt (Spur 9). Eine Induktion mit PMA führte zu einer fast vollständigen Freisetzung von löslichem gpIL130 in den Überstand (Spur 10). Diese Ergebnisse zeigen, dass allein das Einsetzen der Spaltstellenregionen verschiedener Proteine dazu führt, dass ein dem Shedding nicht zugängliches Protein spaltbar wird. Zusätzlich zeigte sich, dass die Spaltstellen verschiedener Proteine unterschiedliche Spalteigenschaften auf gp130 übertrugen, da die einzelnen Chimären unterschiedlich stark spontan gesheddet worden waren.

3.3.1.2 Zelloberflächenexpression der chimären Proteine

Da durch metabolische Markierung nicht nur Proteine der Zelloberfläche markiert werden, sondern unter anderem auch Vorstufen von Proteinen, die sich z. B. noch im endoplasmatischen Retikulum (ER) oder Golgi-Apparat befinden, wurde im folgen-

den untersucht, ob die Chimären an die Zelloberfläche transportiert wurden. Zu diesem Zweck wurden die Oberflächenproteine von COS-7 Zellen biotinyliert, die zuvor mit gp130 bzw. den Chimären transient transfiziert worden waren. Der verwendete Biotinester ist nicht in der Lage, die Zellmembran zu durchdringen. Folglich wurden nur Proteine, die sich auf der Zelloberfläche befanden, biotinyliert. Die Zellen wurden daraufhin lysiert und mit einem Antikörper gegen gp130 präzipitiert.

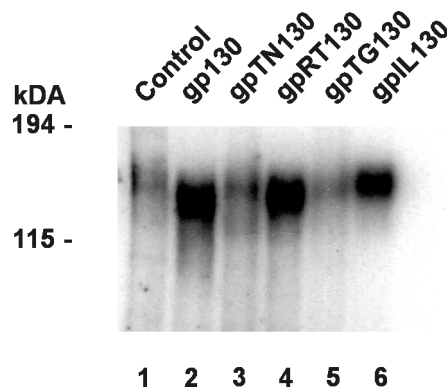


Abb. 3.12 gp130 Chimären werden auf der Zelloberfläche exprimiert. gp130 und die generierten Chimären wurden in transient transfizierten COS-7 Zellen exprimiert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit einem Biotinester, der die Zellmembran nicht durchdringen kann, inkubiert. Die Proteine wurden aus den Zelllysaten immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE mit nachfolgendem Western Blot analysiert, bei dem an Streptavidin gekoppelte Peroxidase als Substrat verwendet wurde.

Abb. 3.12 zeigt, dass untransfizierte COS-7 Zellen nur wenig gp130 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Spur 1). In die Zellen transfizierte cDNA von gp130 wurde auf der Zellmembran gut exprimiert, wie Spur 2 zeigt. Das gleiche ließ sich für gpRT130 (Spur 4) und gpIL130 (Spur 6) nachweisen. gpTN130 (Spur 3) und gpTG130 (Spur 5) wurden nur sehr schwach auf der Zelloberfläche exprimiert. Die hier dargestellten Ergebnisse bestätigen die zuvor aus den Spaltversuchen erhaltenen Resultate. gpTN130 und gpTG130 zeigten ein starkes spontanes Shedding; die Proteine wurden, sobald sie auf der Zelloberfläche exprimiert worden waren, proteolytisch gespalten und in das Zellmedium abgegeben, so dass nur ein schwaches Signal in den Zelllysaten detektierbar war. Insofern überrascht es nicht, dass diese Proteine nach Oberflächenbiotinylierung nur schwach nachgewiesen werden konnten.

In den metabolisch markierten Zelllysaten waren die chimären Proteine als Doppelbande detektiert worden. Nach der Oberflächenbiotinylierung war nur noch die obere der beiden Banden nachweisbar, was bedeutet, dass die untere Bande einem Vorläuferprotein entsprach, das die Zellmembran noch nicht erreicht hatte. Dass diese Doppelbande nur bei den chimären Proteinen nicht jedoch bei gp130 auftauchte, lässt vermuten, dass ein Teil der Chimären die Zelloberfläche nicht erreicht, da er möglicherweise nicht korrekt gefaltet werden konnte.

3.3.1.3 Signaltransduktion der chimären Proteine

Im folgenden sollte geklärt werden, ob die generierten Chimären noch in der Lage sind, an der Signaltransduktionskaskade teilzuhaben, die nach Stimulation mit IL-6 abläuft.

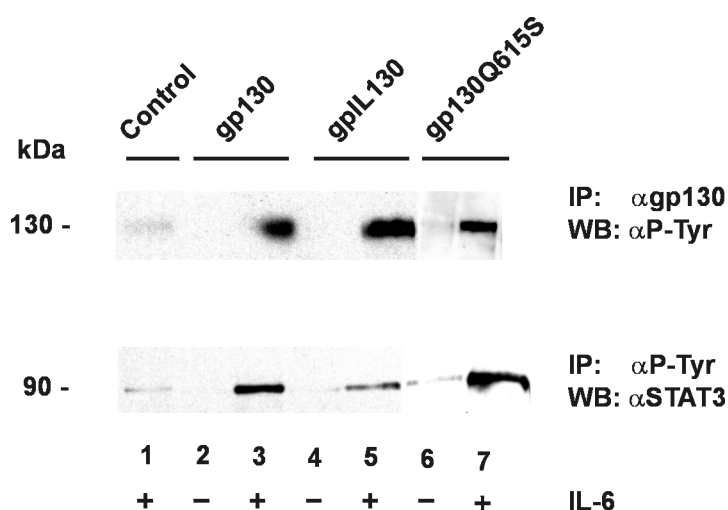


Abb. 3.13 Rekonstitution des IL-6R/gp130/STAT3 Signalsystems in COS-7 Zellen. Die Tyrosinphosphorylierung von gp130 bzw. den Chimären und STAT3 wurde nach Transfektion der humanen cDNA von IL-6R, STAT3 und gp130 bzw. den Chimären untersucht, nachdem die Zellen mit 50 ng/ml IL-6 stimuliert worden waren. Oberes Teilbild, Tyrosin Phosphorylierung von gp130. Unteres Teilbild, Tyrosin Phosphorylierung von STAT3.

Es sollte damit ausgeschlossen werden, dass die Proteine nur gespalten wurden, weil ihre strukturelle Integrität durch das Einfügen der Spaltstellensequenzen zerstört worden war. Wie bereits von Kallen et al. beschrieben worden war (86), wurde, um

diese These zu untersuchen, in COS-7 Zellen die zelluläre Antwort auf IL-6 durch die transiente Transfektion der cDNAs von IL-6R, STAT3 und gp130 bzw. den Spaltstellenchimären wiederhergestellt (vgl. 1.2). Nach einer Stimulation mit dem Zytokin wurde die Tyrosinphosphorylierung von gp130 bzw. den chimären Proteinen sowie von STAT3 untersucht. Aktiviertes, dimerisiertes gp130 führt zur Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT3, das dimerisiert, in den Nukleus transloziert und als Transkriptionsfaktor wirkt.

Abb. 3.13 zeigt, dass nicht transfizierte COS-7 Zellen auf eine Stimulation mit IL-6 mit einer nur sehr schwachen Phosphorylierung von endogenem gp130 reagierten. Es kam zu einer geringen STAT3 Phosphorylierung (Spur 1). In mit gp130/IL-6R/STAT3 transfizierten Zellen bewirkt eine Stimulation mit IL-6 eine Phosphorylierung von gp130 sowie von STAT3 (Spuren 2 und 3) und damit die charakteristische Signalkaskade. Transfektion mit den chimären Proteinen führte nach Stimulation mit IL-6 ebenfalls zu einer Phosphorylierung der chimären Proteine ebenso wie von STAT3 (Spuren 4 bis 11). Die intakte Signalweiterleitung beweist die strukturelle Integrität und Funktionalität der chimären Proteine. Es lässt sich schlussfolgern, dass die Chimären allein durch die eingefügten Spaltstellenpeptide spaltbar wurden.

3.3.2 Keine Übertragung von Spaltbarkeit durch Punktmutation

Bei der Klonierung der bisher untersuchten Chimären wurde strategiebedingt eine Punktmutation Q615S in unmittelbarer Nähe zu der Membran eingefügt.

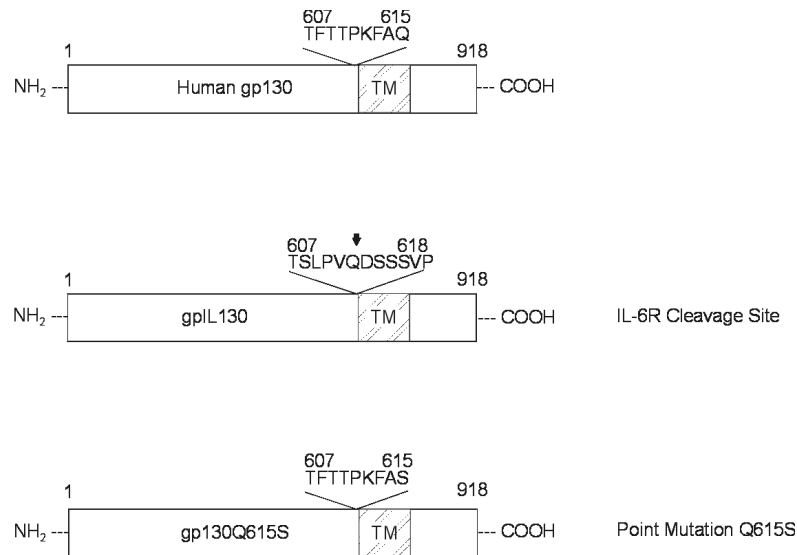


Abb. 3.14 Schematische Darstellung der Mutante gp130Q615S. Die Proteine sind durch Balken dargestellt, mit der Transmembrandomäne (TM) als schraffierter Box; die Aminosäuren der membranproximalen Regionen sind im Einbuchstabencode wiedergegeben. Die Spaltstelle von gpIL130 ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet.

Um auszuschließen, dass alleine diese Mutation bereits zu der Übertragung der Spaltbarkeit geführt hatte, wurde diese Chimäre zur Kontrolle analysiert.

Abb. 3.14 veranschaulicht den Unterschied der Mutante gp130Q615S zu gp130 bzw. gpIL130.

3.3.2.1 Keine Spaltbarkeit durch Punktmutation

Um auszuschließen, dass gp130 bereits durch diese Mutation in ein spaltbares Protein verwandelt worden war, wurde diese Mutante transient in COS-7 Zellen transfiziert, diese metabolisch markiert und die Zellen mit oder ohne PMA inkubiert.

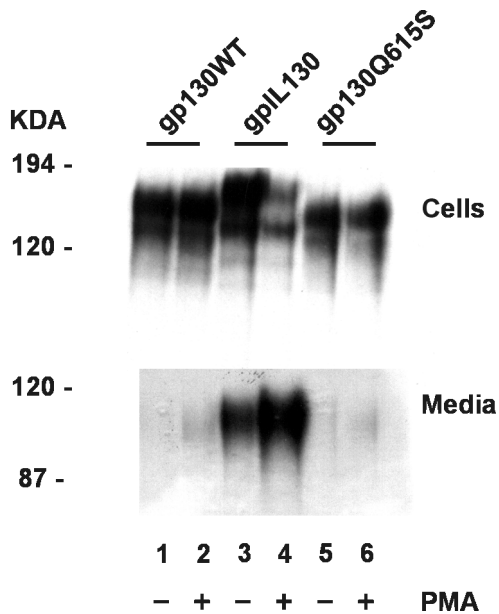


Abb. 3.15 gp130Q615S ist nicht spaltbar. COS-7 Zellen wurden transient mit der cDNA von gp130 bzw. der generierten gp130 Chimären transfiziert und mit 50 μCi Tran ^{35}S]Label für zwei Stunden metabolisch markiert. Daraufhin wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von 10^{-7} M PMA inkubiert. gp130 Proteine wurden aus Zelllysaten und Überständen immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE mit nachfolgender Fluorographie analysiert.

Abb. 3.15 zeigt, dass gp130 nicht von der Zellmembran gespalten wurde (Spuren 1 und 2). Die Chimäre gpIL130 wurde spontan und wesentlich stärker PMA induziert prozessiert (Spuren 3 und 4). gp130Q615S wurde ebenso wie gp130 nicht von der Zellmembran abgespalten (Spuren 5 und 6). Es zeigte ein vergleichbares Expressionsmuster wie gp130. Hieraus kann geschlossen werden, dass die eingefügte Punktmutation zu einem Protein führte, dass in dem durchgeführten Experiment keinen Unterschied zu gp130 zeigte. Folglich war die Spaltbarkeit der zuvor untersuchten Chimären nicht durch die Punktmutation herbeigeführt worden.

3.3.2.2 Signaltransduktion der Mutante

Im folgenden wurde untersucht, ob die Mutante gp130Q615S ebenso wie gp130 in der Lage ist, nach IL-6 Stimulation ein Signal zu transduzieren.

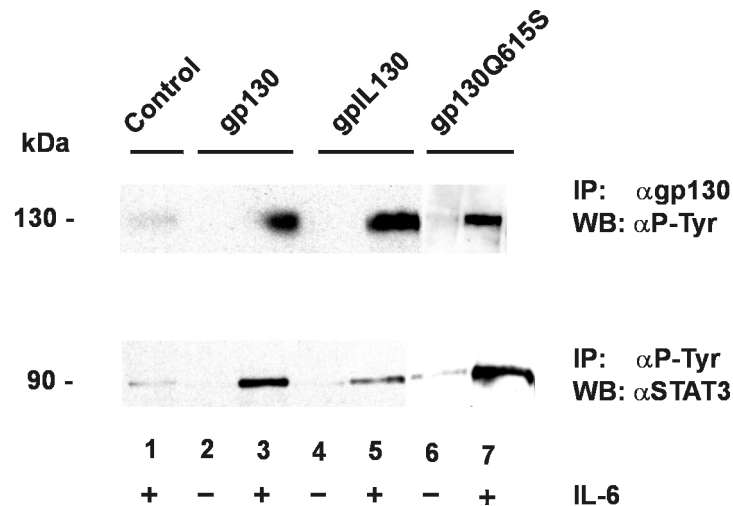


Abb. 3.16 Rekonstitution des IL-6R/gp130/STAT3 Signalsystems in COS-7 Zellen. Die Tyrosinphosphorylierung von gp130 bzw. den Chimären und STAT3 wurde nach Transfektion der humanen cDNA von IL-6R, STAT3 und gp130 bzw. den Chimären untersucht, nachdem die Zellen mit 50 ng/ml IL-6 stimuliert worden waren. Oberes Teilbild, Tyrosin Phosphorylierung von gp130. Unteres Teilbild, Tyrosin Phosphorylierung von STAT3.

Es zeigte sich (Abb. 3.16) dass, nachdem COS-7 Zellen mit IL-6R, STAT3 und gp130Q615S transfiziert worden waren, diese Mutante ebenso wie STAT3 nach IL-6 Stimulation phosphoryliert wurde (Spuren 6 und 7). Im Vergleich sind Ergebnisse aus COS-7 Zellen, die statt mit gp130Q615S mit gp130 bzw. gpIL130 transfiziert worden waren, dargestellt (Spuren 2 bis 5). Als Negativkontrolle dienten untransfizierte Zellen (Spur 1).

3.3.3 Spaltbarkeit durch eingeeengte Spaltstellenpeptide

Die bisher beschriebenen Ergebnisse belegten, dass das Einfügen von Spaltstellenpeptiden in die membrannahere Region von gp130 dazu führte, dass die Proteine ins Medium freigesetzt wurden. In früheren Arbeiten (46) war gezeigt worden, dass die Spaltregion eine postulierte Länge von 11 Aminosäuren nicht unterschreiten darf, damit die Spaltstelle für die beteiligte Protease zugänglich ist. Aus diesem Grund waren ursprünglich 12 Aminosäuren lange Spaltpeptide gewählt worden, die alle Spaltbarkeit vermittelt hatten. Um der Frage weiter nachzugehen, wie lang die Spaltpeptide tatsächlich sein müssen und um herauszufinden, ob das Vorhandensein der ei-

gentlichen Spaltstelle zur Übertragung von Spaltbarkeit zwingend notwendig ist, wurden vier weitere Chimären hergestellt, die verkürzte IL-6R Spaltpeptide enthielten.

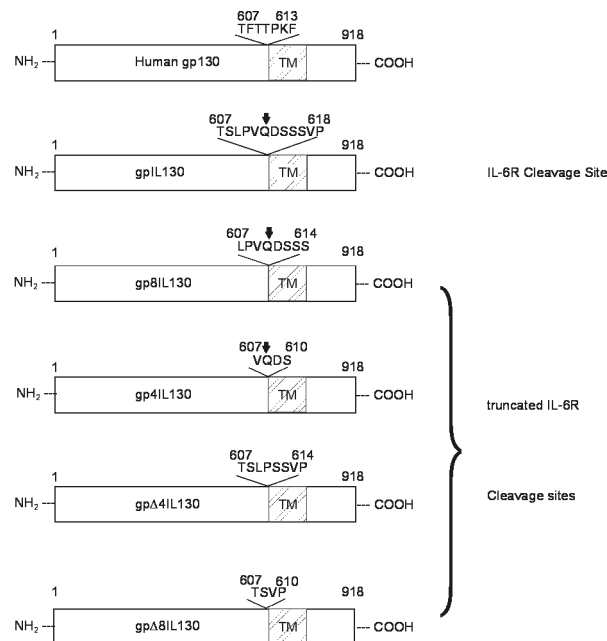


Abb. 3.17 Schematische Darstellung der verkürzten Spaltstellenpeptide enthaltenen gp130 Chimären. Die Proteine sind als Balken dargestellt, die Transmembranregionen (TM) als schattierte Boxen. Die eingesetzten Peptide sind im Einbuchstabencode dargestellt, die Spaltstellen durch Pfeile.

Abb. 3.17 zeigt eine schematische Darstellung der generierten Chimären im Vergleich zu gp130 und gpIL130. Zwei enthalten noch die eigentliche IL-6R Spaltstelle $\text{Gln}_{612}\text{Asp}_{613}$ (122), die mit Pfeilen dargestellt ist. Zwei weitere Chimären enthalten allerdings nur Aminosäuren aus der unmittelbaren Umgebung der Spaltstelle. gp8IL130 enthält ein acht Aminosäuren langes Spaltstellenpeptid anstelle des ursprünglich 12 Aminosäuren langen Peptids in gpIL130. Eine weitere Verkürzung führte zu gp4IL130, in der das IL-6R Spaltstellenpeptid nur noch vier Aminosäuren lang ist. Gp Δ 4IL130 enthält ein acht Aminosäuren langes Peptid aus der IL-6R Spaltstellenregion. Die vier zentralen Aminosäuren, die die eigentliche Spaltstelle umgeben ($\text{Val}_{611}\text{Gln}_{612}\text{Asp}_{613}\text{Ser}_{614}$), waren herausgenommen worden. Dem IL-6R Peptid, das in gp Δ 8IL130 eingefügt worden war, fehlten die acht zentralen die Spaltstelle enthaltenden Aminosäuren; es besteht aus den vier Aminosäuren, die das ursprünglich 12 Aminosäuren lange Peptid flankierten ($\text{Thr}_{607}\text{Ser}_{608}\text{Val}_{617}\text{Pro}_{618}$).

3.3.3.1 PMA-induzierte Spaltung der Chimären

Im folgenden wurde untersucht, ob sich die gp130 Chimären, die verkürzte IL-6R Spaltstellenpeptide enthalten, von der Zellmembran abspalten lassen. Nach den bisherigen Modellvorstellungen wurde erwartet, dass zumindest die Chimären den vier Aminosäuren langen Spaltstellenpeptiden (gp4IL130 und gp Δ 8IL130) nicht spaltbar wären. Mit diesen Chimären transfizierte und metabolisch markierte COS-7 Zellen wurden zur Induktion von Shedding mit oder ohne PMA inkubiert. Mit einem anti-gp130 Antikörper präzipitierte Zelllysate und Überstände sind in Abb. 3.18 dargestellt.

Spuren 1 und 2 zeigen gp130, das nur in den Zelllysaten nachweisbar war, nicht jedoch im Überstand. Die Proteinchimäre gpIL130 (Spuren 3 und 4) diente als Positivkontrolle; es wurde PMA induziert von der Zellmembran abgespalten (Spuren 3 und 4).

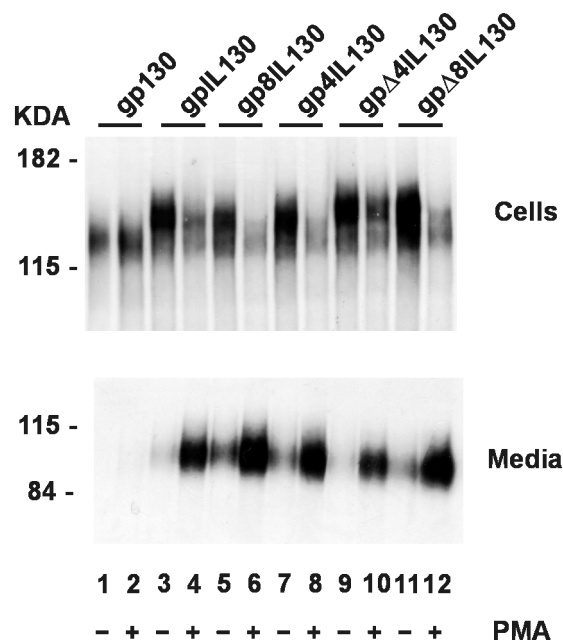


Abb. 3.18 Shedding der Chimären. COS-7 Zellen wurden transient mit den Chimären und gp130 transfiziert und im folgenden für zwei Stunden metabolisch mit 50 μ Ci Tran[35 S]Label markiert. Nach einer einstündigen Inkubation in An- oder Abwesenheit von 10^{-7} M PMA wurden Zelllysate und Überstände immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE und Fluorographie analysiert.

Alle vier Chimären ließen sich gut exprimieren (Spuren 5, 7, 9, 11) und zeigten ähnliche Expressionsmuster. Alle chimären Proteine waren als Doppelbande nachweis-

bar, von der die untere vermutlich einem Vorläufer entsprach, der die Zellmembran noch nicht erreicht hatte. Diese Vorläuferbande ist bei allen Chimären außer bei gp Δ 8IL130 wesentlich schwächer als die obere Bande. Im Falle von gp Δ 8IL130 (Spur 11) sind beide Banden gleich stark, was darauf hindeutet, dass von diesem Konstrukt mehr Proteine die Zelloberfläche nicht erreichten, sondern eventuell im Golgi-Apparat oder im ER zurückgehalten wurden, weil sie nicht korrekt gefaltet wurden. Ähnlich wie bei gpIL130 kam es in allen vier Fällen zu einem geringen spontanen Shedding (Spuren 5, 7, 9, 11). In allen Fällen führte PMA, wie auch bei gpIL130 zu einer fast vollständigen Abspaltung der chimären Proteine von der Zellmembran (Spuren 6, 8, 10, 12).

3.3.3.2 Signaltransduktion der Chimären

Zur Überprüfung, ob auch diese Chimären strukturell intakt und zur Signaltransduktion fähig sind, wurden COS-7 Zellen transient mit IL-6R, STAT3 und gp130 bzw. den Chimären transfiziert, um die zelluläre Antwort auf eine Stimulation mit IL-6 herzustellen, wie in Abb. 3.19 gezeigt.

Alle untersuchten Chimären wurden nach IL-6 Stimulation phosphoryliert und bewirkten die Phosphorylierung von STAT3. Auch gp Δ 8IL130 wurde nach IL-6 Stimulation phosphoryliert, allerdings schwächer als die anderen Chimären. Möglicherweise faltet sich diese Chimäre nicht ganz genauso wie gp130, so dass die Homodimerisierung mit einem anderen Protein gp Δ 8IL130 nicht mehr so gut möglich ist. Dennoch war diese Chimäre in der Lage, ein Signal zu transduzieren, da auch STAT3 phosphoryliert wurde.

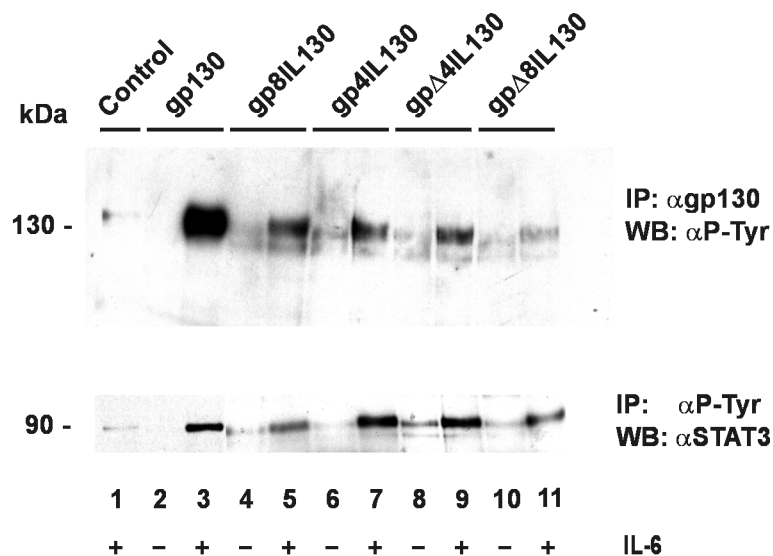


Abb. 3.19 Rekonstitution des IL-6R/gp130/STAT3 Signalsystems in COS-7 Zellen. Die Tyrosinphosphorylierung von gp130 bzw. den Chimären und STAT3 wurde nach Transfektion der humanen cDNA von IL-6R, STAT3 und gp130 bzw. den Chimären untersucht, nachdem die Zellen mit 50 ng/ml IL-6 stimuliert worden waren. Oberes Teilbild, Tyrosin Phosphorylierung von gp130. Unteres Teilbild, Tyrosin Phosphorylierung von STAT3.

3.3.4 Spaltbarkeit von gp130 durch LIFR Peptide

Die vorangegangenen Experimente hatten gezeigt, dass gp130 durch das Einfügen von Spaltstellenpeptiden ebenso spaltbar gemacht wurde wie durch verkürzte Spaltstellenpeptide, bei denen die eigentliche Spaltstelle fehlte. An diesem Punkt kann vermutet werden, dass das Einsetzen einer beliebigen Peptidsequenz in gp130 zu einem spaltbaren Protein führt. Dies mag durch Veränderungen in der 3D-Struktur der membranproximalen Domäne herbeigeführt werden. Aus diesem Grund wurden äquivalente Peptide des verwandten Proteins „Leukaemia Inhibitory Factor“ (LIF) Rezeptors eingesetzt. LIFR ist ein Transmembranprotein, das nicht proteolytisch von der Zellmembran gespalten wird [Kallen et al., nicht veröffentlichte Beobachtungen]. In Körperflüssigkeiten nachgewiesener löslicher LIFR wird durch alternatives Spleißen generiert (131). LIFR und gp130 sind sich strukturell sehr ähnlich: Ebenso wie bei gp130 ist die membranproximale Fibronectin III Domäne aus sieben β -Faltblättern aufgebaut. Es wurde daher angenommen, dass der Austausch des gesamten ersten β -Faltblatts von gp130 gegen das des LIFRs zu keinen großen strukturellen Veränderungen führen würde.

Daraufhin wurden chimäre Proteine generiert, bei denen die membranproximalen sieben Aminosäuren von gp130 (TFTTPKF) gegen die korrespondierenden sieben (SMYVVTKE; gpSLIFR130) bzw. neun (SMYVVTKEN; gpLLIFR130) Aminosäuren langen Peptide aus dem LIFR ersetzt wurden (Abb. 5.20). Wenn die Spaltbarkeitsübertragung in den vorangegangenen Fällen durch eine Veränderung in der 3D-Struktur herbeigeführt worden war, dann sollten die hier generierten Chimären unspaltbar sein.

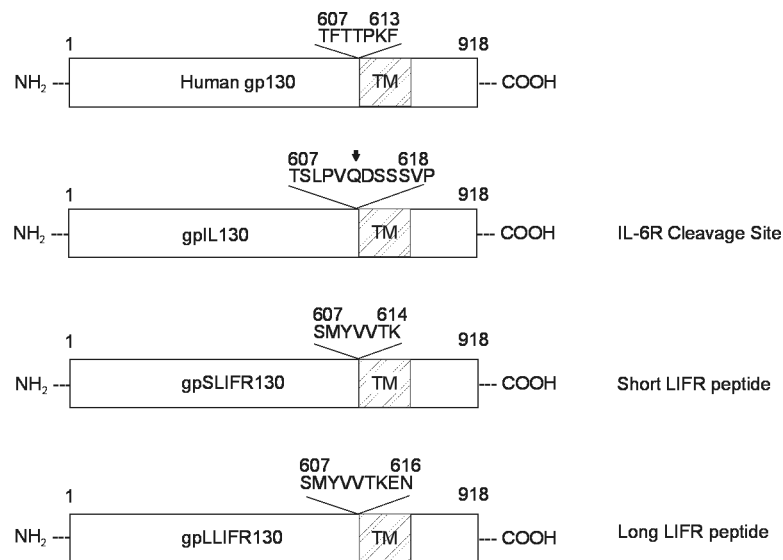


Abb. 3.20 Schematische Darstellung der Chimären. Die Proteine sind als Balken dargestellt, die Transmembranregionen als schattierte Boxen. Die eingesetzten Peptide sind im Einbuchstabencode dargestellt, die Spaltstelle des IL-6R durch Pfeile.

3.3.4.1 Spaltung von LIFR Peptid-Chimären

COS-7 Zellen wurden transient mit gp130 bzw. den Chimären gpIL130, gpSLIFR130 und gpLLIFR130 transfiziert. Nachdem die Zellen metabolisch markiert worden waren, wurden sie für zwei Stunden mit oder ohne PMA inkubiert. Mit Anti-gp130 Antikörper immunpräzipitierte Zelllysate und Überstände wurden mittels SDS-PAGE und Fluorographie analysiert (Abb. 3.21); gp130 diente als Negativ-, gpIL130 als Positivkontrolle.

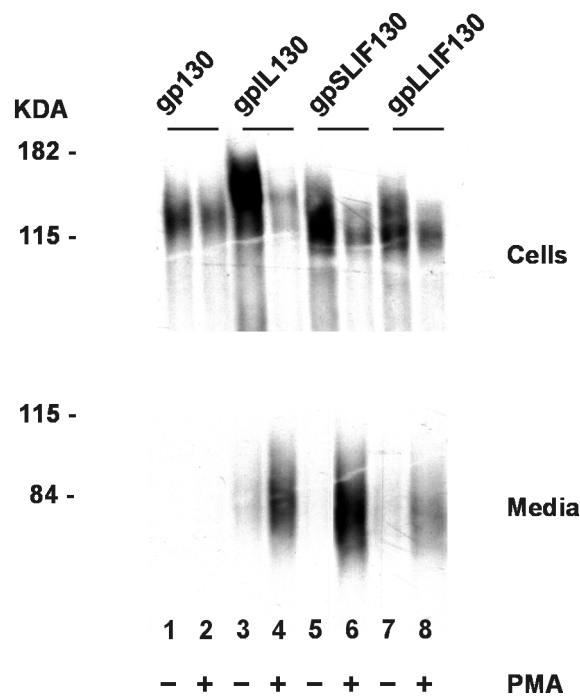


Abb. 3.21 Shedding der Chimären. Die in Abb. 3.20 gezeigten Protein wurden transient in COS-7 Zellen exprimiert. Nachdem die Zellen für zwei Stunden mit 50 μCi Tran ^{35}S]Label metabolisch markiert worden waren, wurden sie mit 10^{-7} PMA behandelt, wie in der Abbildung dargestellt. Die Lysate und Überstände wurden im folgenden immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE und Fluorographie analysiert.

Sowohl gpSLIFR130 als auch gpLLIFR130 ließen sich PMA induziert von der Zellmembran abspalten (Spuren 6 und 8). Ohne PMA-Stimulation wurden beide Proteine auf der Zellmembran exprimiert; es war kein lösliches Protein in den Überständen nachweisbar (Spuren 5 und 7). PMA Stimulation führte bei beiden Chimären zu einer Abnahme an zellgebundenen Proteinen. In den Überständen waren die löslichen Proteine nachweisbar (Spuren 6 und 8). Da sogar das Einfügen einer strukturell dem gp130 so ähnlichen Sequenz in einer spaltbaren Chimäre resultiert, kann hieraus geschlossen, dass das Einfügen von beliebigen Sequenzen in gp130 zu einer Vermittlung von Spaltbarkeit führt auch ohne, dass dies zu strukturellen Veränderungen führt.

3.3.4.2 Signaltransduktion der Chimären

In COS-7 Zellen, bei denen die zelluläre Antwort auf IL-6 durch Transfektion mit STAT3, IL-6R und gp130 bzw. den Chimären rekonstituiert worden war, wurde nun untersucht, ob gpSLIFR130 und gpLLIFR130 strukturell so wenig verschieden zu

gp130 sind, dass auch sie nach IL-6 Stimulation zur Signaltransduktion fähig wären (Abb. 3.22).

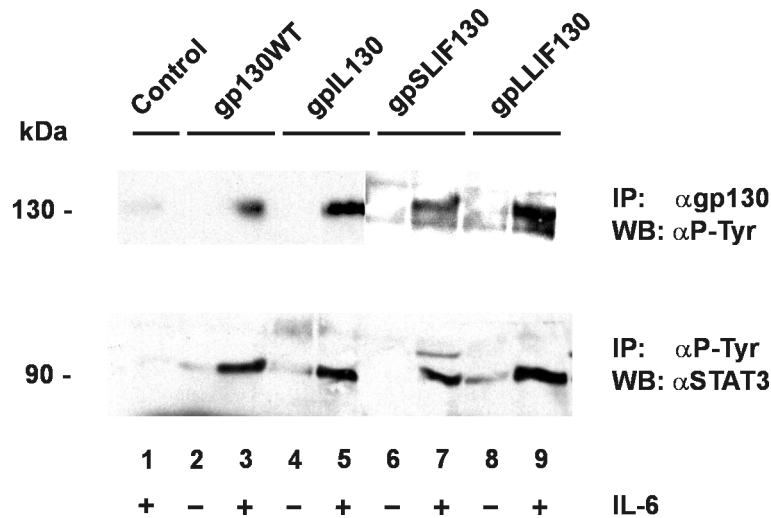


Abb. 3.22 Rekonstitution des IL-6R/gp130/STAT3 Signalsystems in COS-7 Zellen. Die Tyrosinphosphorylierung von gp130 bzw. den Chimären und STAT3 wurde nach Transfektion der humanen cDNA von IL-6R, STAT3 und gp130 bzw. den Chimären untersucht, nachdem die Zellen mit 50 ng/ml IL-6 stimuliert worden waren. Oberes Teilbild, Tyrosin Phosphorylierung von gp130. Unteres Teilbild, Tyrosin Phosphorylierung von STAT3.

Untransfizierte, stimulierte COS-7 Zellen dienten als Negativ- (Spur 1), gp130 (Spuren 2 und 3) und gpIL130 (Spuren 4 und 5) als Positivkontrolle. Sowohl gpSLIFR130 (Spuren 6 und 7) als auch gpLLIFR130 (Spuren 8 und 9) wurden nach IL-6 Stimulation phosphoryliert, d. h. sie waren zur Homodimerisierung fähig. Es kam in beiden Fällen zu einer Aktivierung und somit Phosphorylierung von STAT3; beide chimären Rezeptorproteine waren in der Lage, ein Signal weiterzuleiten. Die Chimäre gpSLIFR130 wurde nach Induktion mit IL-6 weniger stark phosphoryliert als gpLLIFR130. Möglicherweise entsprach das längere LIFR-Peptid besser dem ersten β -Faltblatt von gp130 als das kürzere, so dass gpLLIFR130 eine bessere strukturelle Integrität aufwies als gpSLIFR130.

4 Diskussion

Genetische und biochemische Studien deuten auf die Existenz einer generellen regulierten Sheddingmaschinerie, die auf etwa 2 bis 5 % der membranverankerten Proteine wirkt (23, 111). Bisher existierten erst wenige Untersuchungen über verschiedene Aspekte ihrer Regulierung oder über die Identität der beteiligten Proteasen. Besonders die Frage nach der Bedeutung der Spaltstellensequenzen wurde erst in wenigen Fällen untersucht.

4.1 Beteiligung von TACE am PMA-induzierten Shedding des IL-6Rs

In früheren Studien war bereits gezeigt worden, dass TACE unter physiologischen Bedingungen die alleinige Protease ist, die $\text{TNF}\alpha$ freisetzt (21). Des Weiteren konnten Peschon et al. (137) nachweisen, dass TACE ebenfalls eine Rolle bei der Prozessierung verschiedener anderer Proteine eine wichtige Rolle spielt; so war z. B. in TACE-defizienten ($\text{TACE}^{-/-}$) Mäusen, die über kein funktionelles TACE verfügten, auch die Prozessierung von $\text{proTGF}\alpha$ und L-Selektin stark herunterreguliert. Die Tiere wiesen so viele Defekte auf, dass sie nicht lebensfähig waren, sondern spätestens am Tag eins nach der Geburt starben.

Im Falle der IL-6R-Spaltung ist durch verschiedene Studien recht viel bekannt, wie z. B. die Spaltstelle und die Anfälligkeit des Sheddings für Mutationen im Bereich der Spaltstelle (122). Auch waren weitere Spaltstellen charakterisiert worden, die durch bakterielle Metalloproteasen genutzt werden (178, 179). Es gab bislang allerdings noch keine Arbeit, welche die Protease identifiziert hätte, die unter physiologischen Bedingungen die proteolytische Freisetzung des löslichen IL-6Rs bewirkt. Da die Spaltung des IL-6Rs sehr ähnlich reguliert wird wie die Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$, war vermutet worden, dass TACE möglicherweise an dem Shedding des IL-6Rs beteiligt sein könnte. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TACE tatsächlich eine wichtige Rolle bei der Prozessierung des IL-6Rs spielt. In $\text{TACE}^{-/-}$ Fibroblasten war das PMA-induzierte Shedding des IL-6R drastisch reduziert. Die basale Freisetzung des löslichen IL-6Rs war teilweise sensitiv gegenüber Hydroxamaten, woraus geschlossen werden kann, dass weitere Metalloproteasen an dem Vorgang beteiligt sind. $\text{TACE}^{-/-}$ Fibroblasten, die stabil mit TACE cDNA transfiziert worden waren

(TACE^{-/-}:TACE), so dass sie die Metalloprotease wieder exprimierten, wiesen eine IL-6R-Spaltung auf, die durch PMA deutlich verstärkt und durch das Hydroxamat TAPI inhibiert werden konnte. Hieraus kann weiterhin geschlossen werden, dass TACE zwar an der IL-6R-Prozessierung beteiligt ist, jedoch auch weitere Metalloproteasen beteiligt sind. Dies bestätigen die oben beschriebenen Ergebnisse, dass bakterielle Metalloproteasen in der Lage sind, den IL-6R zu spalten (178, 179). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das spontane Shedding des IL-6R teilweise nicht durch TAPI inhibiert werden konnte. Dieses Ergebnis war auch auf humanen Monozyten bestätigt worden (121). Dies weist auf die Beteiligung weiterer Proteasen hin, die keine Metalloproteasen sind. Es lässt sich folglich sagen, dass der Spaltprozess des IL-6Rs nicht so leicht zu verstehen ist wie der von proTNF α , bei dem vermutlich nur eine Metalloprotease, TACE, beteiligt ist bzw. das Wirken anderer Proteasen reguliert.

4.2 Vermittlung von Spaltbarkeit nicht nur durch Spaltstellenpeptide

Im Gegensatz zu der IL-6R-Spaltung war gezeigt worden, dass proTNF α unter physiologischen Bedingungen ausschließlich durch TACE gespalten wird (21, 117). *In vitro* Spaltassays hatten allerdings auch eine Beteiligung einer Serin-Protease (146) und ADAM10 (153) an der proTNF α -Prozessierung gezeigt. Ob diese Proteasen auch eine Rolle bei der Spaltung des IL-6R spielen, ist bisher noch nicht untersucht worden. Die oben diskutierten Ergebnisse zeigten allerdings, dass das IL-6R-Shedding sich von der proTNF α -Prozessierung unterscheidet, was möglicherweise durch Unterschiede im Bereich der Spaltstellen verursacht wird. Um diese Unterschiede weiter zu untersuchen, wurden chimäre Proteine genutzt, bei denen die Spaltstellenregion untereinander vertauscht worden war.

Chimären des IL-6R, die statt des eigenen das Spaltpeptid von proTNF α enthielten (IL-6R/TN, IL-6R/RTN), wiesen ein starkes spontanes Shedding auf, während der Wildtyp IL-6R in Abwesenheit von PMA nur sehr wenig gespalten wurde. Das starke spontane Shedding der IL-6R-Chimären ähnelte der Prozessierung von proTNF α , bei der PMA nur zu einem zwei- bis vierfachen Anstieg führt, was moderat im Vergleich zu dem Effekt ist, den PMA auf die Prozessierung des IL-6R hat. Der Transfer der proTNF α -Spaltstelle in den IL-6R resultierte in einem erhöhten spontanen Shedding.

Diese Ergebnisse weisen auf einen Beitrag der Aminosäuresequenz an der Spaltstelle auf das Spaltpattern eines Proteins hin, zumindest hinsichtlich des spontanen oder PMA-induzierten Sheddings. Es ist recht wahrscheinlich, dass die proTNF α -Spaltstelle die IL-6R-Chimären zugänglicher für die beteiligte(n) Metalloprotease(n) gemacht hat. Möglicherweise ist es durch das Ersetzen der Spaltstellen zu strukturellen Veränderungen gekommen, so dass die Spaltstelle besonders zugänglich geworden war. Allerdings lassen die Ergebnisse aus den TACE-defizienten Fibroblasten schließen, dass TACE keine Rolle bei der Prozessierung der IL-6R-Chimären spielt. Beide Chimären waren in Abwesenheit von TACE spontan freigesetzt worden. PMA hatte keine Auswirkungen auf die Spaltung. Hieraus lässt sich schließen, dass durch das Vertauschen der IL-6R-Spaltstelle mit der von proTNF α kein vermehrtes Shedding der entstandenen Chimären durch TACE stattgefunden hatte. Da es allerdings nach einer Inkubation mit TAPI zu einer deutlichen Reduktion an löslichen IL-6R-Chimären kam, kann angenommen werden, dass die Spaltung durch „TACE-ähnliche“ Metalloproteasen vermittelt wurde. Es konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass der IL-6R ebenfalls durch weitere Metalloproteasen prozessiert wird. Beispielsweise wird die Spaltung des IL-6R stark durch Metalloproteasen aus porenbildenden bakteriellen Toxinen induziert, die durch Hydroxamate inhibiert werden konnten. Die Spaltung fand jedoch nicht an der von Müllberg et al. (122) charakterisierten Spaltstelle statt, was vermuten lässt, dass die beteiligte Metalloprotease nicht identisch mit TACE war (179). Zusätzlich konnte eine Metalloprotease aus dem Proteobakterium *Serratia marcescens* identifiziert werden, die den IL-6R an einer dritten alternativen Spaltstelle prozessiert (178). Diese Arbeiten lassen vermuten, dass viele verschiedene Metalloproteasen mit unterschiedlichsten Sequenzspezifitäten existieren, so dass es bisher nicht möglich ist, eine Aussage darüber zu treffen, welche Metalloprotease die hier untersuchten Chimären gespalten hat.

Im Gegensatz zu den IL-6R-Chimären wurden chimäre Proteine aus proTNF α , die ein IL-6R Spaltpeptid statt der eigenen Spaltstelle enthielten (proTNF α /IL, proTNF α /RIL), nicht gespalten. Diese Ergebnisse insofern waren völlig unerwartet, als andere Gruppen bisher hierzu unterschiedliche Ergebnisse erhalten hatten. Durch den Transfer von Spaltstellenpeptiden von proTGF α und APP in die membranproximale Region des nicht spaltbaren Betaglykan konnten die Spalteigenschaften der Peptide übertragen werden (8). Andere Studien hatten gezeigt, dass Mutationen und Deletionen in der Spaltstellenregion von proTNF α in Proteinen resultierten, die

weiterhin spaltbar waren (136, 174). Diese Untersuchungen hatten annehmen lassen, dass Interaktionen zwischen Regionen in proTNF α , die verschieden sind zu der Spaltstellenregion, und Regionen außerhalb der katalytischen Tasche von TACE wichtig für die Erkennung und Spaltung von proTNF α durch TACE sind.

Diese Annahme war bereits durch Bindungsstudien am Computer getroffen worden, bei denen die dreidimensionale Struktur der katalytischen Domäne von TACE kompatibel mit zusätzlichen Kontaktstellen zwischen Protease und Substrat war (110). Im Falle des Angiotensin konvertierenden Enzyms (ACE) war gezeigt worden, dass die distale extrazelluläre Domäne, die weit von der Spaltstelle entfernt liegt, ausreichend für die Erkennung und Spaltung der beteiligten Protease war. Der Transfer dieser Domäne auf das Protein CD4 hatte dieses Protein, das normalerweise nicht durch limitierten Proteolyse freigesetzt wird, spaltbar gemacht (155). Allerdings hatten Sadhukhan et al. gezeigt (154), dass die Protease, die für die Spaltung von ACE zuständig ist, nicht identisch mit TACE ist.

Durch die hier beschriebenen Untersuchungen ließ sich allerdings zeigen, dass auch innerhalb der Spaltregion von proTNF α Erkennungssequenzen für TACE enthalten sein müssen, die in den proTNF α Chimären nicht vorhanden waren, so dass diese nicht mehr gespalten werden konnten. Möglicherweise hatte das Einfügen des IL-6R-Spaltpeptids zu einer Strukturveränderung in der Region geführt. Diese hat möglicherweise dazu geführt, dass TACE zwar noch binden konnte, da die Erkennungssequenzen außerhalb der Spaltstellenregion vorhanden waren, aber nicht mehr in der Lage war, die chimären Proteinen zu spalten. Allerdings ist diese These nach bisherigen Kenntnissen eher unwahrscheinlich, da angenommen wird, dass die Stielregion in unmittelbarer Nähe der Membran von proTNF α und IL-6R keine Sekundärstruktur aufweist (173, 187).

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Mechanismen der Substraterkennung durch Sheddingproteasen, die für die Generierung von löslichem IL-6R und TNF α verantwortlich sind, komplexer sind als zuvor angenommen.

4.3 Übertragung von Spaltbarkeit durch membran-nahe Sequenzen spaltbarer Proteine

Es war bisher in einem Fall gezeigt worden, dass membran-nahe Sequenzen von proTGF α und APP Spaltbarkeit auf ein nicht spaltbares Protein übertragen können (8). Aus diesen Ergebnissen hatten die Autoren geschlossen, dass die membran-nahe extrazellulären Regionen von proTGF α und APP trotz Fehlens von Sequenzähnlichkeiten Schlüsselemente des Sheddings sind. In den hier durchgeführten Experimenten sollten diese Ergebnisse bestätigt und erweitert werden. Es wäre möglich gewesen, dass nur eine Besonderheit an dem von Arribas et al. gewählten Reporterprotein Betaglykan zu der Spaltbarkeit geführt hätte. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein anderes Protein gewählt, das gp130. Dieses Typ I Transmembranprotein ist kein Substrat der zuvor beschriebenen Spaltmaschinerie, obwohl gp130 in sehr geringem Ausmaß von der Zelloberfläche gespalten wird (120). Die Menge an proteolytisch freigesetztem löslichem gp130 ist allerdings vernachlässigbar im Vergleich zum Shedding von Proteinen wie IL-6R und proTNF α . Außerdem scheint dieser Vorgang nicht durch Protein Kinase C (PKC) reguliert zu sein, da er nicht durch PMA induziert werden kann. Das Protein gp130 wurde noch aus einem anderen Grund als Ausgangsprotein gewählt. Es ist die gemeinsame signaltransduzierende Untereinheit der Familie der IL-6-artigen Zytokine (87). Chimären, die auf der Basis von gp130 hergestellt werden, können folglich immer auf ihre strukturelle Integrität hin untersucht werden, indem überprüft wird, ob sie noch in der Lage sind, nach Stimulation Signale in den Kern weiterzuleiten.

Zunächst wurden vier chimäre Proteine untersucht. Aus gp130 wurden jeweils sieben Aminosäuren herausgenommen. Dies entsprach nach den Modellvorstellungen (Abb. 4.1) der Länge eines β -Faltblatts der membranproximalen Fibronektindomäne. Hierdurch, so wurde vermutet, würde die Struktur des Proteins am wenigsten beeinträchtigt werden. Im Austausch wurden jeweils 12 Aminosäuren lange Peptide von IL-6R, proTNF α und proTGF α eingesetzt. Dass ein längeres Peptid eingesetzt wurde, als zuvor herausgenommen worden war, liegt darin begründet, dass, veranlasst durch Studien an ACE, eine minimale Länge von Spaltregionen postuliert worden war. Der sogenannte Stiel zwischen Membran und erster extrazellulärer Domäne sollte hier nach zumindest 11 Aminosäuren lang sein, damit die spaltende Protease Zugang zu der Spaltstelle habe (46). Es wurden die Spaltstellenpeptide von proTNF α und IL-6R

gewählt, weil bereits sehr viel über den Vorgang der Spaltung dieser beiden Proteine bekannt ist. Da bei dem zuvor durchgeführten Spaltstellenaustausch zwischen IL-6R und proTNF α untereinander so unerwartete Ergebnisse aufgetaucht waren, erschien es sehr interessant herauszufinden, wie sich diese beiden Peptide in einem der Spaltmaschinerie nicht zugänglichen Protein auswirken würden. Die membran-nahe Region von proTGF α war ausgewählt worden, um einen direkten Vergleich zu den Ergebnissen von Arribas et al. zu haben (8).

proTGF α und IL-6R sind wie gp130 Typ I Transmembranproteine, d. h. ihr C-Terminus liegt intrazellulär. Im Gegensatz hierzu befindet sich der C-Terminus von proTNF α extrazellulär; es ist ein Membranprotein vom Typ II. Im folgenden stellte sich die Frage, ob ein Spaltstellenpeptid die Spaltbarkeit nur in einer Orientierung, relativ gesehen zur Zellmembran, übertragen kann. Aus diesem Grund wurden zwei Chimären hergestellt, die das proTNF α -Spaltpeptid in zwei Orientierungen enthielten (gpTN130 und gpRT130).

Im folgenden konnte gezeigt werden, dass alle vier Chimären exprimiert wurden. Im Gegensatz zu gp130, das als einzelne Bande von etwa 130 kDa im Gel nachweisbar war (schwarzer Pfeilkopf), wurden die chimären Proteine als Doppelbande detektiert. Zusätzlich zu der Bande bei 130 kDa (schwarzer Pfeilkopf) wurde eine zweite Bande bei etwa 120 kDa detektiert (weißer Pfeilkopf). Die untere Bande stammt vermutlich von Vorläuferproteinen, die nicht zu Oberfläche transportiert worden waren. Möglicherweise konnten sie nicht korrekt gefaltet werden. Diese Vermutung wurde dadurch bestätigt, dass diese untere Bande nicht in oberflächenbiotinylierten Zellen nachweisbar war. Allerdings wiesen die oberflächenmarkierten Zellen dasselbe Expressionsmuster auf wie die metabolisch markierten Zellen aus den Spaltuntersuchungen. Somit wurde bestätigt, dass die biotinylierten Oberflächenproteine den metabolisch markierten Proteinen entsprechen.

In den folgenden Spaltassays konnte gezeigt werden, dass alle vier generierten Chimären PMA-induziert prozessiert wurden. Überraschenderweise zeigten sich bezüglich der Induzierbarkeit signifikante Unterschiede. Die Chimäre gpIL130, die die IL-6R-Spaltregion enthält, wurde in nur geringem Maße spontan gespalten. Die Inkubation mit PMA führte allerdings zu einer fast vollständigen Freisetzung von löslichem gpIL130. Das chimäre Protein wurde folglich in der gleichen Weise prozessiert wie der IL-6R, aus dem das Spaltstellenpeptid stammte. Wie bereits zuvor beschrieben wurde, wird proTNF α in höherem Maße spontan gespalten als der IL-6R. Auch

gpTN130, das die Spaltstellenregion von proTNF α in gleicher Orientierung enthält wie in proTNF α , wurde in erheblich höherem Maße spontan gespalten als gpIL130. Offensichtlich wurden die Spalteigenschaften der Ursprungproteine durch die Spaltstellenpeptide übertragen. Daraus lässt sich schließen, dass in der die Spaltstelle umgebenden Region, eine Information verschlüsselt ist, welche die Spalteigenschaften des Proteins bestimmt. Weiterhin bestätigt wurde diese Annahme durch das Spaltmuster von gpTG130. Diese Chimäre wurde spontan gesheddet wie auch gpTN130. PMA führte ebenso zu einer kompletten Freisetzung des chimären Proteins. Auch proTGF α wird spontan prozessiert. PMA führt zu einer weiteren Beschleunigung der Spaltung (7). Aus diesen Ergebnissen konnte zunächst geschlossen werden, dass es Spaltstellen gibt, die in der Lage sind, andere, nicht-spaltbare Proteine der Sheddingmaschinerie zugänglich zu machen. Die Chimäre, die das reverse Spaltstellenpeptid von proTNF α enthielt (gpRT130), wurde ebenfalls prozessiert. Was allerdings überraschte, war das Muster der Spaltung. Diese Chimäre wurde in viel geringerem Maße spontan gespalten als gpTN130. Stattdessen wurde lösliches gpRT130 vor allem nach der PMA Induktion freigesetzt. Hierin ähnelt diese Chimäre viel mehr gpIL130 bzw. dem IL-6R. Hieraus könnte geschlossen werden, dass in gpTN130 die Information des Typ II Proteins weitergegeben worden war. Die reverse Orientierung von gpRT130 allerdings führte in der Chimäre zu einer Spaltung wie in dem Typ I Protein IL-6R. Dagegen spricht jedoch, dass auch proTGF α ein Membranprotein vom Typ I ist. Trotzdem wird es in höherem Maße spontan gespalten als der IL-6R. Möglicherweise sind proTNF α und proTGF α bessere Substrate für die beteiligte(n) Protease(n) als der IL-6R. Dies könnte erklären, warum diese Proteine und somit auch die gp130 Chimären, die deren Spaltstellen enthalten (gpTN130 und gpTG130) besser, also bereits ohne Stimulation gespalten werden können. Der IL-6R, ebenso wie gpIL130, ist möglicherweise ein schlechteres Substrat und wird erst durch die Stimulation mit z. B. PMA in größeren Mengen prozessiert. Durch die reverse Orientierung der proTNF α Spaltregion in gpRT130 ist die Spaltstelle möglicherweise schlechter für die beteiligte(n) Metalloprotease(n) zugänglich. Aus diesem Grund wird diese Chimäre möglicherweise erst in erhöhtem Maße nach einer Stimulation mit PMA prozessiert.

Ehlers et al. (46) hatten, veranlasst durch Studien an ACE, postuliert, dass eine Spaltregion zumindest 11 Aminosäuren lang sein müsste, um der beteiligten Protease(n) Zugang zu der Spaltstelle zu gewähren. Bei einer Übertragung der Spaltbarkeit

auf ein per se unspaltbares Protein war diese Hypothese allerdings nie überprüft worden. Daher wurden vier verkürzte IL-6R-Spaltregionen in gp130 eingesetzt, von denen zwei die eigentliche IL-6R-Spaltstelle enthielten, zwei weitere jedoch nur die diese Spaltstelle umgebenden Aminosäuren. In jedem Fall waren die eingesetzten Peptide kürzer als 11 Aminosäuren; gp8IL130 und gp Δ 4IL130 enthielten ein acht Aminosäuren langes Spaltpeptid, das Peptid in gp4IL130 und gp Δ 8IL130 war nur vier Aminosäuren lang. Dennoch waren alle auf diese Weise generierten Chimären PMA-induziert spaltbar. Interessanterweise wurde jede dieser Chimären nach dem gleichen Muster wie gpIL130 gespalten, d. h. die löslichen Formen der Chimären wurden nur sehr wenig spontan freigesetzt sondern erst nach einer Stimulation mit PMA. Es gibt keine Aminosäuren des Spaltpeptids, die in allen vier Chimären enthalten sind. Daher kann hieraus geschlossen werden, dass in den eingesetzten Peptiden keine Informationen darüber enthalten ist, dass die Chimären wie der IL-6R gespalten werden. Jede der Aminosäuren des Spaltpeptids müsste diese Information tragen. Vielmehr wird die zuvor gemachte Annahme unterstützt, dass ein Protein, dessen Spaltstelle schlecht für die beteiligte(n) Protease(n) zugänglich ist, kaum spontan gespalten wird, sondern erst nach einer Stimulation mit PMA. Die verkürzten Spaltpeptide der zuletzt untersuchten Chimären waren folglich ebenso schlecht von der beteiligten Protease zu erreichen, wie das ursprüngliche IL-6R-Peptid. Hierbei war es nicht bedeutend, ob die eigentliche Spaltstelle in dem Peptid enthalten war. Ebenso unwichtig war die Länge des eingesetzten Peptids. In allen Fällen war die Spaltregion gleich gut bzw. schlecht zugänglich, so dass es in alle vier Fällen zu einem PMA-induzierten Shedding kam. Möglicherweise wurde durch das Austauschen der Aminosäuren die Schleife, die das ersetzte β -Faltblatt mit dem darauffolgenden β -Faltblatt verbindet ebenfalls als „Spaltsequenz“ miteinbezogen, so dass die gesamte Länge wieder der minimal geforderten entsprach. Eventuell jedoch wäre es auch möglich, dass weniger als elf Aminosäuren ausreichen, um die Sequenz für eine Protease zugänglich zu machen. Hieraus kann geschlossen werden, dass die tatsächliche Sequenz einer Spaltregion nicht von entscheidender Bedeutung für die Spaltbarkeit sein kann. Dies ist nicht überraschend, denn die Spaltstellenregionen der großen Gruppe der PMA induziert spaltbaren Proteine weist keinerlei Sequenzübereinstimmungen auf. Dennoch werden alle nach dem gleichen Mechanismus gespalten. Dies hatte bereits in anderen Arbeiten zu der These geführt, dass nicht die tatsächliche Sequenz der Spaltstellenregion ausschlaggebend ist, ob ein Protein gespalten wird,

sondern die Topologie der Region sowie die Tatsache, dass sie sich in unmittelbarer Membrannähe befindet (46). Bezüglich der Topologie der Stielregion ist vermutlich die Ausbildung eines Stiels mit nicht oder kaum vorhandener Sekundärstruktur entscheidend, wie er bisher für alle spaltbaren Proteine nachgewiesen werden konnte (46).

Da aus den bisher erhaltenen Ergebnissen geschlossen werden kann, dass die Topologie der Spaltstellenpeptide entscheidend für die Spaltung eines Proteins ist, wurden im folgenden zwei Chimären generiert, die unterschiedlich lange Peptide aus der membranproximalen Region des LIFR enthielten. Die Struktur des LIFR und gp130 ähneln sich in vielen Bereichen. Auch in der membranproximalen Domäne sind beide Proteine ähnlich aufgebaut. Abb. 4.1 veranschaulicht, dass die der Membran am nächsten liegende Domäne ein aus sieben β -Faltblättern bestehendes fibronektinartiges Modul ist. In beiden Proteinen besteht das erste β -Faltblatt aus neun Aminosäuren; das Einsetzen der angezeigten sieben (blau) bzw. neun Aminosäuren (blau und türkis) des LIFR an die Stelle der sieben blau gezeichneten Aminosäuren von gp130 sollte in einem chimären Protein resultieren, das eine ähnlich kompakte Struktur wie gp130 und LIFR aufweist und nicht gespalten wird. Erstaunlicherweise wurden beide Chimären PMA-induziert freigesetzt. Ähnliche Beobachtungen waren kürzlich gemacht worden, nachdem die gesamte Stielregion des Angiotensin Konvertierenden Enzyms (ACE) durch eine nicht spaltbare EGF-ähnliche Sequenz ersetzt worden war (160). Auch diese chimären Proteine waren PMA-induziert gespalten worden.

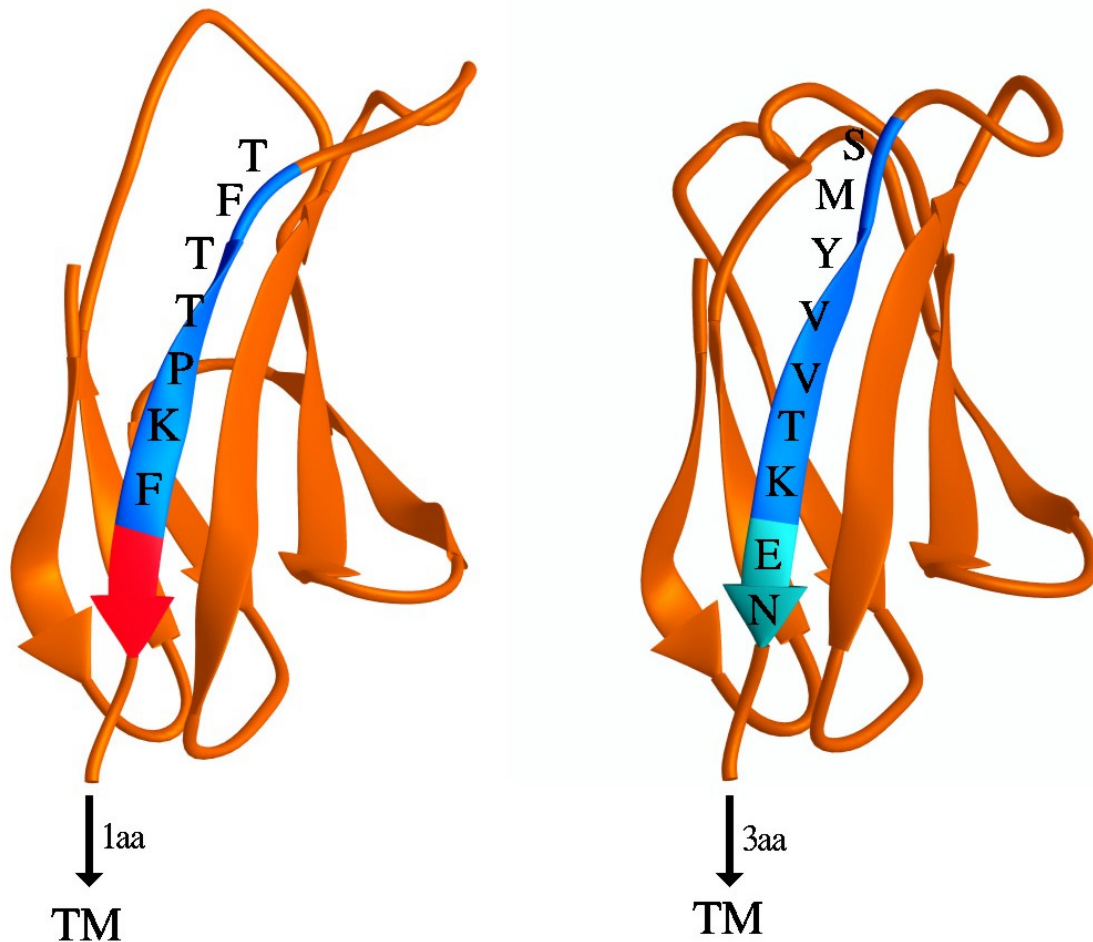


Abb. 4.1 Bänderdarstellung der molekularen Modelle der membranproximalen Fibronectin III Domänen von gp130 (links) und LIFR (rechts). Die juxtamembranen peripheren Faltblätter sind in blau bzw. türkis ausgefüllt. Im Falle von gp130 (links) misst der Abstand zur Zellmembran eine Aminosäure. Das Faltblatt von LIFR ist drei Aminosäuren von der Zellmembran entfernt.

Die in diesem Fall erhaltenen Ergebnisse sind nur schwer mit den bisher getroffenen Postulierungen und Modellvorstellungen vereinbar. Wie in dem Modell in Abb. 4.1 veranschaulicht wird, besitzt gp130 keine Stielregion zwischen der extrazellulären und der Transmembrandomäne. Die Länge des membranahen β -Faltblatts der Fibronectin III Domäne hatte keinen unterscheidbaren Einfluss auf die Spaltbarkeit, da die Spaltmuster von gpSLIFR130 und gpLLIFR130 identisch waren.

Bereits das minimale nicht induzierte Shedding von gp130 muss durch eine Destabilisierung der membranahen Fibronectin III Domäne stattfinden. Durch das Ersetzen des membranproximalen β -Faltblatts mit dem β -Faltblatt des LIFRs wurde diese De-

stabilisierung vermutlich noch vergrößert. Andererseits funktionierten alle spaltbaren und nicht spaltbaren gp130 Chimären als Signaltransduktionsmodul des IL-6/IL-6R-Komplexes. Durch Stimulation mit IL-6 kam es in allen Fällen zu einer Tyrosin Phosphorylierung von gp130 und zu einer STAT3 Aktivierung. Dies spricht gegen starke strukturelle Veränderungen der gp130 Chimären. Aus diesem Grund können die gemachten Beobachtungen nur durch ein dynamischeres Modell erklärt werden. Vermutlich liegt das membranproximale β -Faltblatt der chimären gp130 Proteine durchschnittlich wesentlich öfter in einem unstrukturierten Zustand außerhalb des Verbandes der Fibronectin III Domäne vor als im Wildtyp gp130. Immer wenn dieses β -Faltblatt außerhalb der Domäne vorliegt, wird das chimäre Protein für eine Sekretase zugänglich und kann PMA-induziert gespalten werden. Die übrige Zeit liegt dieses β -Faltblatt in geordnetem Zustand vor, so dass die Chimäre strukturell intakt und während dieser Zeit zur Signaltransduktion fähig ist. Die erhaltenen Ergebnisse sprechen gegen die Existenz einer Spaltsequenz per se in Membranproteinen und legen ein Modell nahe, in dem die strukturelle Integrität der extrazellulären Domäne das Spaltverhalten determiniert.

Hieraus kann geschlossen werden, dass ein Membranprotein um so mehr zu einem Substrat für Sheddingproteasen wird, je ungeordneter die membrannahe Domäne dieses Proteins ist.

4.4 Biologische Relevanz löslicher Membranproteine

Es wird angenommen, dass mindestens 2 bis 5 % der Membranproteine durch proteolytische Spaltung freigesetzt wird. Diese löslichen Proteine sind oft von großer Wichtigkeit für den Körper, da durch sie Informationen z. B. über Infektionen schnell verbreitet werden können. In anderen Fällen jedoch sind sie für die Ausbreitung von Krankheiten oder sogar für deren Entstehen verantwortlich. Im Falle von β -APP, beispielsweise, führt die fehlerhafte Spaltung zu Fragmenten, die im Gehirn zu den Plaques führen, die in Alzheimerpatienten entdeckt wurden (143). Bisher sind drei Spaltstellen in β -APP bekannt, die von drei verschiedenen Proteasen (α -, β - und γ -Sekretase) erkannt werden (74). Erst kürzlich konnte die β -Sekretase, deren Aktivität zu den die Alzheimersche Krankheit verursachenden Peptiden führt, kloniert und zu den Aspartatproteasen gruppiert werden (67, 96, 163, 177, 188). Weitere Erkenntnisse über die Wirkung dieser Sekretasen sowie deren Regulierung werden es in

Zukunft ermöglichen, Antagonisten und Inhibitoren zu entwickeln, so dass die Alzheimersche Krankheit in Zukunft geheilt werden kann bzw. gar nicht mehr zum Ausbruch kommen wird.

Zu den proteolytisch spaltbaren Proteinen gehören auch viele Zelladhäsionsmoleküle, wie z. B. L-Selektin, das eine wichtige Rolle beim Rekrutieren von Leukozyten an Entzündungsorte spielt (Leukozyten „Rolling“ und „Homing“). Die Freisetzung dieses Proteins, die in aktivierten Neutrophilen stattfindet und zu einer Verringerung an zellgebundenem L-Selektin führt, geschieht wenige Minuten nach PMA-Stimulation (17). Da L-Selektin in allen Leukozyten außer einigen Gedächtnis T-Zellen exprimiert wird, könnte eine Herunterregulation von auf der Oberfläche exprimiertem L-Selektin zu einem Ablösen von Leukozyten von Endothelzellen führen. (186). Würde es z. B. bei einer bakteriellen Infektion zu einem Shedding von L-Selektin und anderen Adhäsionsmolekülen durch bakterielle Proteasen kommen, wäre eine Mobilisierung der Immunantwort in den betroffenen Geweben nicht mehr so schnell und effizient möglich. Viele Zytokine und Zytokinrezeptoren gehören ebenfalls zu den Substraten der Sheddingmaschinerie. Mögliche Konsequenzen der Spaltung von membrangebundenen Zytokinen ist in Abb. 4.2A dargestellt. Membrangebundene Zytokine können ihre Rezeptoren auf benachbarten Zellen stimulieren. Die membrangebundene Form $\text{TNF}\alpha$ bindet und aktiviert bevorzugt den Typ II TNF-R , wodurch es beispielsweise in der Lage ist, resistente Tumorzellen sensitiv gegenüber einer $\text{TNF}\alpha$ vermittelten Zytotoxizität zu machen (65). Mittels eines transgenen Tiermodells konnten Alexopoulos et al. des weiteren nachweisen, dass membrangebundenes $\text{proTNF}\alpha$ allein in der Lage ist, die Pathogenese von Arthritis zu vermitteln (6). Eine Spaltung dieser membranständigen Zytokine durch eine Protease führt zu der Freisetzung von löslichen Zytokinen, die nun durch die Blut- und Lymphzirkulation verbreitet werden (Abb. 4.2B). Auf diese Weise kann die Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ beispielsweise zu einem systemischen Krankheitsbild wie dem septischen Schock führen. Andererseits können auf diese Weise Informationen über mögliche Krankheitserreger viel schneller verbreitet werden, als die über membrangebundene Zytokine der Fall wäre.

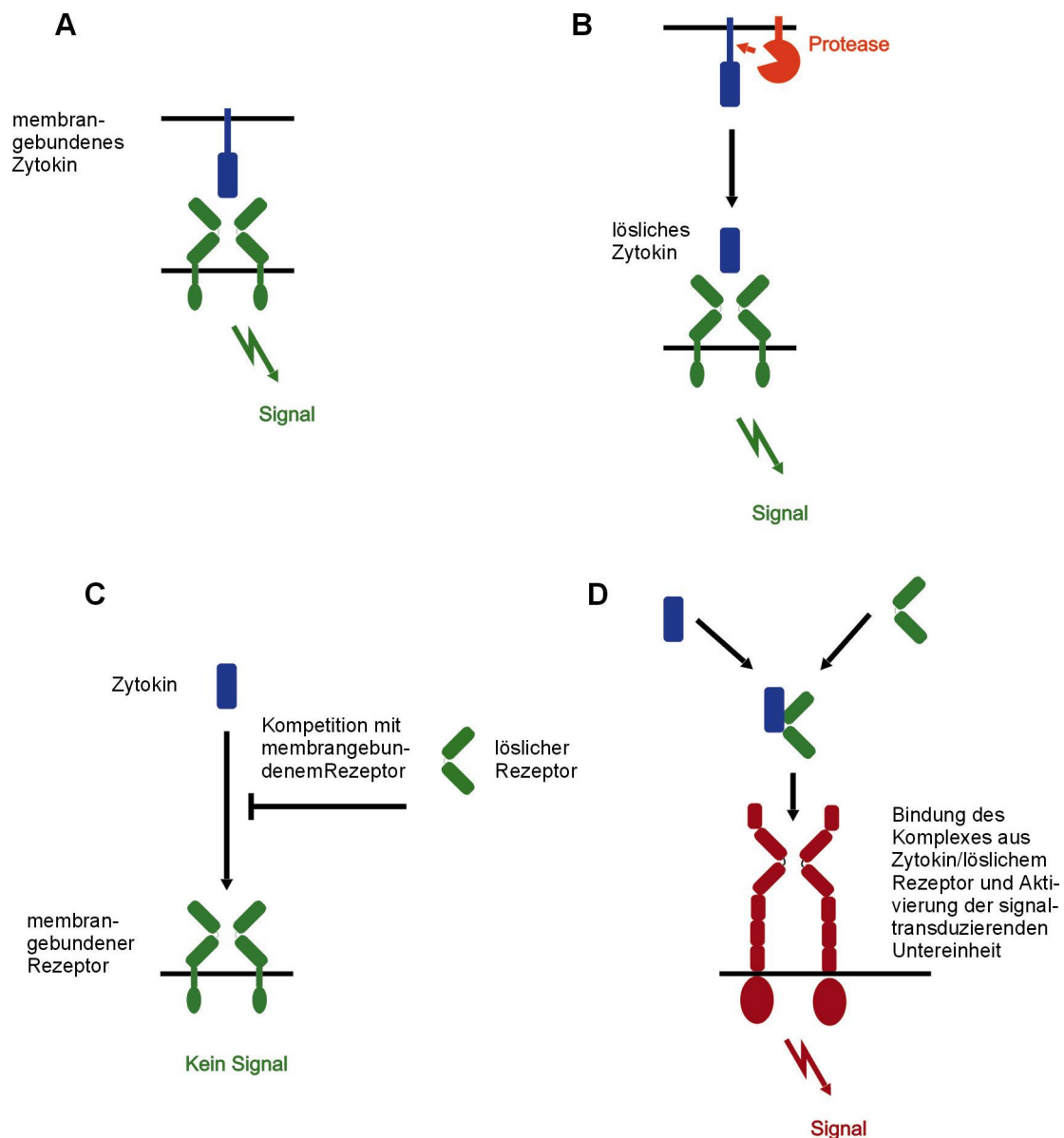


Abb. 4.2 Physiologische Bedeutung löslicher Zytokine und löslicher Zytokinrezeptoren. (A) Zell-Zell Signalgebung durch membrangebundenen Wachstumsfaktoren oder Zytokine. (B) Shedding eines membrangebundenen Wachstumsfaktors oder Zytokins führt zu der Generierung der löslichen Form dieses Proteins, das durch die verbreitet wird und andere Zellen stimulieren kann. (C) Der lösliche Rezeptor eines Wachstumsfaktors oder Zytokins kann mit der membrangebundenen Form um den Liganden konkurrieren. Diese löslichen Rezeptoren wirken als Antagonisten. (D) Im Falle der IL-6-artigen Zytokine wirken die löslichen Rezeptoren agonistisch (aus Müllberg et al. (2000) (119).

Mäuse, die kein $\text{TNF}\alpha$ oder keine TNF-Rezeptoren haben, sind lebensfähig (47). Insofern war es überraschend, dass TACE-defiziente ($\text{TACE}^{-/-}$) Mäuse es nicht waren (137). Hieraus konnte geschlossen werden, dass TACE auch für die Freisetzung verschiedener anderer Proteine von großer Wichtigkeit ist. Die Summe all dieser fehlen-

den Prozessierungen schließlich führten in den Tieren zu dem extremen Phänotyp, wie beispielsweise die Abnormalitäten in den Haarfollikeln und Augen in den TACE^{-/-} Mäusen (137). Der Phänotyp wies vor allem auf eine Beteiligung von Zytokinen der TGF α Familie hin, da Mäuse, die für TGF α defizient sind, einen sehr ähnlichen Phänotyp besitzen (104, 106).

Inzwischen konnte durch Bank et al. (10) gezeigt werden, dass auch Serinproteasen, die von aktivierten Neutrophilen sezerniert werden, wie Elastase und Cathepsin G an der Freisetzung von Zytokinrezeptoren beteiligt sind. Patienten mit einem Neurotrauma wiesen hohe Mengen an löslichen Rezeptoren von IL-2 und IL-6 auf, die durch Elastase (spaltete vornehmlich IL-2R) und Cathepsin G (nutzte den IL-6R als Substrat) hervorrufen wurden (10). Interessanterweise induziert IL-2 auch die Freisetzung von Serinproteasen aus Natürlichen Killerzellen und unspezifischen T-Killerzellen (107).

Freigesetzte Zytokinrezeptoren können auf unterschiedliche Weise wirken. Abb. 4.2C und D zeigen die Möglichkeiten einer antagonistischen und agonistischen Wirkweise löslicher Zytokinrezeptoren. Die meisten löslichen Rezeptoren konkurrieren mit ihren membrangebundenen Pendanten um ihre Liganden, wodurch sie als kompetitive Antagonisten wirken. Rezeptoren für IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13 und IL-15 gehören zu der Gruppe der antagonistisch wirkenden löslichen Rezeptoren (Abb. 4.2C) (119). Viele dieser löslichen Rezeptoren verlängern die Plasmahalbwertszeit ihrer Liganden und können daher als Trägerproteine für diese Zytokine angesehen werden (45, 51, 52, 73, 151). Im Gegensatz hierzu agieren viele lösliche Rezeptoren der IL-6-artigen Zytokine als Agonisten (151). Wie schematisch in Abb. 4.2D dargestellt ist, kann IL-6 seinen löslichen Rezeptor binden. Dieser Komplex bindet im folgenden an ein Molekül gp130, das daraufhin mit einem weiteren Molekül gp130 homodimerisiert und aktiviert wird. Eine Zelle, die löslichen IL-6R freisetzt, kann eine zweite Zelle, die nur gp130 exprimiert, sensitiv für IL-6 machen. Dieses Prinzip wurde als Transsignalling bezeichnet (151). Bisher konnte gezeigt werden, dass IL-6, IL-11 (12) und CNTF (39), die alle in die Familie der IL-6-artigen Zytokine gehören, Zielzellen durch Transsignalling aktivieren können.

An sympathischen primären Neuronen (108) und an primären glatten Muskelzellen (89) konnte ein neues Prinzip der parakrinen Signalweiterleitung durch Zytokine nachgewiesen werden. Beide Zelltypen produzieren IL-6. Da sie jedoch keinen IL-6R auf ihrer Oberfläche exprimieren, können sie nicht auf das IL-6 reagieren, das sie

produzieren. Beide Zelllinien können allerdings durch eine Kombination von löslichem IL-6R und IL-6 sowie durch ein Fusionsprotein aus IL-6R und IL-6, dem sogenannte Hyper-IL-6, (53) stimuliert werden. Daher scheint es wahrscheinlich zu sein, dass viele IL-6 produzierende Zellen auf benachbarte Zellen angewiesen sind, die löslichen IL-6R freisetzen. Als löslichen IL-6R produzierende Zellen kommen vor allem Gewebemakrophagen und Neutrophile in Frage, die nach Stimulation mit dem Akutphase-Protein C-reaktives Protein löslichen IL-6R freisetzen (84).

4.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse haben neue Einblicke in die Regulierung des Sheddings gegeben. Allerdings wurden hierdurch auch viele neue Fragen aufgeworfen, die in Zukunft weiter untersucht werden sollten.

Das beschriebene dynamische Modell müsste, um dessen Richtigkeit zu bestätigen, weiter untersucht werden. Hierzu würden sich genaue Messungen der Spaltkinetiken verschiedener mutierter Proteine anbieten, die parallel zu Analysen ihrer strukturellen Integrität durchgeführt werden müssten.

Des Weiteren sollten die generierten proTNF α -Chimären, die statt der eigenen die Spaltregion des IL-6Rs enthalten, auf strukturelle Besonderheiten hin untersucht werden. Bisher konnte gezeigt werden, dass die chimären Proteine zum großen Teil zur Zelloberfläche transportiert werden, was bedeutet, dass sie strukturell nicht völlig verschieden zum Wildtyp sind. Der Grund, warum sie trotzdem nicht prozessiert werden können sollte weiter untersucht werden. Des Weiteren könnte auch der komplette Stiel von proTNF α gegen den vollständigen Stiel des IL-6R ausgetauscht werden. Möglicherweise wären solche Chimären wieder spaltbar. Statt der IL-6R-Spaltregion könnten ebenso andere membrannahe Peptide von spaltbaren Proteinen gegen die Spaltregion von proTNF α eingesetzt werden. Hiermit könnte untersucht werden, ob alle chimären Spaltstellenproteine, die auf der Basis von proTNF α generiert werden, unspaltbar sind. Interessant wäre es auch zu untersuchen, ob eine proTNF α -Chimäre, welche die eigene Spaltstelle in reverser Form enthält, noch spaltbar ist und nach welchem Muster.

Um weitere Einblicke in die generellen Mechanismen des Sheddings zu gewinnen, werden Untersuchungen an Tiermodellen gemacht werden müssen. Die bisher generierten TACE-defizienten Mäuse, waren nicht lebensfähig (137). Sie starben zwi-

schen Tag 17,5 der Embryonalentwicklung und dem ersten Tag nach der Geburt. Die bisher gemachten Untersuchungen konnten folglich nur an aus Embryonen dieser Tiere isolierten Zellen durchgeführt werden. Die Generierung von konditionalen TACE-defizienten Tieren, bei denen das Protein am lebenden Tier und organspezifisch ausgeschaltet werden kann, wird weitere Einblicke in die Mechanismen des Sheddings sowie deren Auswirkungen auf den Organismus ergeben. Anhand dieser Tiere wird es auch möglich sein, die Beteiligung von TACE am Shedding des IL-6R näher zu klassifizieren und den Unterschied zur Prozessierung von proTNF α konkreter darstellen zu können.

5 Zusammenfassung

Eine funktionell und strukturell diverse Gruppe von Transmembranproteinen wie beispielsweise Mediatoren und deren Rezeptoren können proteolytisch gespalten werden. Trotz Fehlens von Sequenzähnlichkeiten im Bereich der Spaltstellen werden die meisten dieser Proteine nach einer Protein Kinase C Aktivierung durch Phorbol ester (PMA) gespalten. Die für die Freisetzung des Zytokins Tumor-Nekrose-Faktor Alpha ($\text{TNF}\alpha$) verantwortliche Metalloprotease TACE („TNF Alpha Converting Enzyme“) spielt auch bei der Prozessierung verschiedener anderer Membranproteine eine wichtige Rolle. In Experimenten mit TACE-defizienten Mausfibroblasten wurde in der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung von TACE an der PMA-induzierten Spaltung des Interleukin-6 Rezeptors (IL-6R) nachgewiesen. Eine Beteiligung anderer Metalloproteasen und Nicht-Metalloproteasen konnte ebenfalls gezeigt werden.

Bisher war erst wenig darüber bekannt, welche Voraussetzungen innerhalb spaltbarer Proteine gewährleistet sein müssen, damit sie von den spezifischen Proteasen erkannt und gespalten werden. Um herauszufinden, welche Rolle Erkennungssequenzen im Bereich der Spaltstelle hierbei spielen, wurden verschiedene Chimären generiert. In einem ersten Ansatz wurden Spaltstellenpeptide zwischen zwei spaltbaren Proteinen, IL-6R und $\text{proTNF}\alpha$, gegeneinander vertauscht. Chimäre Proteine aus $\text{proTNF}\alpha$, die statt der eigenen die Spaltstelle die des IL-6Rs enthielten, ließen sich nicht mehr spalten. Im Gegensatz dazu wurden IL-6R Chimären, welche statt der eigenen die $\text{proTNF}\alpha$ Spaltstelle beinhalteten, spontan von der Zellmembran freigesetzt, ohne dass PMA noch einen weiteren Effekt hatte.

Die signaltransduzierende Untereinheit des IL-6 Rezeptorkomplexes gp130 wird nur minimal und nicht PMA-induziert von der Zellmembran freigesetzt. Durch das Austauschen kurzer membranproximaler Peptidsequenzen von gp130 durch Spaltstellenpeptide aus dem IL-6R, $\text{proTNF}\alpha$ und $\text{proTGF}\alpha$ („Tumour Growth Factor“), wurden die daraus resultierenden gp130 Chimären PMA-induziert von der Zellmembran gespalten. Dennoch waren die Chimären weiterhin funktionell, da sie nach Zytokinstimulation phosphoryliert wurden und den Transkriptionsfaktor STAT3 aktivierten. Dieselben Ergebnisse wurden mit verkürzten IL-6R Peptiden erhalten, die nur die Spaltstelle flankierende Aminosäuren, nicht jedoch die Spaltstelle selber enthielten. Auch eine korrespondierende Sequenz aus dem ebenfalls nicht-spaltbaren LIF („Leukae-

mia Inhibitory Factor“) Rezeptor, der gp130 strukturell sehr ähnlich ist, vermittelte Spaltbarkeit.

Die hier erhaltenen Ergebnisse lassen annehmen, dass es keine minimalen Konsensussequenzen für die Spaltung gibt. Vielmehr scheinen strukturelle Veränderungen innerhalb der membrannahen Region spaltbarer Proteine der Protease Zugang zu der Spaltstelle zu verschaffen.

6 Literaturverzeichnis

1. **Abe, T., and K. S. Misono.** 1992. Proteolytic cleavage of atrial natriuretic factor receptor in bovine adrenal membranes by endogenous metalloendopeptidase. Effects on guanylate cyclase activity and ligand-binding specificity. *Eur J Biochem.* **209**:717-24.
2. **Aggarwal, B. B., W. J. Kohr, P. E. Hass, B. Moffat, S. A. Spencer, W. J. Henzel, T. S. Bringman, G. E. Nedwin, D. V. Goeddel, and R. N. Harkins.** 1985. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* **260**:2345-2354.
3. **Akira, S., H. Isshiki, T. Nakajima, S. Kinoshita, Y. Nishio, S. Hashimoto, S. Natsuka, and T. Kishimoto.** 1992. A nuclear factor for the IL-6 gene (NF-IL6). *Chem Immunol.* **51**:299-322.
4. **Akira, S., T. Taga, and T. Kishimoto.** 1993. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol.* **54**:1-78.
5. **Alele, J., J. Jiang, J. F. Goldsmith, X. Yang, H. G. Maheshwari, R. A. Black, G. Baumann, and S. J. Frank.** 1998. Blockade of growth hormone receptor shedding by a metalloprotease inhibitor. *Endocrinology.* **139**:1927-35.
6. **Alexopoulou, L., M. Pasparakis, and G. Kollias.** 1997. A murine transmembrane tumor necrosis factor (TNF) transgene induces arthritis by cooperative p55/p75 TNF receptor signaling. *Eur J Immunol.* **27**:2588-2892.
7. **Arribas, J., L. Coodly, P. Vollmer, T. K. Kishimoto, S. Rose-John, and J. Massague.** 1996. Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J. Biol. Chem.* **271**:11376-82.
8. **Arribas, J., F. Lopez-Casillas, and J. Massague.** 1997. Role of the juxtamembrane domains of the transforming growth factor-alpha precursor and the beta-amyloid precursor protein in regulated ectodomain shedding. *J. Biol. Chem.* **272**:17160-17165.
9. **Arribas, J., and J. Massague.** 1995. Transforming growth factor-alpha and beta-amyloid precursor protein share a secretory mechanism. *J Cell Biol.* **124**:433-441.
10. **Bank, U., D. Reinhold, C. Schneemilch, D. Kunz, H. J. Synowitz, and S. Ansorge.** 1999. Selective proteolytic cleavage of IL-2 receptor and IL-6 receptor ligand binding chains by neutrophil-derived serine proteases at foci of inflammation. *J Interferon Cytokine Res.* **19**:1277-1287.
11. **Bauer, J., and F. Herrmann.** 1991. Interleukin-6 in clinical medicine. *Ann. Hematol.* **62**:203-210.

12. **Baumann, H., Y. Wang, K. K. Morella, C. F. Lai, H. Dams, D. J. Hilton, R. G. Hawley, and A. Mackiewicz.** 1996. Complex of the soluble IL-11 receptor and IL-11 acts as IL-6-type cytokine in hepatic and nonhepatic cells. *J. Immunol.* **157**:284-90.
13. **Bazan, J. F.** 1990. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today.* **11**:350-4.
14. **Bazan, J. F.** 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:6934-8.
15. **Bazil, V., and V. Horejsi.** 1992. Shedding of the CD44 adhesion molecule from leukocytes induced by anti-CD44 monoclonal antibody simulating the effect of a natural receptor ligand. *J Immunol.* **149**:747-53.
16. **Bazil, V., and J. L. Strominger.** 1993. CD43, the major sialoglycoprotein of human leukocytes, is proteolytically cleaved from the surface of stimulated lymphocytes and granulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:3792-6.
17. **Bazil, V., and J. L. Strominger.** 1994. Metalloprotease and serine protease are involved in cleavage of CD43, CD44, and CD16 from stimulated human granulocytes. Induction of cleavage of L-selectin via CD16. *J Immunol.* **152**:1314-22.
18. **Bazil, V., and J. L. Strominger.** 1991. Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immunol.* **147**:1567-74.
19. **Beer, S., M. Oleszewski, P. Gutwein, C. Geiger, and P. Altevogt.** 1999. Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J Cell Sci.* **112**:2667-75.
20. **Bernfield, M., and R. D. Sanderson.** 1990. Syndecan, a developmentally regulated cell surface proteoglycan that binds extracellular matrix and growth factors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **327**:171-86.
21. **Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March, and D. P. Cerretti.** 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* **385**:729-33.
22. **Black, R. A., and J. M. White.** 1998. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol.* **10**:654-9.
23. **Blobel, C. P.** 1997. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell.* **90**:589-92.

24. **Bonner, W. M., and R. A. Laskey.** 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur J Biochem.* **46**:83-8.
25. **Boulton, T. G., N. Stahl, and G. D. Yancopoulos.** 1994. Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors. *J. Biol. Chem.* **269**:11648-55.
26. **Brakebusch, C., E. E. Varfolomeev, M. Batkin, and D. Wallach.** 1994. Structural requirements for inducible shedding of the p55 tumor necrosis factor receptor. *J Biol Chem.* **269**:32488-96.
27. **Brakenhoff, J. P., F. D. de Hon, and L. A. Aarden.** 1995. Development of human IL-6 receptor antagonists. *Ann N Y Acad Sci.* **762**:129-34; discussion 135.
28. **Brandt, S. J., D. M. Bodine, C. E. Dunba, and A. W. Nienhuis.** 1990. Dysregulated interleukin 6 expression produces a syndrome resembling Castleman's disease in mice. *J. Clin. Invest.* **86**:592-599.
29. **Cerretti, D. P.** 1999. Characterization of the tumour necrosis factor alpha-converting enzyme, TACE/ADAM17. *Biochem Soc Trans.* **27**:219-23.
30. **Cerretti, D. P., R. F. DuBose, R. A. Black, and N. Nelson.** 1999. Isolation of two novel metalloproteinase-disintegrin (ADAM) cDNAs that show testis-specific gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* **263**:810-815.
31. **Chantry, A., N. A. Gregson, and P. Glynn.** 1989. A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J Biol Chem.* **264**:21603-21607.
32. **Chatis, P. A., and T. G. Morrison.** 1983. Characterization of the soluble glycoprotein released from vesicular stomatitis virus-infected cells. *J Virol.* **45**:80-90.
33. **Chitambar, C. R., and Z. Zivkovic.** 1989. Release of soluble transferrin receptor from the surface of human leukemic HL60 cells. *Blood.* **74**:602-8.
34. **Cho, C., D. O. Bunch, J. E. Faure, E. H. Goulding, E. M. Eddy, P. Primakoff, and D. G. Myles.** 1998. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science.* **281**:1857-9.
35. **Coligan, J. E.** 1991. *Current Protocols in Immunology.* Green Publishing Associates and Wiley Interscience, New York.
36. **Colotta, F., S. Orlando, E. J. Fadlon, S. Sozzani, C. Matteucci, and A. Mantovani.** 1995. Chemoattractants induce rapid release of the interleukin 1 type II decoy receptor in human polymorphonuclear cells. *J. Exp. Med.* **181**:2181-6.

37. **Crowe, P. D., B. N. Walter, K. M. Mohler, C. Otten Evans, R. A. Black, and C. F. Ware.** 1995. A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the 80-kD TNF receptor and TNF processing in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **181**:1205-10.
38. **Daeipour, M., G. Kumar, M. C. Amaral, and A. E. Nel.** 1993. Recombinant IL-6 activates p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in the IL-6 responsive B cell line, AF-10. *J. Immunol.* **150**:4743-53.
39. **Davis, S., T. H. Aldrich, N. Y. Ip, N. Stahl, S. Scherer, T. Farruggella, P. S. DiStefano, R. Curtis, N. Panayotatos, H. Gascan, S. Chevalier, and G. D. Yancopoulos.** 1993. Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science.* **259**:1736-9.
40. **del Pozo, M. A., R. Pulido, C. Munoz, V. Alvarez, A. Humbria, M. R. Campanero, and F. Sanchez-Madrid.** 1994. Regulation of ICAM-3 (CD50) membrane expression on human neutrophils through a proteolytic shedding mechanism. *Eur J Immunol.* **24**:2586-94.
41. **Deng, P., C. W. Rettenmier, and P. K. Pattengale.** 1996. Structural requirements for the ectodomain cleavage of human cell surface macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem.* **271**:16338-43.
42. **Diaz-Rodriguez, E., A. Esparis-Ogando, J. C. Montero, L. Yuste, and A. Pandiella.** 2000. Stimulation of cleavage of membrane proteins by calmodulin inhibitors. *Biochem J.* **346 Pt 2**:359-67.
43. **DiStefano, P. S., and E. M. Johnson, Jr.** 1988. Identification of a truncated form of the nerve growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**:270-4.
44. **Downing, J. R., M. F. Roussel, and C. J. Sherr.** 1989. Ligand and protein kinase C downmodulate the colony-stimulating factor 1 receptor by independent mechanisms. *Mol Cell Biol.* **9**:2890-6.
45. **Ehlers, M. R., and J. F. Riordan.** 1991. Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochemistry.* **30**:10065-10074.
46. **Ehlers, M. R., S. L. Schwager, R. R. Scholle, G. A. Manji, W. F. Brandt, and J. F. Riordan.** 1996. Proteolytic release of membrane-bound angiotensin-converting enzyme: role of the juxtamembrane stalk sequence. *Biochemistry.* **35**:9549-9559.
47. **Eugster, H. P., M. Muller, U. Karrer, B. D. Car, B. Schnyder, V. M. Eng, G. Woerly, M. Le Hir, F. di Padova, M. Aguet, R. Zinkernagel, H. Bluethmann, and B. Ryffel.** 1996. Multiple immune abnormalities in tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha double-deficient mice. *Int Immunol.* **8**:23-36.
48. **Evans, S. V.** 1993. SETOR: hardware-lighted three-dimensional solid model representations of macromolecules. *J Mol Graph.* **11**:134-8, 127-8.

49. **Evin, G., R. Cappai, Q. X. Li, J. G. Culvenor, D. H. Small, K. Beyreuther, and C. L. Masters.** 1995. Candidate gamma-secretases in the generation of the carboxyl terminus of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid: possible involvement of cathepsin D. *Biochemistry*. **34**:14185-92.
50. **Feehan, C., K. Darlak, J. Kahn, B. Walcheck, A. F. Spatola, and T. K. Kishimoto.** 1996. Shedding of the lymphocyte L-selectin adhesion molecule is inhibited by a hydroxamic acid-based protease inhibitor. Identification with an L-selectin-alkaline phosphatase reporter. *J Biol Chem*. **271**:7019-24.
51. **Fernandez-Botran, R.** 1991. Soluble cytokine receptors: their role in immunoregulation. *FASEB J*. **5**:2567-2574.
52. **Fernandez-Botran, R., and E. S. Vitetta.** 1991. Evidence that natural murine soluble interleukin 4 receptors may act as transport proteins. *J Exp Med*. **174**:673-81.
53. **Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, K. J. Kallen, J. P. J. Brakenhoff, A. Wollmer, J. Grötzinger, and S. Rose-John.** 1997. A Designer Cytokine with High Activity on Human Hematopoietic Progenitor Cells. *Nature Biotech*. **15**:142-145.
54. **Fujimoto, J., S. J. Stewart, and R. Levy.** 1984. Immunochemical analysis of the released Leu-2 (T8) molecule. *J Exp Med*. **160**:116-24.
55. **Gauldie, J., C. Richards, D. Harnish, P. Lansdorp, and H. Baumann.** 1987. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**:7251-5.
56. **Gearing, A. J., P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A. H. Davidson, A. H. Drummond, W. A. Galloway, R. Gilbert, J. L. Gordon, T. M. Leber, M. Mangan, K. Miller, P. Nayee, K. Owen, S. Patel, W. Thomas, G. Wells, L. M. Wood, and K. Woolley.** 1994. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature*. **370**:555-557.
57. **Gilpin, B. J., F. Loechel, M. G. Mattei, E. Engvall, R. Albrechtsen, and U. M. Wewer.** 1998. A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. *J Biol Chem*. **273**:157-66.
58. **Gliniak, B. C., and D. Kabat.** 1989. Leukemogenic membrane glycoprotein encoded by Friend spleen focus-forming virus: transport to cell surfaces and shedding are controlled by disulfide-bonded dimerization and by cleavage of a hydrophobic membrane anchor. *J Virol*. **63**:3561-8.
59. **Gomis-Ruth, F. X., L. F. Kress, and W. Bode.** 1993. First structure of a snake venom metalloproteinase: a prototype for matrix metalloproteinases/collagenases. *EMBO J*. **12**:4151-4157.

60. **Gomis-Ruth, F. X., L. F. Kress, J. Kellermann, I. Mayr, X. Lee, R. Huber, and W. Bode.** 1994. Refined 2.0 Å X-ray crystal structure of the snake venom zinc- endopeptidase adamalysin II. Primary and tertiary structure determination, refinement, molecular structure and comparison with astacin, collagenase and thermolysin. *J Mol Biol.* **239**:513-44.
61. **Gomis-Ruth, F. X., E. F. Meyer, L. F. Kress, and V. Politi.** 1998. Structures of adamalysin II with peptidic inhibitors. Implications for the design of tumor necrosis factor alpha convertase inhibitors. *Protein Sci.* **7**:283-92.
62. **Gould, R. J., M. A. Polokoff, P. A. Friedman, T. F. Huang, J. C. Holt, J. J. Cook, and S. Niewiarowski.** 1990. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc Soc Exp Biol Med.* **195**:168-71.
63. **Grady, E. F., S. K. Bohm, and N. W. Bunnett.** 1997. Turning off the signal: mechanisms that attenuate signaling by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol.* **273**:G586-601.
64. **Graf, D., S. Muller, U. Korthauer, C. van Kooten, C. Weise, and R. A. Kroczek.** 1995. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol.* **25**:1749-54.
65. **Grell, M., E. Douni, H. Wajant, M. Löhden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, W. Lesslauer, G. Kollias, K. Pfitzenmaier, and P. Scheurich.** 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* **83**:793-802.
66. **Gross, V., T. Andus, T. A. Tran-Thi, R. T. Schwarz, K. Decker, and P. C. Heinrich.** 1983. 1-deoxynojirimycin impairs oligosaccharide processing of alpha 1- proteinase inhibitor and inhibits its secretion in primary cultures of rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **258**:12203-9.
67. **Gruninger-Leitch, F., P. Berndt, H. Langen, P. Nelboeck, and H. Dobeli.** 2000. Identification of beta-secretase-like activity using a mass spectrometry-based assay system. *Nat Biotechnol.* **18**:66-70.
68. **Hack, C. E., E. R. De Groot, and R. J. F. Felt-Bersma.** 1989. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood.* **74**:1704-1710.
69. **Heinrich, P. C., J. V. Castell, and T. Andus.** 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* **265**:621-36.
70. **Hermann, E., B. Fleischer, W.-J. Mayet, T. Poralla, and K.-H. Meyer zum Büschenfelde.** 1989. Correlation of synovial fluid interleukin 6 (IL-6) activities with IgG concentrations in patients with inflammatory joint disease and osteoarthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **7**:411-414.
71. **Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto.** 1990. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell.* **63**:1149-57.

72. **Honda, M., S. Yamamoto, M. Cheng, K. Yasukawa, H. Suzuki, T. Saito, Y. Osugi, T. Tokunaga, and T. Kishimoto.** 1992. Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *J. Immunol.* **148**:2175-2180.
73. **Hooper, N. M., E. H. Karran, and A. J. Turner.** 1997. Membrane protein secretases. *Biochem. J.* **321**:265-279.
74. **Hooper, N. M., S. Parvathy, E. H. Karran, and A. J. Turner.** 1999. Angiotensin-converting enzyme and the amyloid precursor protein secretases. *Biochem Soc Trans.* **27**:229-34.
75. **Howard, L., X. Lu, S. Mitchell, S. Griffiths, and P. Glynn.** 1996. Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem J.* **317**:45-50.
76. **Huang, E. J., K. H. Nocka, J. Buck, and P. Besmer.** 1992. Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2. *Mol Biol Cell.* **3**:349-62.
77. **Huang, T. F., J. C. Holt, H. Lukasiewicz, and S. Niewiarowski.** 1987. Tri-gramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem.* **262**:16157-63.
78. **Iba, K., R. Albrechtsen, B. J. Gilpin, F. Loechel, and U. M. Wewer.** 1999. Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. *Am J Pathol.* **154**:1489-501.
79. **Ihle, J. N., B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, K. Yamamoto, W. E. Thierfelder, B. Kreider, and O. Silvennoinen.** 1994. Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem. Sci.* **19**:222-7.
80. **Izumi, Y., M. Hirata, H. Hasuwa, R. Iwamoto, T. Umata, K. Miyado, Y. Tama, T. Kurisaki, A. Sehara-Fujisawa, S. Ohno, and E. Mekada.** 1998. A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* **17**:7260-72.
81. **Jacob, C. O.** 1992. Tumor necrosis factor alpha in autoimmunity: pretty girl or old witch? *Immunol Today.* **13**:122-5.
82. **Jilka, R. L., G. Hangoc, G. Girasole, G. Passeri, D. C. Williams, J. S. Abrams, B. Boyce, H. Broxmeyer, and S. C. Nalagas.** 1992. Increased osteoclast development after estrogen loss: Mediation by interleukin-6. *Science.* **257**:88-91.
83. **Jones, E. Y., D. I. Stuart, and N. P. Walker.** 1989. Structure of tumour necrosis factor. *Nature.* **338**:225-228.

84. **Jones, S. A., D. Novick, S. Horiuchi, N. Yamamoto, A. J. Szalai, and G. M. Fuller.** 1999. C-reactive protein: a physiological activator of interleukin 6 receptor shedding. *J. Exp. Med.* **189**:599-604.
85. **Kahn, J., R. H. Ingraham, F. Shirley, G. I. Migaki, and T. K. Kishimoto.** 1994. Membrane proximal cleavage of L-selectin: identification of the cleavage site and a 6-kD transmembrane peptide fragment of L-selectin. *J Cell Biol.* **125**:461-70.
86. **Kallen, K.-J., J. Grötzinger, E. Lelièvre, P. Vollmer, D. Aasland, C. Renné, J. Müllberg, K.-H. Meyer zum Büschenfelde, H. Gascan, and S. Rose-John.** 1999. Receptor recognition sites of cytokines are organized as exchangeable moduls: transfer of the LIFR binding site from CNTF to IL-6. *J. Biol. Chem.* **274**:11859-11867.
87. **Kishimoto, T., S. Akira, M. Narazaki, and T. Taga.** 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood.* **86**:1243-54.
88. **Kishimoto, T. K., K. O'Connor, A. Lee, T. M. Roberts, and T. A. Springer.** 1987. Cloning of the beta subunit of the leukocyte adhesion proteins: homology to an extracellular matrix receptor defines a novel supergene family. *Cell.* **48**:681-90.
89. **Klouche, M., S. Bhakdi, M. Hemmes, and S. Rose-John.** 1999. Novel Path of activation of primary human smooth muscle cells: upregulation of gp130 creates an autocrine activation loop by IL-6 and its soluble receptor. *J. Immunol.* **163**:4583-4589.
90. **Kyhse Andersen, J.** 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.* **10**:203-9.
91. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-5.
92. **Lammers, G., and J. C. Jamieson.** 1989. Studies on the effect of lysosomotropic agents on the release of Gal beta 1-4GlcNAc alpha-2,6-sialyltransferase from rat liver slices during the acute-phase response. *Biochem J.* **261**:389-93.
93. **Lammich, S., E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass, and F. Fahrenholz.** 1999. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin/metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:3922-7.
94. **Leca, G., S. E. Mansur, and A. Bensussan.** 1995. Expression of VCAM-1 (CD106) by a subset of TCR gamma delta-bearing lymphocyte clones. Involvement of a metalloprotease in the specific hydrolytic release of the soluble isoform. *J Immunol.* **154**:1069-77.

95. **Letellier, M., T. Nakajima, G. Pulido-Cejudo, H. Hofstetter, and G. Dele-spesse.** 1990. Mechanism of formation of human IgE-binding factors (soluble CD23): III. Evidence for a receptor (Fc epsilon RII)-associated proteolytic activity. *J Exp Med.* **172**:693-700.
96. **Lin, X., G. Koelsch, S. Wu, D. Downs, A. Dashti, and J. Tang.** 2000. Hu-man aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:1456-60.
97. **Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. E. Darnell.** 1999. *Molecular Cell Biology.* W. H. Freeman And Company, New York, NY.
98. **Loechel, F., B. J. Gilpin, E. Engvall, R. Albrechtsen, and U. M. Wewer.** 1998. Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease. *J Biol Chem.* **273**:16993-7.
99. **Loechel, F., M. T. Overgaard, C. Oxvig, R. Albrechtsen, and U. M. We-wer.** 1999. Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evi-dence for a functional cysteine switch. *J Biol Chem.* **274**:13427-33.
100. **Loenen, W. A. M., E. De Vries, L. A. Gravestein, R. Q. Hintzen, R. A. W. Van Lier, and J. Borst.** 1992. The CD27 membrane receptor, a lymphocyte-specific member of the nerve growth factor family, gives rise to a soluble form by protein processing that does not involve receptor endocytosis. *Eur. J. Im-munol.* **22**:447-455.
101. **Lopez, J. A., D. W. Chung, K. Fujikawa, F. S. Hagen, T. Papayannopou-lou, and G. J. Roth.** 1987. Cloning of the alpha chain of human platelet gly-coprotein Ib: a transmembrane protein with homology to leucine-rich alpha 2-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**:5615-9.
102. **Lopez-Casillas, F., S. Cheifetz, J. Doody, J. L. Andres, W. S. Lane, and J. Massague.** 1991. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell.* **67**:785-95.
103. **Lopez-Casillas, F., J. L. Wrana, and J. Massague.** 1993. Betaglycan pre-sents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell.* **73**:1435-44.
104. **Luetteke, N. C., T. H. Qiu, R. L. Peiffer, P. Oliver, O. Smithies, and D. C. Lee.** 1993. TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell.* **73**:263-278.
105. **Lütticken, C., U. M. Wegenka, J. Yuan, J. Buschmann, C. Schindler, A. Ziemiecki, A. G. Harpur, A. F. Wilks, K. Yasukawa, T. Taga, P. C. Hein-rich, and F. Horn.** 1994. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science.* **263**:89-92.
106. **Mann, G. B., K. J. Fowler, A. Gabriel, E. C. Nice, R. L. Williams, and A. R. Dunn.** 1993. Mice with a null mutation of the TGF alpha gene have abnormal

- skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell*. **73**:249-261.
107. **Manyak, C. L., G. P. Norton, C. G. Lobe, R. C. Bleackley, H. K. Gershensfeld, I. L. Weissman, V. Kumar, N. H. Sigal, and G. C. Koo.** 1989. IL-2 induces expression of serine protease enzymes and genes in natural killer and nonspecific T killer cells. *J. Immunol.* **142**:3707-13.
108. **März, P., J.-C. Cheng, R. A. Gadiant, P. Patterson, T. Stoyan, U. Otten, and S. Rose-John.** 1998. Sympathetic Neurons can produce and respond to Interleukin-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:3251-3256.
109. **März, P., U. Otten, and S. Rose-John.** 1999. Neuronal Activities of IL-6 Type Cytokines often Depend on Soluble Cytokine Receptors. *Eur. J. Neurosci.* **11**:2995-3004.
110. **Maskos, K., C. Fernandez Catalan, R. Huber, G. P. Bourenkov, H. Bartunik, G. A. Ellestad, P. Reddy, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, B. J. Castner, R. Davis, H. R. Clarke, M. Petersen, J. N. Fitzner, D. P. Cerretti, C. J. March, R. J. Paxton, R. A. Black, and W. Bode.** 1998. Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**:3408-12.
111. **Massague, J., and A. Pandiella.** 1993. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem.* **62**:515-541.
112. **McGeehan, G. M., J. D. Becherer, R. C. Bast, Jr., C. M. Boyer, B. Champion, K. M. Connolly, J. G. Conway, P. Furdon, S. Karp, S. Kidao, A. B. McElroy, J. Nichols, M. Pryzwanszky, F. Schoenen, L. Sedut, A. Truesdale, M. Verghese, J. Warner, and J. P. Ways.** 1994. Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature.* **370**:558-561.
113. **McLane, M. A., C. Marcinkiewicz, S. Vijay-Kumar, I. Wierzbicka-Patynowski, and S. Niewiarowski.** 1998. Viper venom disintegrins and related molecules. *Proc Soc Exp Biol Med.* **219**:109-19.
114. **McMahan, C. J., J. L. Slack, B. Mosley, D. Cosman, S. D. Lupton, L. L. Brunton, C. E. Grubin, J. M. Wignall, N. A. Jenkins, C. I. Brannan, N. G. Copeland, K. Huebner, C. M. Croce, L. A. Cannizzarro, D. Benjamin, S. K. Dower, M. K. Spriggs, and J. E. Sims.** 1991. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J.* **10**:2821-32.
115. **Merlos-Suarez, A., and J. Arribas.** 1999. Mechanisms controlling the shedding of transmembrane molecules. *Biochem Soc Trans.* **27**:243-6.
116. **Migaki, G. I., J. Kahn, and T. K. Kishimoto.** 1995. Mutational analysis of the membrane-proximal cleavage site of L-selectin: relaxed sequence specificity surrounding the cleavage site. *J Exp Med.* **182**:549-557.

117. **Moss, M. L., S. L. Jin, M. E. Milla, D. M. Bickett, W. Burkhart, H. L. Carter, W. J. Chen, W. C. Clay, J. R. Didsbury, D. Hassler, C. R. Hoffman, T. A. Kost, M. H. Lambert, M. A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L. K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J. L. Su, J. Warner, D. Willard, and J. D. Becherer.** 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature*. **385**:733-736.
118. **Mostov, K. E., J. P. Kraehenbuhl, and G. Blobel.** 1980. Receptor-mediated transcellular transport of immunoglobulin: synthesis of secretory component as multiple and larger transmembrane forms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **77**:7257-61.
119. **Müllberg, J., K. Althoff, T. Jostock, and S. Rose-John.** 2000. The Importance of Shedding of Membrane Proteins for Cytokine Biology. *Eur. Cyt. Netw.* **in press**.
120. **Müllberg, J., E. Dittrich, L. Graeve, C. Gerhartz, K. Yasukawa, T. Taga, T. Kishimoto, P. C. Heinrich, and S. Rose-John.** 1993. Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor. *FEBS Lett*. **332**:174-8.
121. **Müllberg, J., F. H. Durie, C. Otten Evans, M. R. Alderson, S. Rose-John, D. Cosman, R. A. Black, and K. M. Mohler.** 1995. A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor. *J. Immunol*. **155**:5198-205.
122. **Müllberg, J., W. Oberthur, F. Lottspeich, E. Mehl, E. Dittrich, L. Graeve, P. C. Heinrich, and S. Rose-John.** 1994. The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J. Immunol*. **152**:4958-68.
123. **Müllberg, J., C. T. Rauch, M. F. Wolfson, B. Castner, J. N. Fitzner, C. Otten Evans, K. M. Mohler, D. Cosman, and R. A. Black.** 1997. Further evidence for a common mechanism for shedding of cell surface proteins. *FEBS Lett*. **401**:235-8.
124. **Müllberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich, and S. Rose-John.** 1993. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol*. **23**:473-80.
125. **Müllberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, P. C. Heinrich, and S. Rose-John.** 1992. Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **189**:794-800.
126. **Murakami, M., M. Hibi, N. Nakagawa, T. Nakagawa, K. Yasukawa, K. Yamaniishi, T. Taga, and T. Kishimoto.** 1993. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science*. **260**:1808-10.
127. **Nakajima, T., S. Kinoshita, T. Sasagawa, K. Sasaki, M. Naruto, T. Kishimoto, and S. Akira.** 1993. Phosphorylation at threonine-235 by a ras-

- dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:2207-11.
128. **Nishiyama, A., X. H. Lin, and W. B. Stallcup.** 1995. Generation of truncated forms of the NG2 proteoglycan by cell surface proteolysis. *Mol Biol Cell.* **6**:1819-32.
129. **Old, L. J.** 1985. Tumor necrosis factor (TNF). *Science.* **230**:630-2.
130. **Overell, R. W., K. E. Weissner, and D. Cosman.** 1988. Stably transmitted triple-promoter retroviral vectors and their use in transformation of primary mammalian cells. *Mol Cell Biol.* **8**:1803-8.
131. **Owczarek, C. M., M. J. Layton, L. G. Robb, N. A. Nicola, and C. G. Begley.** 1996. Molecular basis of the soluble and membrane-bound forms of the murine leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain. Expression in normal, gestating, and leukemia inhibitory factor nullizygous mice. *J. Biol. Chem.* **271**:5495-504.
132. **Pan, D., and G. M. Rubin.** 1997. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell.* **90**:271-280.
133. **Pandiella, A., M. W. Bosenberg, E. J. Huang, P. Besmer, and J. Massague.** 1992. Cleavage of membrane-anchored growth factors involves distinct protease activities regulated through common mechanisms. *J Biol Chem.* **267**:24028-33.
134. **Partanen, J., T. P. Makela, R. Alitalo, H. Lehvaslaiho, and K. Alitalo.** 1990. Putative tyrosine kinases expressed in K-562 human leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **87**:8913-7.
135. **Pearson, D. C., Jr., E. L. Gross, and E. S. David.** 1996. Electrostatic properties of cytochrome c: implications for docking with plastocyanin. *Biophys J.* **71**:64-76.
136. **Perez, C., I. Albert, K. DeFay, N. Zachariades, L. Gooding, and M. Kriegler.** 1990. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell.* **63**:251-8.
137. **Peschon, J. J., J. L. Slack, P. Reddy, K. L. Stocking, S. W. Sunnarborg, D. C. Lee, W. E. Russell, B. J. Castner, R. S. Johnson, J. N. Fitzner, R. W. Boyce, N. Nelson, C. J. Kozlosky, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, D. P. Cerretti, R. J. Paxton, C. J. March, and R. A. Black.** 1998. An Essential Role for Ectodomain Shedding in Mammalian Development. *Science.* **282**:1281-1284.
138. **Peters, M., A. Müller, and S. Rose-John.** 1998. Interleukin-6 and soluble Interleukin-6 Receptor: Direct Stimulation of gp130 and Hematopoiesis. *Blood.* **92**:3495-3504.

139. **Peters, M., P. Schirmacher, J. Goldschmitt, M. Odenthal, C. Peschel, H. P. Dienes, E. Fattori, G. Ciliberto, K. H. Meyer zum Büschenfelde, and S. Rose-John.** 1997. Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in IL-6/sIL-6R double transgenic mice. *J. Exp. Med.* **185**:755-766.
140. **Poli, G., P. Bressler, A. Kinter, E. Duh, W. C. Timmer, A. Rabson, J. S. Justement, S. Stanley, and A. S. Fauci.** 1990. Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J. Exp. Med.* **172**:151-8.
141. **Poli, V., F. P. Mancini, and R. Cortese.** 1990. IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signaltransduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell.* **63**:643-53.
142. **Porteu, F., M. Brockhaus, D. Wallach, H. Engelmann, and C. F. Nathan.** 1991. Human neutrophil elastase releases a ligand-binding fragment from the 75-kDa tumor necrosis factor. *J Biol Chem.* **266**:18846-53.
143. **Price, D. L., V. E. Koliatsos, S. S. Sisodia, E. H. Koo, L. J. Martin, L. C. Walker, M. D. Appelgate, and L. C. Cork.** 1991. Amyloid-related proteins and nerve growth factor in Alzheimer's disease and animal models. *Clin Neuropharmacol.* **14 Suppl 1**:S9-14.
144. **Qi, H., M. D. Rand, X. Wu, N. Sestan, W. Wang, P. Rakic, T. Xu, and S. Artavanis-Tsakonas.** 1999. Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 1999. **283**:91-4.
145. **Ravetch, J. V., and B. Perussia.** 1989. Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med.* **170**:481-97.
146. **Robache-Gallea, S., V. Morand, J. M. Bruneau, B. Schoot, E. Tagat, E. Realo, S. Chouaib, and S. Roman-Roman.** 1995. In vitro processing of human tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* **270**:23688-92.
147. **Robb, R. J., and R. M. Kutny.** 1987. Structure-function relationships for the IL 2-receptor system. IV. Analysis of the sequence and ligand-binding properties of soluble Tac protein. *J Immunol.* **139**:855-62.
148. **Robinson, P. J.** 1987. Two different biosynthetic pathways for the secretion of Qa region-associated class I antigens by mouse lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**:527-31.
149. **Roghani, M., J. D. Becherer, M. L. Moss, R. E. Atherton, H. Erdjument-Bromage, J. Arribas, R. K. Blackburn, G. Weskamp, P. Tempst, and C. P. Blobel.** 1999. Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *Biol Chem.* **274**:3531-40.

150. **Romano, M., M. Sironi, C. Toniatti, N. Polentarutti, P. Fruscella, P. Ghezzi, R. Faggioni, W. Luini, V. van Hinsbergh, S. Sozzani, F. Bussolino, V. Poli, G. Ciliberto, and A. Mantovani.** 1997. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*. **6**:315-325.
151. **Rose-John, S., and P. C. Heinrich.** 1994. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem. J.* **300**:281-90.
152. **Rose-John, S., P. Vollmer, P. Peters, P. März, and J. Müllberg.** 1998. The Interleukin-6 Family: Biological Function of the Soluble Receptors. *In* M. M. Eibl, C. Huber, H. H. Peter, and U. Wahn (ed.), *Symposium in Immunology VIII*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
153. **Rosendahl, M. S., S. C. Ko, D. L. Long, M. T. Brewer, B. Rosenzweig, E. Hedl, L. Anderson, S. M. Pyle, J. Moreland, M. A. Meyers, T. Kohno, D. Lyons, and H. S. Lichenstein.** 1997. Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. *J. Biol. Chem.* **272**:24588-93.
154. **Sadhukhan, R., K. R. Santhamma, P. Reddy, J. J. Peschon, R. A. Black, and I. Sen.** 1999. Unaltered cleavage and secretion of angiotensin-converting enzyme in tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme-deficient mice. *J Biol Chem.* **274**:10511-6.
155. **Sadhukhan, R., G. C. Sen, R. Ramchandran, and I. Sen.** 1998. The distal ectodomain of angiotensin-converting enzyme regulates its cleavage-secretion from the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:138-43.
156. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
157. **Sarmay, G., Z. Rozsnyay, I. Szabo, A. Biro, and J. Gergely.** 1991. Modulation of type II Fc gamma receptor expression on activated human B lymphocytes. *Eur J Immunol.* **21**:541-9.
158. **Satoh, T., M. Nakafuku, and Y. Kaziro.** 1992. Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *J Biol Chem.* **267**:24149-52.
159. **Schlondorff, J., and C. P. Blobel.** 1999. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci.* **112**:3603-17.
160. **Schwager, S. L., A. J. Chubb, R. R. Scholle, W. F. Brandt, C. Eckerskorn, E. D. Sturrock, and M. R. Ehlers.** 1998. Phorbol ester-induced juxtamembrane cleavage of angiotensin-converting enzyme is not inhibited by a stalk containing intrachain disulfides. *Biochemistry.* **37**:15449-56.

161. **Selkoe, D. J.** 1996. Amyloid β -Protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **271**:18295-18298.
162. **Shuai, K., C. M. Horvath, L. H. Huang, S. A. Qureshi, D. Cowburn, and J. E. J. Darnell.** 1994. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell.* **76**:821-8.
163. **Sinha, S., J. P. Anderson, R. Barbour, G. S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H. F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, K. Jacobson-Croak, N. Jewett, P. Keim, J. Knops, I. Lieberburg, M. Power, H. Tan, G. Tatsuno, J. Tung, D. Schenk, P. Seubert, S. M. Suomensaaari, S. Wang, D. Walker, V. John, and et al.** 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain [see comments]. *Nature.* **402**:537-40.
164. **Stahl, N., T. J. Farruggella, T. G. Boulton, Z. Zhong, J. E. Darnell, Jr., and G. D. Yancopoulos.** 1995. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science.* **267**:1349-53.
165. **Stöcker, W., F. Grams, U. Baumann, P. Reinemer, F. X. Gomis-Ruth, D. B. McKay, and W. Bode.** 1995. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* **4**:823-40.
166. **Stoyan, T., U. Michaelis, H. Schooltink, M. Van Dam, R. Rudolph, P. C. Heinrich, and S. Rose-John.** 1993. Recombinant soluble human interleukin-6 receptor. Expression in *Escherichia coli*, renaturation and purification. *Eur. J. Biochem.* **216**:239-45.
167. **Suematsu, S., T. Matsusaka, T. Matsuda, S. Ohno, J.-I. Miyazaki, K.-I. Yamamura, T. Hirano, and T. Kishimoto.** 1992. Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**:232-235.
168. **Sui, X., K. Tsuji, R. Tanaka, S. Tajima, K. Muraoka, Y. Ebihara, K. Ikebuchi, K. Yasukawa, T. Taga, T. Kishimoto, and T. Nakahata.** 1995. gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:2859-63.
169. **Taga, T., M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano, and T. Kishimoto.** 1989. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell.* **58**:573-81.
170. **Taga, T., and T. Kishimoto.** 1997. gp130 and the Interleukin-6 Family of Cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:797-819.
171. **Tanaka, M., T. Itai, M. Adachi, and S. Nagata.** 1998. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med.* **4**:31-36.

172. **Tanaka, M., T. Suda, T. Takahashi, and S. Nagata.** 1995. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *Embo J.* **14**:1129-35.
173. **Tang, P., M. C. Hung, and J. Klostergaard.** 1996. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry.* **35**:8216-25.
174. **Tang, P., M. C. Hung, and J. Klostergaard.** 1996. Length of the linking domain of human pro-tumor necrosis factor determines the cleavage processing. *Biochemistry.* **35**:8226-33.
175. **Tiesman, J., and C. E. Hart.** 1993. Identification of a soluble receptor for platelet-derived growth factor in cell-conditioned medium and human plasma. *J Biol Chem.* **268**:9621-8.
176. **Van Wart, H. E., and H. Birkedal-Hansen.** 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**:5578-82.
177. **Vassar, R., B. D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E. A. Mendiaz, P. Denis, D. B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M. A. Jarosinski, A. L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J. C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, and M. Citron.** 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE [see comments]. *Science.* **286**:735-41.
178. **Vollmer, P., I. Walev, S. Rose-John, and S. Bhakdi.** 1996. Novel pathogenic mechanism of microbial metalloproteinases: liberation of membrane-anchored molecules in biologically active form exemplified by studies with the human interleukin-6 receptor. *Infect. Immun.* **64**:3646-51.
179. **Walev, I., P. Vollmer, M. Palmer, S. Bhakdi, and S. Rose-John.** 1996. Pore-forming toxins trigger shedding of receptors for interleukin 6 and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:7882-7887.
180. **Watanabe, N., K. Nakada, and Y. Kobayashi.** 1998. Processing and release of tumor necrosis factor alpha. *Eur J Biochem.* **253**:576-82.
181. **Wegenka, U. M., J. Buschmann, C. Lütticken, P. C. Heinrich, and F. Horn.** 1993. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the post-translational level. *Mol Cell Biol.* **13**:276-88.
182. **Wilks, A.** 1989. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **86**:1603-7.
183. **Wolfsberg, T. G., P. Primakoff, D. G. Myles, and J. M. White.** 1995. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And

- Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol.* **131**:275-8.
184. **Wolfsberg, T. G., P. D. Straight, R. L. Gerena, A. P. Huovila, P. Primakoff, D. G. Myles, and J. M. White.** 1995. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol.* **169**:278-83.
185. **Wolfsberg, T. G., and J. M. White.** 1996. ADAMs in Fertilization and Development. *Dev. Biol.* **180**:389-401.
186. **Yamamoto, S., Y. Higuchi, K. Yoshiyama, E. Shimizu, M. Kataoka, N. Hijiya, and K. Matsuura.** 1999. ADAM family proteins in the immune system. *Immunol Today.* **20**:278-84.
187. **Yamasaki, K., T. Taga, Y. Hirata, H. Yawata, Y. Kawanishi, B. Seed, T. Taniguchi, T. Hirano, and T. Kishimoto.** 1988. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science.* **241**:825-8.
188. **Yan, R., M. J. Bienkowski, M. E. Shuck, H. Miao, M. C. Tory, A. M. Pauley, J. R. Brashier, N. C. Stratman, W. R. Mathews, A. E. Buhl, D. B. Carter, A. G. Tomasselli, L. A. Parodi, R. L. Heinrikson, and M. E. Gurney.** 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta- secretase activity [see comments]. *Nature.* **402**:533-7.
189. **Yavari, R., C. Adida, P. Bray-Ward, M. Brines, and T. Xu.** 1998. Human metalloprotease-disintegrin Kuzbanian regulates sympathoadrenal cell fate in development and neoplasia. *Hum Mol Genet.* **7**:1161-7.
190. **Yuan, R., P. Primakoff, and D. G. Myles.** 1997. A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. *J Cell Biol.* **137**:105-12.
191. **Zhang, Z., J. K. Kolls, P. Oliver, D. Good, P. O. Schwarzenberger, M. S. Joshi, J. L. Ponthier, and J. R. Lancaster.** 2000. Activation of Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme-mediated Ectodomain Shedding by Nitric Oxide. *J Biol Chem.*
192. **Zolkiewska, A.** 1999. Disintegrin-like/Cysteine-rich region of ADAM 12 is an active cell adhesion domain. *Exp Cell Res.* **252**:423-431.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

A β	β -Amyloid Peptid
ACE	„Angiotensin Converting Enzyme“, Angiotensin-konvertierendes Enzym
ADAM	“A Disintegrin and Metalloprotease Domain”
ANF	„Atrial Natriuretic Factor“
APP	“Amyloid Precursor Protein”, Amyloid-Vorläufer-Protein
CD	„Cluster of Differentiation“
CNTF	„Ciliary Neurotrophic Factor“
CRP	C-reaktives Protein
CSF	“Colony Stimulating Factor”
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	„Epidermal Growth Factor“, epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	“enzyme-Linked Immunosorbent Assay”, Enzymgekoppelter Festphasenimmunotest
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötale Kälberserum
g	Mikrogramm
G-CSF	„Granulocyte-Colony Stimulating Factor“
GH	“Growth Hormone”, Wachstumshormon
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
HB-EGF	Heparin bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor
HRF	Hämatopoetische Rezeptorfamilie
ICAM	“Intracellular Cell-Adhesion Molecule”
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KUZ	Kuzbanian
l	Liter
LIF	„Leukaemia Inhibitory Factor“, Leukämie inhibierender Faktor
m	milli
μ	mikro
M	mol/l
MADM	„Mammalian Disintegrin-Metalloprotease“
MAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDC	Metalloprotease/Disintegrin/Cysteinreiches Protein
MHC	“Major Histocompatibility Complex”, Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
mRNA	„Messenger“ Ribonukleinsäure
n	nanno
NaCl	Natriumchlorid
NF	nukleärer Faktor

NGF	“Nerve Growth Factor”, Nervenwachstumsfaktor
OSM	Oncostatin M
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
PDGF	“Platelet-Derived Growth Factor”
pg	Pikogramm
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PNGaseF	Peptid N-Glykosidase F
POD	Peroxidase
R	Rezeptor
RAS	“Rat Sarcoma protein”
S	Schwefel
SDS	„Sodiumdodecylsulfate“
STAT	„Signal Transducer and Activator of Transcription“
TACE	“TNF Alpha Converting Enzyme”, TNF α konvertierendes Enzym
TAPI	TNF Alpha Proteaseinhibitor
TGF	„Tumor Growth Factor“, Tumorwachstumsfaktor
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U	“Unit”, Einheit
VCAM	“Vascular Cell-Adhesion Molecule”, vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VSV	“Vesicular-Stomatitis Virus”
Zn	Zink

7.2 Abkürzungen der Aminosäuren

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