

**Die proteolytische Entstehung  
des löslichen Interleukin-2 alpha-Rezeptors**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von M.Sc. Sophia Marie Dahl, geb. Kirschke  
geb. am 01.09.1992 in Berlin

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Garbers

Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

eingereicht am: 16.06.2023

verteidigt am: 23.10.2023

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Das Zytokin Interleukin-2 und dessen biologische Funktionen .....	1
1.2. Struktur des IL-2 und IL-2-Rezeptors .....	3
1.2.1. Der IL-2-Rezeptor (IL-2R) .....	4
1.2.2. IL-2R-Komplexe .....	7
1.3. <i>Cis-/trans</i> -Präsentation des IL-2R .....	8
1.4. IL-2-Signaltransduktion über den IL-2R.....	9
1.5. Der lösliche IL-2R $\alpha$ (sIL-2R $\alpha$ ) .....	12
1.6. Proteolytisches <i>Shedding</i> zur Generierung löslicher Rezeptoren.....	14
1.7. ADAM-Proteasen.....	15
1.7.1. ADAM10 .....	17
1.7.2. ADAM17 .....	18
1.8. Ziel der Arbeit.....	19
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1. Material.....	21
2.1.1. Antibiotika .....	21
2.1.2. Antikörper .....	21
2.1.3. Chemikalien .....	22
2.1.4. Enzyme und dazugehörige Puffer .....	23
2.1.5. Geräte.....	24
2.1.6. Größenmarker und Ladepuffer .....	25
2.1.7. Inhibitoren und Aktivatoren.....	25
2.1.8. Kits .....	26
2.1.9. Kulturmedien und -reagenzien .....	26
2.1.10. Mausseren .....	27
2.1.11. Plasmide .....	27
2.1.12. Primer .....	29
2.1.13. Puffer und Lösungen .....	30

---

2.1.14.	Rekombinante Zytokine und Rezeptoren .....	32
2.1.15.	Verbrauchsmaterialien.....	32
2.1.16.	Zelllinien und Bakterien.....	33
2.2.	Methoden.....	34
2.2.1.	Molekularbiologische Methoden .....	34
2.2.2.	Zellbiologische Methoden .....	39
2.2.3.	Protein-biochemische Methoden .....	44
2.2.4.	Statistische Analysen.....	50
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
3.1.	Generierung des Expressionsplasmids für den IL-2R $\alpha$ .....	51
3.2.	IL-2R $\alpha$ wird konstitutiv durch ADAM-Proteasen geschnitten.....	52
3.3.	Stimulation von ADAM10 und ADAM17 steigert das IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> .....	56
3.4.	Generierung von Expressionsplasmiden mit Deletionen im membranproximalen IL-2R $\alpha$ - <i>Stalk</i> -Bereich zur Analyse von Protease-Schnittstellen.....	63
3.5.	IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> hängt von der Rezeptor- <i>Stalk</i> -Region ab.....	66
3.6.	Generierung von Expressionsplasmiden zur Analyse von möglichen Protease-Schnittstellen im membrandistalen IL-2R $\alpha$ - <i>Stalk</i> -Bereich .....	73
3.7.	Blockierung von IL-2-Signalwegkomponenten hat keinen Einfluss auf das IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> .....	79
3.8.	IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> in aktivierten T-Zellen ist ADAM10- und ADAM17-reguliert.....	81
3.9.	Der sIL-2R $\alpha$ inhibiert STAT5-Phosphorylierung in naiven T-Zellen .....	86
3.10.	ADAM10 ist am IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding in vivo</i> beteiligt .....	87
3.11.	Rezeptor-Glykosylierungen beeinflussen bedingt das IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> .....	89
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>93</b>
4.1.	Der IL-2/IL-2R-Signalweg.....	93
4.2.	Identifizierung des IL-2R $\alpha$ als Substrat von ADAM10 und ADAM17 .....	94
4.3.	Der IL-2R $\alpha$ - <i>Stalk</i> -Bereich ist ein essentieller Faktor für die Proteolyse.....	97
4.4.	Inhibierungen von Komponenten der JAK/STAT-, MAPK- und PI3K/Akt-Signalwege haben keinen Einfluss auf die IL-2R $\alpha$ -Proteolyse.....	100
4.5.	Einfluss von Rezeptorglykosylierungen auf das IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> .....	101
4.6.	Der lösliche IL-2R $\alpha$ wirkt antagonistisch auf den IL-2-Signalweg .....	102
4.7.	ADAM10 ist signifikante <i>Sheddase</i> im konstitutiven IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> in Mäusen...104	
4.8.	Ausblick .....	106
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>108</b>
<b>6.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>109</b>

---

<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>110</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>132</b>
8.1. pcDNA3.1-myc-hIL-2R $\alpha$ .....	132
8.2. Aminosäuresequenzen der generierten IL-2R $\alpha$ -Deletionsvarianten.....	133
8.2.1. IL-2R $\alpha$ $\Delta$ E187-Q240 .....	133
8.2.2. IL-2R $\alpha$ $\Delta$ E231-Q240 .....	133
8.2.3. IL-2R $\alpha$ $\Delta$ Q221-M230.....	134
8.2.4. IL-2R $\alpha$ $\Delta$ T211-F220 .....	134
8.2.5. IL-2R $\alpha$ $\Delta$ A201-E210.....	135
8.2.6. IL-2R $\alpha$ $\Delta$ S191-Q200 .....	135
8.2.7. IL-2R $\alpha$ $\Delta$ E187-T190 .....	136
8.2.8. IL-2R $\alpha$ $\Delta$ E187-E210 .....	136
8.3. Publikationen .....	137
8.4. Ehrenerklärung.....	138

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung und Aminosäuresequenz des humanen IL-2R $\alpha$ .....	5
Abb. 2:	Schematische Darstellung des monomeren, dimeren und trimeren IL-2R.....	8
Abb. 3:	Vereinfachte Darstellung der <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Präsentationen des IL-2R $\alpha$ .....	9
Abb. 4:	Schematische Darstellung IL-2-induzierter Signalwege .....	11
Abb. 5:	Mögliche Mechanismen der sIL-2R $\alpha$ -Funktion.....	13
Abb. 6:	Vereinfachte schematische Darstellung zweier Mechanismen zur Generierung eines löslichen Rezeptors .....	14
Abb. 7:	Vereinfachte schematische Darstellung des Aufbaus von ADAM-Proteasen .....	16
Abb. 8:	Generierung des Expressionsplasmids für den IL-2R $\alpha$ .....	51
Abb. 9:	Konstitutives IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> in HEK293-Zellen wird durch ADAM-Proteasen reguliert .....	53
Abb. 10:	Defizienz von ADAM10 und ADAM17 in HEK293-Zellen führt zu reduziertem IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> .....	54
Abb. 11:	IL-2R $\alpha$ wird in HDLM-2-Zellen konstitutiv von ADAM-Proteasen geschnitten .....	55
Abb. 12:	Stimulation von ADAM10 und ADAM17 steigert das IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> in HEK293-Zellen.....	56
Abb. 13:	Aktivierungen von ADAM10 und ADAM17 steigern in HEK293-KO-Zelllinien das IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> .....	58
Abb. 14:	Inhibierung von ADAM10 und ADAM17 reduzieren in Ionomycin- und PMA-stimulierten HEK293-KO-Zelllinien das IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> .....	60
Abb. 15:	ADAM17 ist die hauptverantwortliche Protease im induzierten IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> . 62	
Abb. 16:	Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 hat in HDLM-2-Zellen keinen Einfluss auf IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> .....	63
Abb. 17:	Aminosäuresequenz des IL-2R $\alpha$ .....	64
Abb. 18:	Generierung von IL-2R $\alpha$ -Expressionsplasmiden mit Deletionen im membranproximalen <i>Stalk</i> -Bereich.....	65
Abb. 19:	Oberflächenexpression des IL-2R $\alpha$ ist unabhängig von Deletionen im Rezeptor- <i>Stalk</i> -Bereich .....	67
Abb. 20:	IL-2R $\alpha$ - <i>Stalk</i> -Bereich ist notwendig für ADAM10- und ADAM17-reguliertes <i>Shedding</i> .....	68
Abb. 21:	Deletion des IL-2R $\alpha$ - <i>Stalk</i> -Bereichs verhindert in HEK293-KO-Linien das IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> .....	69
Abb. 22:	Deletion des IL-2R $\alpha$ - <i>Stalk</i> -Bereichs in HEK293-KO-Linien führt zu ausbleibendem IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> .....	70
Abb. 23:	Deletierter <i>Stalk</i> -Bereich verhindert IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> stimulierter HEK293-Zellen 72	
Abb. 24:	Generierung von IL-2R $\alpha$ $\Delta$ -Expressionsplasmiden mit Deletionen im membrandistalen IL-2R $\alpha$ - <i>Stalk</i> -Bereich.....	74
Abb. 25:	Deletionen im membrandistalen Rezeptor- <i>Stalk</i> -Bereich haben keinen Einfluss auf die IL-2R $\alpha$ -Oberflächenexpression .....	75
Abb. 26:	Deletion der 24 membrandistalen AS in der IL-2R $\alpha$ - <i>Stalk</i> -Region verhindert IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> .....	77
Abb. 27:	$\Delta$ E187-E210 verhindert ADAM10- und ADAM17-stimuliertes IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> .....	78

---

Abb. 28: Inhibierung von IL-2-Signalwegkomponenten beeinflusst nicht das IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> in HDLM-2-Zellen .....	80
Abb. 29: <i>In vitro</i> -Aktivierung von Jurkat-Zellen führt zu gesteigerter IL-2R $\alpha$ -Oberflächenexpression .....	82
Abb. 30: IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> wird in aktivierten Jurkat-Zellen durch Inhibierung von Metalloproteasen reduziert.....	83
Abb. 31: <i>In vitro</i> -Aktivierung und Stimulation primärer humaner CD3 <sup>+</sup> T-Zellen steigert die IL-2R $\alpha$ -Oberflächenexpression .....	84
Abb. 32: ADAM10 und ADAM17 sind Hauptregulatoren des IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> in primären humanen CD3 <sup>+</sup> T-Zellen .....	85
Abb. 33: Löslicher IL-2R $\alpha$ inhibiert IL-2-Signalweg in naiven humanen CD3 <sup>+</sup> T-Zellen.....	86
Abb. 34: IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding in vivo</i> ist ADAM10-reguliert .....	88
Abb. 35: Deglykosylierung des IL-2R $\alpha$ .....	90
Abb. 36: IL-2R $\alpha$ - <i>Shedding</i> wird durch Fehlen der N70-Glykosylierung und der T224/T229/T237-O-Glykane reduziert .....	91
Abb. 37: Schematische Abbildung der generierten IL-2R $\alpha$ -Deletionsvarianten und die Auswirkung der Deletionen auf das <i>Shedding</i> der Varianten .....	99

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Verwendete Antibiotika.....	21
Tab. 2:	Verwendete primäre Antikörper .....	21
Tab. 3:	Liste der verwendeten sekundären Antikörper.....	22
Tab. 4:	Liste der verwendeten Chemikalien .....	22
Tab. 5:	Verwendete Enzyme und dazugehörige Puffer.....	23
Tab. 6:	Liste der verwendeten Geräte .....	24
Tab. 7:	Verwendete Größenmarker und Ladepuffer.....	25
Tab. 8:	Verwendete Protease-Inhibitoren und -Aktivatoren .....	25
Tab. 9:	Verwendete Signalweg-Inhibitoren.....	25
Tab. 10:	Verwendete Kits.....	26
Tab. 11:	Bakterienmedium und -reagenzien .....	26
Tab. 12:	Zellkulturmedien und -reagenzien .....	26
Tab. 13:	Im Rahmen dieser Arbeit selbst hergestellte Plasmide.....	27
Tab. 14:	Weitere im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide.....	28
Tab. 15:	Verwendete Primer .....	29
Tab. 16:	Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.....	30
Tab. 17:	Puffer und Lösungen für Zellyse und Zellkultur.....	30
Tab. 18:	Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie .....	30
Tab. 19:	Puffer und Lösungen für MACS .....	30
Tab. 20:	Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	31
Tab. 21:	Puffer und Lösungen für den Western Blot.....	31
Tab. 22:	Verwendete Zytokine und Rezeptoren.....	32
Tab. 23:	Liste der Verbrauchsmaterialien .....	32
Tab. 24:	Verwendete Zelllinien und Bakterien .....	33
Tab. 25:	Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	40
Tab. 26:	Ansätze für die Deglykosylierung .....	47
Tab. 27:	Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE.....	47

## Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
AK	Antikörper
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DKO	Doppel-Knockout
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Scanning</i>
f.c.	<i>Final concentration</i>
$\gamma_c$	<i>Common gamma chain</i>
h	Stunde(n)
IL-2	Interleukin-2
IL-2R	Interleukin-2-Rezeptor
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
min	Minute(n)
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pg	Pikogramm
PVDF	Polyvinylidenfluorid
g	G-Zahl, Beschleunigungsgröße der Zentrifugen
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
U	<i>Units</i>



ÜN	über Nacht
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/V	Gewicht pro Volumen

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Zytokin Interleukin-2 und dessen biologische Funktionen

Interleukine stellen eine große Untergruppe der Zytokine dar. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems, indem sie die Entwicklung und Funktion von Immunzellen beeinflussen und damit die Immunregulation und Pathogenese sowie Modulation und Behandlung von Immunkrankheiten lenken können. Die Benennung als Interleukine sollte dabei die Wichtigkeit dieser Faktoren in der Kommunikation zwischen Leukozyten verdeutlichen (Thomson & Lotze, 2003). Obwohl der Begriff heutzutage weiterhin besteht, wird die Beschreibung inzwischen als inakkurat betrachtet, da Interleukine in vielen Fällen auch von anderen Zellen als Leukozyten produziert werden (O'Shea et al., 2019).

Interleukin-2 (IL-2) ist eines der am besten untersuchten Zytokine und gilt als einer der wichtigsten Regulatoren des Immunsystems. Es wurde 1976 zunächst als Mediator des Wachstums und der Proliferation von T-Zellen identifiziert (Morgan et al., 1976), bevor es durch seine vielfältigen regulatorischen Funktionen im Wachstum und Überleben, der Proliferation und der Differenzierung diverser Immunzellen zu einem der signifikantesten Zytokine in der Regulation des Immunsystems eingeordnet wurde. IL-2 induziert dabei nicht nur die Proliferation von T-Zellen und NK-Zellen und erhöht ihre zytolytische Aktivität (Siegel et al., 1987; O'Shea et al., 2019), es ist zudem auch ein wichtiger Faktor für die Expansion von CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen bei Virusinfektionen (Hunter, 2005). Es verstärkt darüber hinaus die Antikörperproduktion und Proliferation von B-Zellen (Mingari et al., 1984) und trägt zur Verstärkung der Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ )-Produktion bei (O'Shea et al., 2019), was sich wiederum durch seine immunstimulierende sowie antivirale und antitumorale Wirkung auszeichnet (Samuel, 2001; Parker et al., 2016; Medrano et al., 2017). Durch Induktion von Fas- und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-abhängigen Mechanismen spielt IL-2 zudem eine wesentliche Rolle in der Sensibilisierung von T-Zellen gegenüber Aktivierungs-induziertem Zelltod (*activation-induced cell death*, AICD) (Green et al., 2003), einem wichtigen Faktor zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase und Beseitigung potenziell autoreaktiver Zellen (Lenardo et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass eine *in vitro*-Behandlung mit IL-2 in T-Zellen zur Hochregulierung der Expression von Fas-Liganden und des TNF- $\alpha$ -Rezeptors mit gleichzeitiger Herunterregulierung des Caspase-Inhibitors c-FLIP (*cellular FLICE-like inhibitory*

*protein*) und damit zur Sensibilisierung für AICD führt (Lenardo, 1991; Refaeli et al., 1998; Zheng et al., 1998; Nelson, 2004). Besonders aber der Einfluss auf die T-Zell-Differenzierung in T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen) und vor allem die Regulation von Entwicklung, Überleben, Aufrechterhaltung und Homöostase regulatorischer T-Zellen (T<sub>reg</sub>-Zellen) (Fontenot et al., 2005; Waldmann, 2006; Malek & Castro, 2010; Li & Rudensky, 2016) geben dem IL-2 einen besonderen Stellenwert in der Regulation der Immuntoleranz (Setoguchi et al., 2005; Sakaguchi et al., 2008; Shevach, 2009; Littman & Rudensky, 2010; Boyman & Sprent, 2012; Spolski et al., 2018), so dass es auch als geeignetes Mittel zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten angesehen wird (Sharabi et al., 2018). Es konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von T<sub>reg</sub>-Zellen mit einer Vielzahl spezifischer Autoimmunkrankheiten und Entzündungen assoziiert ist (Moraes-Vasconcelos et al., 2008; Godfrey et al., 1991), was das therapeutische Potenzial von T<sub>reg</sub>-Zellen verdeutlicht, um Krankheiten mit einer gestörten Balance zwischen Effektor-T-Zellen und T<sub>reg</sub>-Zellen zu behandeln (Sakaguchi et al., 2012; Shevach & Thornton, 2014). Neben der Generation von T<sub>reg</sub>-Zellen beeinflusst IL-2 die Differenzierung in T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-, T<sub>H</sub>9-, T<sub>H</sub>17- und T<sub>FH</sub>-Zellen. So reguliert IL-2 die Rezeptorexpression heterologer Zytokine wie IL-4 (Cote-Sierra et al., 2004; Liao et al., 2008) und IL-12 (Liao et al., 2011b), um die Differenzierung in T<sub>H</sub>2- oder T<sub>H</sub>1-Zellen zu fördern und stellt darüber hinaus einen essentiellen Faktor für die Induktion der T<sub>H</sub>9-Differenzierung dar (Liao et al., 2014). Im Gegensatz dazu blockiert IL-2 die Expression des IL-6R $\alpha$  und gp130 (Liao et al., 2011b) und inhibiert damit die Differenzierung in T<sub>H</sub>17-Zellen (Laurence et al., 2007). Der IL-2-Signalweg induziert zudem Blimp-1, was die Expression von Bcl-6 (*B-cell lymphoma 6*) als essentiellen Faktor für die T<sub>FH</sub>-Generation blockiert (Oestreich et al., 2012; Ballesteros-Tato et al., 2012; Johnston et al., 2012; Nurieva et al., 2012). IL-2 kontrolliert somit nicht auf direktem Weg die T-Zell-Differenzierungen, sondern beeinflusst vielmehr die Zytokine, die die jeweilige Differenzierung naiver T-Zellen in die T<sub>H</sub>-Zell-Populationen kontrollieren (Liao et al., 2011a).

Seit 1992 ist IL-2 das erste von der FDA (*US Food and Drug Administration*) anerkannte Zytokin, das für klinische Therapien eingesetzt werden soll (McDermott & Atkins, 2006; Sim & Radvanyi, 2014; Abbas et al., 2018). Geringe Dosen IL-2 wurden bei Hepatitis-C-Virus (HCV)-assoziiertes Vaskulitis, Graft-versus-host-Erkrankungen (GVHD) und multiplen Autoimmunkrankheiten eingesetzt, um die Generation von T<sub>reg</sub>-Zellen zu erhöhen und damit zur Wiederherstellung einer Immuntoleranz beizutragen (Koreth et al., 2011; Saadoun et al.,

2011; Klatzmann & Abbas, 2015; von Spee-Mayer et al., 2016; Rosenzweig et al., 2019). Hohe Dosen an IL-2 konnten bei Mensch und Maus zur Steigerung der T-Zell-Anzahl und der Immunität gegen Melanome und Nierenzellkarzinome eingesetzt werden (Belldegrun et al., 2008; Rosenberg, 2014; Buchbinder et al., 2019) und dienten darüber hinaus als unterstützende Therapie zu tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) bei Patienten mit metastasierenden Melanomen (Dudley et al., 2002; Dudley et al., 2005). Im Gegensatz dazu wurden Antikörper gegen die  $\alpha$ -Untereinheit des IL-2R eingesetzt, um den IL-2-Signalweg zu inhibieren und damit eine Abstoßung transplantierte Organe zu verhindern (Morris & Waldmann, 2000; Tahvildari & Dana, 2019). Daclizumab (Nair et al., 2001; Mottershead & Neuberger, 2007) und Basiliximab (Han et al., 2020; Hashim et al., 2020) sind solche FDA-geprüften monoklonalen Antikörper, die gegen eine Transplantatabstoßung eingesetzt werden und die sich zusätzlich als effektive Behandlungen in Multipler Sklerose (MS), Uveitis und Colitis ulcerosa erwiesen (Lutterotti & Martin, 2008; O'Shea et al., 2019). Obwohl der Einsatz des IL-2 vielversprechende therapeutische Ergebnisse erzielt und der Einfluss des IL-2 auf die Immunaktivierung ein effektiver Ansatz zur Behandlung bestimmter Krankheiten sein kann (Sim & Radvanyi, 2014), erschweren hohe Kosten sowie auftretende Toxizität von hochdosiertem IL-2 eine Standardisierung dieser Therapien (McDermott & Atkins, 2006). Der Einsatz notwendiger hoher Dosen IL-2 bei bestimmten Krebstherapien zieht Nebenwirkungen wie das Vaskular-Leak-Syndrom (VLS) oder erhöhte Werte des Kreatinins und Bilirubins mit sich (Rosenberg, 2014), der Einsatz geringerer Dosen zum Eindämmen der Nebenwirkungen führte jedoch zu verminderter Effizienz (Yang et al., 2003). Neue Erkenntnisse in der IL-2-Biologie stellen die Grundlage für neue Therapieansätze dar, das IL-2 zur Unterdrückung von Immunantworten zu verwenden statt diese zu stimulieren. Dennoch muss eine eindeutigere physiologische Rolle des IL-2 in der Immunität und Selbsttoleranz charakterisiert werden, um die therapeutische Manipulation des IL-2-Signalweges klinisch anzupassen und den größtmöglichen Nutzen der Therapien erreichen zu können (Nelson, 2004; Abbas et al., 2018).

## 1.2. Struktur des IL-2 und IL-2-Rezeptors

IL-2 ist ein Typ-I-Zytokin (Bazan, 1990; Lucey et al., 1996) von 15,5 kDa (Kim et al., 2006; Liao et al., 2013) mit einer vier- $\alpha$ -Helix-Struktur und einer *up-up-down-down*-Topologie (Grötzinger, 2002). Die Nomenklatur von Typ-I- und Typ-II-Zytokinen beschreibt dabei die

funktionelle Reaktion eines Zytokins. Während beispielsweise IL-4 oder IL-10 als Typ-II-Zytokine charakterisiert wurden und eine beeinträchtigte Immunantwort hervorrufen, wird IL-2 neben IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-12 als Typ-I-Zytokin typisiert, das eine starke zelluläre Immunantwort auslöst (Lucey et al., 1996).

Das IL-2 wird hauptsächlich von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Antigenstimulation produziert (Leonard, 2001), in geringeren Mengen aber auch von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Paliard et al., 1988), NKT-Zellen (Yui et al., 2004) aktivierten DCs (Granucci et al., 2001) und Mastzellen (Hershko et al., 2011). IL-2 ist zudem als erstes Typ-I-Zytokin rekombinant hergestellt worden (Kashima et al., 1985; Taniguchi et al., 1983) und das erste, für das eine Rezeptorkomponente (IL-2R $\alpha$ ) kloniert wurde (Cosman et al., 1984; Leonard et al., 1984; Nikaido et al., 1984). Mit seiner Entdeckung wurde es das erste Mitglied und namensgebendes Zytokin der Interleukin-2-Familie, die durch die gemeinsame Nutzung der  $\gamma_c$ -Rezeptoruntereinheit auch als *common gamma chain* ( $\gamma_c$ )-Zytokinfamilie bekannt ist.

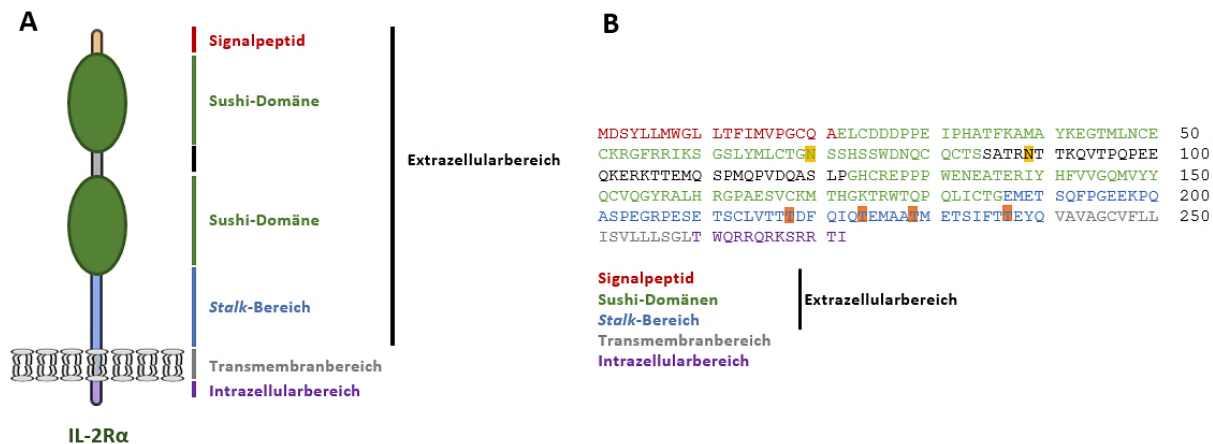
### 1.2.1. Der IL-2-Rezeptor (IL-2R)

IL-2 induziert intrazelluläre Signale über die Bindung seines spezifischen Rezeptors (Robb et al., 1981), der sich aus verschiedenen Kombination der drei IL-2R-Untereinheiten IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  (CD122) und IL-2R $\gamma$  ( $\gamma_c$ /CD132) zusammensetzt (Kim et al., 2006; Lin & Leonard, 2000; Malek & Castro, 2010). Benannt nach ihrer IL-2-Bindungsaffinität gibt es einen monomeren gering-affinen Rezeptor (IL-2R $\alpha$ ), einen dimeren intermediär-affinen Rezeptorkomplex (IL-2R $\beta$ / $\gamma_c$ ) sowie einen trimeren hoch-affinen Rezeptorkomplex (IL-2R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma_c$ ). In seltenen Fällen können auch dimere „pseudo-hoch-affine“ IL-2R $\alpha$ / $\beta$ -Komplexe gebildet werden, die zwar eine relativ hohe IL-2-Bindungsaffinität aufweisen, jedoch anhand der fehlenden  $\gamma_c$  als essentielle Rezeptoreinheit keine Signaltransduktion induzieren können (Arima et al., 1992).

#### 1.2.1.1. IL-2R $\alpha$

Der IL-2-spezifische IL-2R $\alpha$  (55 kDa) ist mit 272 Aminosäuren (AS) die kleinste der drei IL-2-Rezeptorkomponenten, der allein jedoch nur eine geringe IL-2-Bindungsaffinität ( $K_d \approx 10^{-8}$  M) aufweist (Wang & Smith, 1987; Rickert et al., 2005; Liao et al., 2013). Anders als der IL-2R $\beta$  und  $\gamma_c$  ist der IL-2R $\alpha$  kein Typ-I-Zytokinrezeptor, sondern ein sogenanntes Sushi-Domänen-Protein (Rickert et al., 2005) (Abb. 1A) mit zwei charakteristischen Sushi-Motiven von 63 und 64 AS, die im extrazellulären Rezeptorbereich lokalisiert sind und essentielle

Elemente für die Ligandenbindung darstellen (Waldmann, 2002; Lorenzen et al., 2006; O’Shea et al., 2019). Sie sind durch ein 38 AS langes Verbindungsstück verknüpft und über einen *Stalk*-Bereich von 54 AS mit dem Transmembranbereich verbunden, dem ein intrazellulärer Bereich von 13 AS folgt. Der IL-2R $\alpha$  besitzt sechs vorhergesagte Glykosylierungsstellen (Miedel et al. 1988), darunter zwei N-Glykane und vier O-Glykane (Abb. 1B).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung und Aminosäuresequenz des humanen IL-2R $\alpha$ . **A:** Die einzelnen Segmente des humanen IL-2R $\alpha$  sind vereinfacht dargestellt. Das Signalpeptid (rot), die zwei Sushi-Domänen (grün) sowie der *Stalk*-Bereich (blau) sind Teile des Extrazellulärbereichs, es schließen der Transmembranbereich (grau) und der intrazelluläre Bereich (lila) an. **B:** Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des humanen IL-2R $\alpha$  mit farblich hervorgehobenen Sequenzabschnitten, die die einzelnen Rezeptorsegmente markieren. Vorhergesagte N-Glykane (N70, N89) sind gelb hinterlegt, vorhergesagte O-Glykane (T218, T224, T229, T237) sind orange markiert.

Der IL-2R $\alpha$  wird von einer Vielzahl an Immunzellen wie aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen, CD56<sup>hi</sup> NK-Zellen, DCs und Endothelzellen exprimiert. Vor allem weisen sich jedoch T<sub>reg</sub>-Zellen durch eine hohe konstitutive Expression des IL-2R $\alpha$  aus, was ihnen schon bei geringsten Mengen IL-2 eine effiziente Zytokinbindung ermöglicht (Boyman & Sprent, 2012). Naive T-Zellen zeigen keine oder nur eine sehr geringe Menge IL-2R $\alpha$ , die Expression des Rezeptors kann in naiven T-Zellen jedoch durch costimulatorische Signale des T-Zell-Rezeptors (*T cell receptor*; TCR) und IL-2-Stimulation induziert werden (Depper et al., 1984; Depper et al., 1985; Leonard et al., 1985). Auch Signalwege anderer Zytokine wie IL-4 (Froussard et al., 1991), IL-5 (Gaffen et al., 1996; Loughnan et al., 1987) und IL-10 (Fluckiger et al., 1993), inflammatorische Zytokine (Plaetinck et al., 1990) sowie Virusinfektionen (Ballard et al., 1988; Böhnlein et al., 1988) können die Expression des IL-2R $\alpha$  induzieren. IL-2 ist zudem eines der wenigen Zytokine, die die Expression seines spezifischen  $\alpha$ -Rezeptors über einen positiven IL-2/IL-2R $\alpha$ -*feedback loop* selbst regulieren und damit die Expression

des IL-2R $\alpha$  verstärken kann (Malek, 2008; Boyman & Sprent, 2012; Spolski et al., 2018; Kim et al., 2006).

#### 1.2.1.2. IL-2R $\beta$

Der 1986 identifizierte IL-2R $\beta$  (75 kDa) (Tsuda et al., 1986; Sharon et al., 1986; Teshigawara et al., 1987; Dukovich et al., 1987) ist mit 551 AS die größte Komponente des IL-2-Rezeptors, weist allein aber eine sehr geringe IL-2-Bindungsaffinität auf ( $K_d \approx 1 \mu\text{M}$ ) (Wang & Smith, 1987; Rickert et al., 2005; Liao et al., 2013). Als ein Typ-I-Zytokinrezeptor weist der IL-2R $\beta$  die charakteristische zytokinbindende homologe Region (*cytokine-binding homology region*; CHR) und ein WSXWS-Motiv (Tryptophan – Serin – X – Tryptophan – Serin; X: beliebige AS) auf (Bazan, 1990; O’Shea et al., 2019). Der IL-2R $\beta$  hat jedoch keine enzymatische Aktivität, dafür enthält der intrazelluläre Bereich konservierte Box1- und Box2-Motive, die als Bindungsstellen für Tyrosinkinase dienen (Schwartz et al., 2016). Beide Motive sind mit der Januskinase 1 (JAK1) assoziiert und tragen damit zur Induktion der IL-2-Signaltransduktion bei (Boussiotis et al., 1994; Miyazaki et al., 1994; Russell et al., 1994; Witthuhn et al., 1994). Zwei Tyrosinseitenketten, die bei Aktivierung phosphoryliert werden können (beim Menschen Y392 und Y510), fungieren als Bindungsstellen für STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-Proteine (Friedmann et al., 1996; Lin et al., 2012; Fujii et al., 1995; Gaffen et al., 1995; Gaffen et al., 1996). Der IL-2R $\beta$  wird hauptsächlich von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen exprimiert (Malek, 2008; Kim et al., 2006; Zhang et al., 1998; Nelson & Willerford, 1998; Bosco et al., 1994).

#### 1.2.1.3. IL-2R $\gamma$

Der IL-2R $\gamma$  (64 kDa), kurz auch  $\gamma_c$ , ist Teil aller Rezeptorkomplexe der  $\gamma_c$ -Zytokinfamilie. Er umfasst 369 AS und ist wie der IL-2R $\beta$  ein Typ-I-Zytokinrezeptor mit den charakteristischen Elementen CHR und WSXWS-Motiv sowie Box1- und Box2-Motiven, die anders als beim IL-2R $\beta$  mit JAK3 assoziiert sind (Miyazaki et al., 1994; Russell et al., 1994; Witthuhn et al., 1994). Der humane  $\gamma_c$  enthält vier Tyrosinseitenketten (Y281, Y303, Y335 und Y341), die wichtige Elemente in der JAK3-Aktivierung darstellen (Goldsmith et al., 1995). Sowohl die membranproximalen als auch die membrandistalen Regionen des intrazellulären  $\gamma_c$ -Rezeptors sind wichtig zur Aktivierung von JAK3 (Nelson et al., 1996). Eine Deletion der C-terminalen 48 AS führt dabei zum Verlust der JAK3-Aktivierung, der Rezeptor ist jedoch weiterhin in der Lage, unabhängig der JAK3-Aktivierung eine Signaltransduktion zur

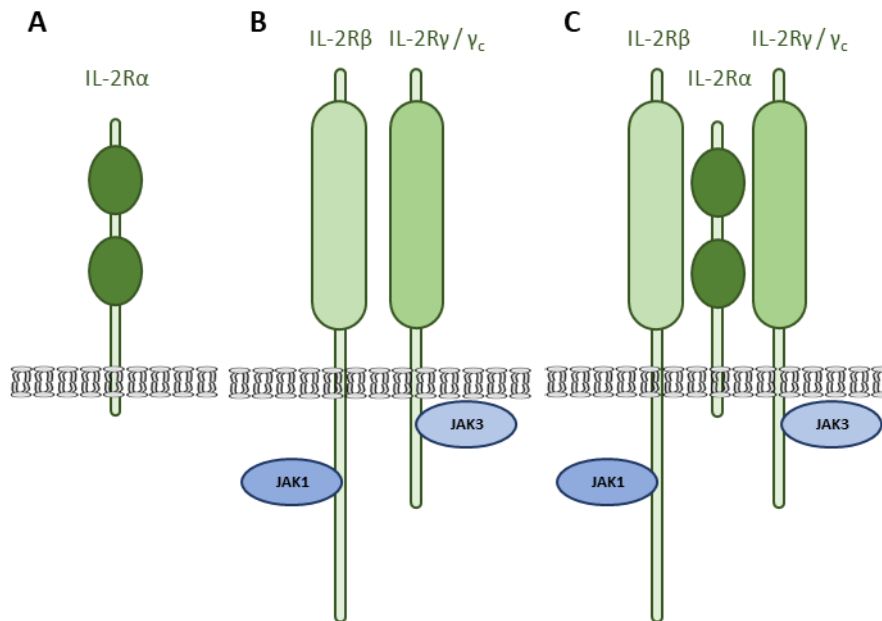
Aktivierung von JAK1 und STAT5 zu induzieren (Tsujino et al., 1999). Mutationen im *IL2RG*-Gen, das für das Rezeptorprotein  $\gamma_c$  kodiert, sind mit einem schweren kombinierten Immundefekt (*severe combined Immunodeficiency*, SCID) assoziiert (Kumrah et al., 2020). Die X-chromosomale SCID (*X-linked severe combined Immunodeficiency*, XSCID) stellt dabei mit 1 von 200.000 Geburten in den USA den meist verbreiteten erblichen Immundefekt dar (Liao et al., 2013) und charakterisiert sich durch das Fehlen von T- und NK-Zellen sowie die Anwesenheit funktionsloser B-Zellen (Liao et al., 2013; Lin & Leonard, 2018; Kumrah et al., 2020). Auch Mutationen von JAK3 verursachen eine autosomal rezessive T<sup>B</sup> SCID und führen somit zu den gleichen funktionalen Defekten wie eine *IL2RG*-Mutation (Pesu et al., 2005). Eine komplette Defizienz der  $\gamma_c$ -Rezeptoruntereinheit führt bei allen Zytokinen der  $\gamma_c$ -Familie dazu, dass keine Signalwegtransduktion stattfinden kann (O’Shea et al., 2019). Der  $\gamma_c$ -Rezeptor ist hauptsächlich auf Lymphozyten, aber auch anderen hämatopoetischen Zellen exprimiert (Sim & Radvanyi, 2014).

### 1.2.2. IL-2R-Komplexe

Der monomere IL-2-Rezeptor besteht nur aus dem IL-2R $\alpha$  (Abb. 2A). Aufgrund der sehr kurzen intrazellulären Domäne von nur 13 AS ist der IL-2R $\alpha$  allein nicht in der Lage eine Signaltransduktion zu induzieren (Cosman et al., 1984; Leonard et al., 1984; Nikaido et al., 1984). Notwendig sind hierfür IL-2R $\beta$  und  $\gamma_c$ , die durch spezielle Sequenzen in den zytoplasmatischen Domänen die essentiellen Rezeptorkomponenten sind und deren Heterodimerisierung zur Signaltransduktion benötigt wird (Nakamura et al., 1994; Nelson et al., 1994).

Sind der IL-2R $\beta$  und  $\gamma_c$  coexprimiert, bilden sie den dimeren IL-2R $\beta$ / $\gamma_c$ -Komplex (Abb. 2B) mit einer mittleren IL-2-Bindungsaffinität ( $K_d \approx 10^{-9}$  M) (Mitchell et al., 2010) und stellen einen funktionalen Rezeptor zur Induktion einer Signaltransduktion dar. Der dimere Rezeptor ist vor allem auf ruhenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Zhang et al., 1998), aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Siegel et al., 1987; Abbas et al., 2018) und NK-Zellen exprimiert (Siegel et al., 1987). Bindet IL-2 an den dimeren IL-2R $\beta$ / $\gamma_c$ , wird neben dem Zellwachstum und der zytolytischen Aktivität (Siegel et al., 1987) auch die Transkription des IL-2R $\alpha$  induziert (Depper et al., 1985), um die Bildung des trimeren IL-2-Rezeptors zu ermöglichen und die Empfänglichkeit für IL-2 zu verstärken (Liao et al., 2013).





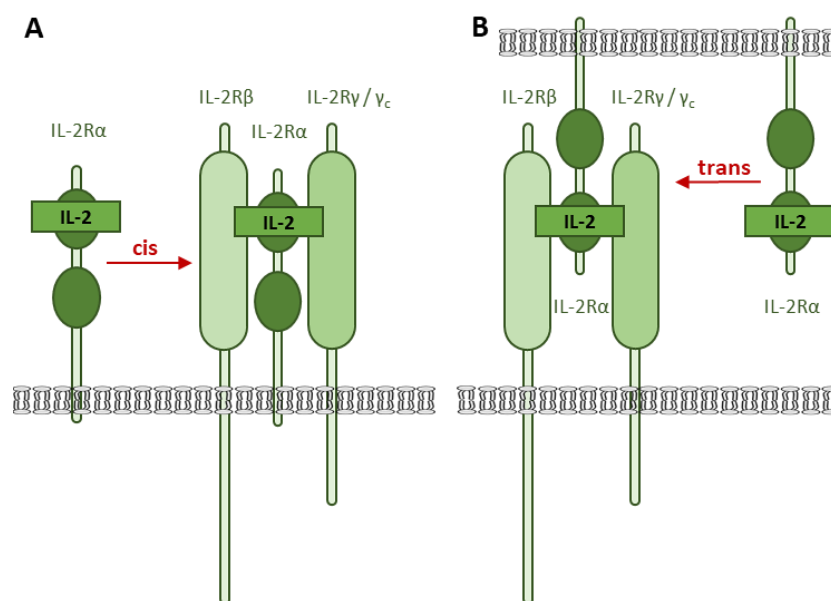
**Abb. 2:** Schematische Darstellung des monomeren, dimeren und trimeren IL-2R. **A:** Der monomere IL-2R besteht ausschließlich aus dem  $\alpha$ -Rezeptor und dient als IL-2-Fänger-Rezeptor, hat alleine jedoch nur eine geringe IL-2-Bindungsaffinität. Als Monomer ist diese Variante nicht in der Lage, den IL-2-Signalweg zu aktivieren. **B:** Der dimere IL-2R besteht aus IL-2R $\beta$  und  $\gamma_c$ . Dieser Rezeptorkomplex bindet IL-2 mit einer mittleren Affinität, kann aber ohne  $\alpha$ -Kette IL-2-abhängige Signalwege aktivieren. **C:** Der trimere Rezeptor umfasst alle drei Rezeptortypen IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  und  $\gamma_c$ . Dieser Komplex hat die höchste IL-2-Bindungsaffinität und aktiviert IL-2-abhängige Signalwege.

Sind alle drei Rezeptorkomponenten IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  und  $\gamma_c$  auf einer Zelle coexprimiert, kann der trimere Rezeptor (Abb. 2C) gebildet und IL-2 mit einer  $\approx 1000$ -fach höheren Affinität ( $K_d \approx 10^{-11}$  M) als vom dimeren Rezeptor gebunden werden (Takeshita et al., 1992; Taniguchi & Minami, 1993; Arenas-Ramirez et al., 2015). Der trimere Rezeptor ist vor allem auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Robb et al., 1981) und T<sub>reg</sub>-Zellen (Kim et al., 2006; Liao et al., 2011a) exprimiert. Die hohe IL-2-Bindungsaffinität lässt sich zurückführen auf die Kombination einer schnellen *on*-Rate des IL-2 zum IL-2R $\alpha$  in Verbindung mit einer langsameren *off*-Rate des IL-2R $\beta$ / $\gamma_c$  (Lowenthal & Greene, 1987; Wang & Smith, 1987; Stauber et al., 2006). Der IL-2R $\alpha$  gilt hierbei als „Fänger“-Rezeptor, der dem IL-2 eine optimale rezeptorbindende Konformation bietet, um anschließend dem IL-2R $\beta$ / $\gamma_c$ -Komplex präsentiert zu werden (Sim & Radvanyi, 2014).

### 1.3. *Cis-/trans*-Präsentation des IL-2R

IL-2 wirkt wie die meisten  $\gamma_c$ -Zytokine hauptsächlich über *classic (cis)-signaling* (Leonard et al., 2019), das heißt, es bindet an den membrangebundenen IL-2R $\alpha$ , welcher sich mit einem dimeren Rezeptor zu einem trimeren Rezeptorkomplex formt, um schließlich auf derselben Zelle zu wirken (Abb. 3A). IL-2 ist jedoch zudem in der Lage, über *trans-signaling* zu wirken

(Wuest et al., 2011). Hierbei bindet das IL-2 an den spezifischen  $\alpha$ -Rezeptor auf der Oberfläche einer Zelle, welcher schließlich als IL-2/IL-2 $\alpha$ -Komplex einer weiteren Zelle *trans*-präsentiert wird, die nur den dimeren IL-2R $\beta/\gamma_c$  exprimiert (Abb. 3B). Das *trans*-signaling spielt somit eine große Rolle in der Regulierung der IL-2-Bindungsaffinität, um die Signalfähigkeit der *trans*-präsentierten Zelle zu erhöhen (Eicher & Waldmann, 1998). Die *trans*-Präsentation könnte damit eine relevante Rolle in Hinblick auf die T-Zell-Aktivierung *in vivo* spielen, bei der die Proliferation und Differenzierung von Zellen wie zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen verstärkt wird, welche den IL-2R $\beta/\gamma_c$ , jedoch nicht den IL-2 $\alpha$  exprimieren (Eicher & Waldmann, 1998).



**Abb. 3:** Vereinfachte Darstellung der *cis*- und *trans*-Präsentationen des IL-2 $\alpha$ . **A:** IL-2 wirkt über *classic (cis)*-signaling, wenn es an den membrangebundenen IL-2 $\alpha$  bindet und der IL-2/IL-2 $\alpha$ -Komplex dem dimeren IL-2R auf derselben Zelle präsentiert wird. **B:** Bindet IL-2 an den  $\alpha$ -Rezeptor auf der einen Zelle und wird dieser Komplex schließlich dem dimeren Rezeptor auf der Oberfläche einer anderen Zelle präsentiert, ist dies eine *trans*-Präsentation.

#### 1.4. IL-2-Signaltransduktion über den IL-2R

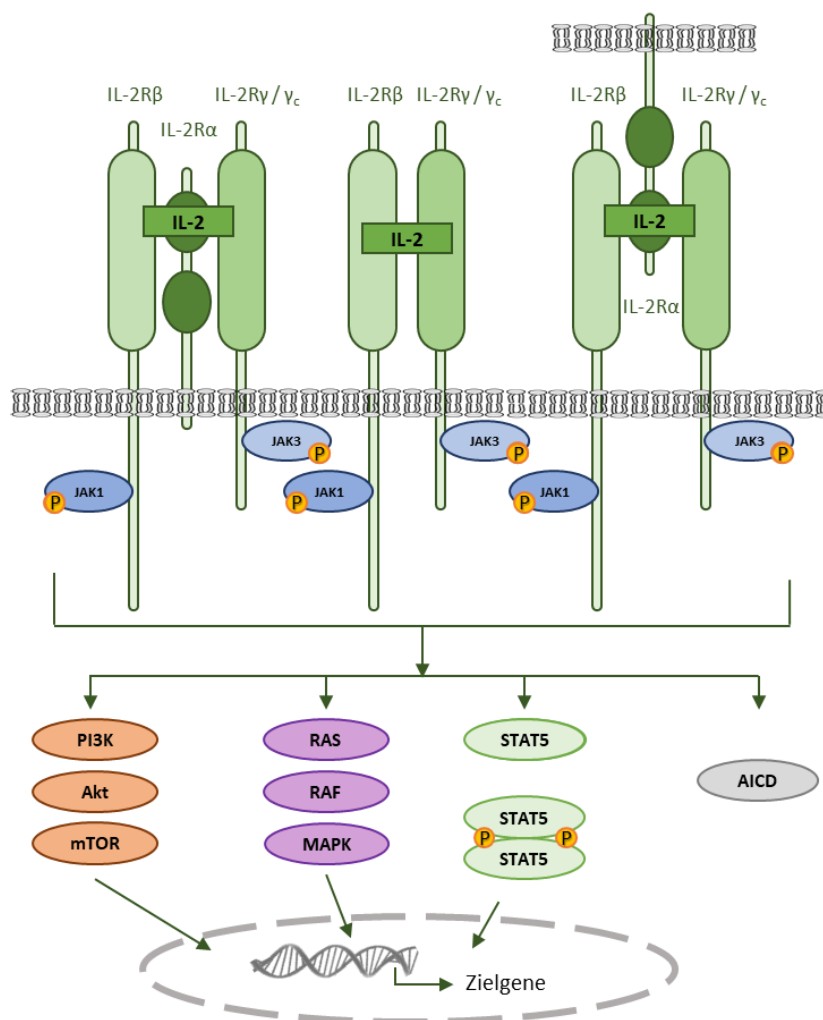
Interagiert IL-2 mit dem IL-2R-Komplex, werden IL-2-abhängige Signalkaskaden aktiviert und die Wirkung des IL-2 über Aktivierung verschiedener Signalwege wie STAT5, Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) und Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (PKB/Akt) induziert (Abb. 4), die der Regulierung von Zellproliferation, Differenzierung, Überleben und AICD dienen (Minami & Taniguchi, 1995; Gaffen, 2001; Waldmann, 2006; Malek, 2008; Leonard et al., 2019). Bindet IL-2 an seinen spezifischen IL-2 $\alpha$ , kommt es zur Konformationsänderung in der IL-2-Struktur, um eine effiziente

Interaktion mit IL-2R $\beta$  und  $\gamma_c$  zu verstärken (Wang et al., 2009). Bei fehlendem IL-2R $\alpha$  kann IL-2 auch direkt mit dem dimeren IL-2R interagieren, bedingt durch die mittlere IL-2-Bindungsaffinität ist hierbei jedoch eine höhere Expression des dimeren Rezeptors auf der Zelloberfläche für eine effektive IL-2-Bindung notwendig (Boyman et al., 2006; Boyman & Sprent, 2012). Bindet IL-2 an den dimeren oder trimeren Rezeptorkomplex, erfolgt die Heterodimerisierung der zytoplasmatischen Regionen der  $\beta$ - und  $\gamma_c$ -Ketten und die Induktion intrazellulärer Signalwege über die T-Zell-spezifischen Tyrosinkinasen Fyn (*fibroblast yes-related non-receptor kinase*) und Lck (*lymphocyte kinase*) der Src-Familie (Minami et al., 1995; Taniguchi et al., 1995) oder die Januskinasen JAK1 und JAK3 (Beadling et al., 1996; Johnston et al., 1994; Miyazaki et al., 1994; Russell et al., 1994; Witthuhn et al., 1994). Die Mehrzahl der IL-2-Signalwege sind dabei jedoch JAK-abhängig (Ross et al., 2016). JAK1 und JAK3 werden durch gegenseitige Phosphorylierung aktiviert und schaffen durch Phosphorylierung intrazellulärer Signaldomänen von IL-2R $\beta$  und  $\gamma_c$  Andockstellen für Signalmoleküle mit SH2 (*SRC-homology 2*)- oder PTB (*Phosphotyrosine-binding*)-Domänen (O'Shea et al., 2019). Phosphorylierung der Tyrosinstellen von IL-2R $\beta$  und  $\gamma_c$  induzieren die Rekrutierung von STAT-Proteinen, wobei STAT5 die höchste Affinität aufweist (STAT5 > STAT3 > STAT1) (Friedmann et al., 1996; Lin et al., 2012; Fujii et al., 1995; Gaffen et al., 1995; Gaffen et al., 1996). Dabei binden rekrutierte STAT5-Moleküle mit den SH2-Domänen an die Phosphotyrosinstellen der zytoplasmatischen Domänen der  $\beta$ - und  $\gamma_c$ -Kette und bilden nach Aktivierung über reziproke SH2-Phosphotyrosin-Interaktionen Dimere (Leonard & O'Shea, 1998; Darnell et al., 1997), die schließlich in den Nukleus migrieren und dort durch Binden spezifischer DNA-Sequenzen die Transkription von IL-2-Zielgenen regulieren (Malek, 2008; O'Shea et al., 2019; Damoiseaux, 2020). Diese sind unter anderem essentiell für die Effektor-Zell-Funktion, das T-Zell-Wachstum (Friedmann et al., 1996; Lin et al., 2012) und die T-Zell-Differenzierung (Liao et al., 2011b). Untersuchungen an STAT5<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten, dass die Tiere lymphoproliferative Krankheiten mit einem Verlust von T<sub>reg</sub>-Zellen und der Expansion von T<sub>FH</sub>- und T<sub>H</sub>17-Zellen aufwiesen, was an Mäuse mit einer IL-2R $\alpha$ -Defizienz erinnerte (O'Shea et al., 2019).

Das Tyr388 (Y388) im zytoplasmatischen Bereich von IL-2R $\beta$  fungiert nach JAK-abhängiger Phosphorylierung als Bindungsstelle für das Adapterprotein SHC (Friedmann et al., 1996; Ravichandran et al., 1996), welches zur Rekrutierung des Proteins Grb2 (*Growth factor*

receptor-bound protein 2) mit anschließender Aktivierung des MAPK-Signalweges und damit zur Steigerung des Zellwachstums führt (Gaffen, 2001).

Die IL-2-bedingte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs spielt eine wichtige Rolle zur Förderung des Zellwachstums und Überlebens (Franke et al., 1997; Lin & Leonard, 2000; Malek & Castro, 2010). In aktivierten T-Zellen konnte zudem gezeigt werden, dass die Rekrutierung der PI3K und die anschließende Aktivierung von Akt essentielle Faktoren der antiapoptotischen Funktion des IL-2 darstellen (Kelly et al., 2002). Die mTOR (*mammalian target of rapamycin*)-Kinase, eine *downstream* Serin/Threonin-Kinase des PI3K/Akt-Signalwegs, spielt zudem eine wichtige Funktion in der Reife und Entwicklung von T<sub>H</sub>-Zellen (Powell et al., 2012; Chi, 2012).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung IL-2-induzierter Signalwege. Bindet IL-2 an den dimeren oder trimeren Rezeptor, kommt es zur Heterodimerisierung der intrazellulären β- und γ<sub>c</sub>-Kette und zur Rekrutierung von JAK1 und JAK3. JAKs werden durch Phosphorylierung aktiviert und schaffen Bindungsstellen für rekrutierte Signalmoleküle, um den PI3K/Akt-, MAPK- oder STAT5-Signalweg zu induzieren und AICD zu regulieren.

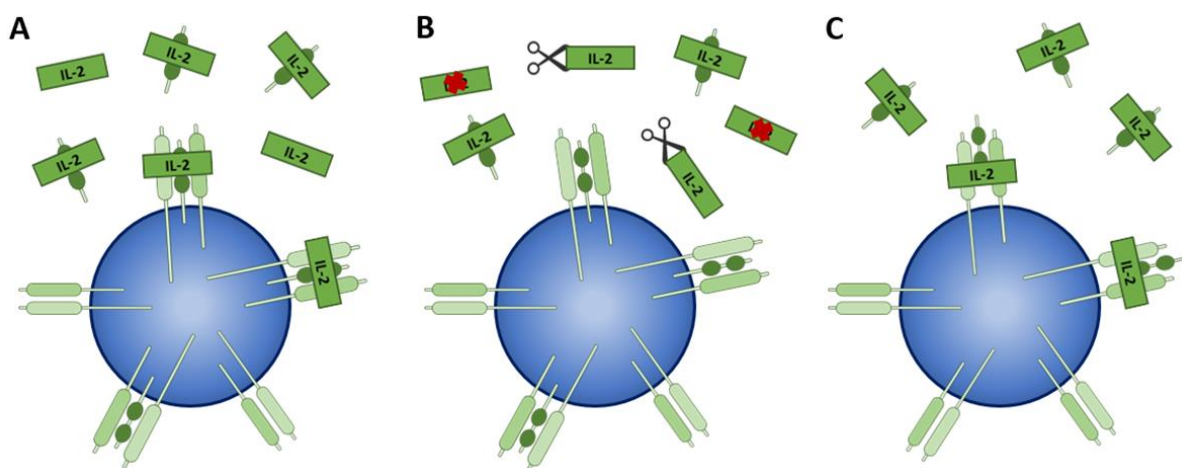
Das fortschreitende Verständnis, wie IL-2 und der IL-2-Signalweg in der Entwicklung von Krankheiten involviert sind, stellt die Grundlage dar, um IL-2- und Anti-IL-2-Therapien klinisch nutzen zu können. Es ist davon auszugehen, dass die Verwendung von IL-2 als Therapiemittel mit dem Fortschritt im Verständnis um die Immunbiologie und IL-2 steigen wird (O'Shea et al., 2019).

### **1.5. Der lösliche IL-2R $\alpha$ (sIL-2R $\alpha$ )**

Seit 1985 ist bekannt, dass zusätzlich zum membrangebunden IL-2R $\alpha$  eine lösliche Form des Rezeptors existiert (Rubin et al., 1985). Die Menge des löslichen IL-2R $\alpha$  (*soluble* IL-2R $\alpha$ , sIL-2R $\alpha$ ) variiert in gesunden Menschen mit dem Alter. Kinder und Menschen über 65 Jahre weisen höhere Mengen sIL-2R $\alpha$  im Blut auf als (junge) Erwachsene (Filipovich, 2008; Gotoh et al., 1999; Manoussakis et al., 1990; Sack et al., 1998). Seit seiner Identifizierung wurden zudem erhöhte Mengen des löslichen IL-2R $\alpha$  in Patienten mit Infektionen, Entzündungen, Autoimmunkrankheiten, Transplantatabstoßung oder malignen Tumoren nachgewiesen (Rubin & Nelson, 1990; Caruso et al., 1993; Witkowska, 2005; Bien & Balcerska, 2008), was den sIL-2R $\alpha$  als potenziellen diagnostischen Marker ausweist (Bien & Balcerska, 2008; Murakami et al., 2019; Dik & Heron, 2020). Darüber hinaus konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Expression des IL-2R $\alpha$  auf der Zelloberfläche aktivierter CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der Menge an sekretiertem sIL-2R $\alpha$  nach erfolgter Aktivierung nachgewiesen werden (Lai et al., 1991), so dass der sIL-2R $\alpha$  als Marker der T-Zell-Aktivierung gilt. Erhöhte Level an löslichem IL-2R $\alpha$  spiegeln dabei die Immunaktivität und den Aktivierungsstatus von T-Zell-Kompartimenten wider und der sIL-2R $\alpha$  gilt als wertvoller Biomarker in Krankheiten, bei denen T-Zell-Antworten eine zentrale Rolle spielen (Dik & Heron, 2020). Der sIL-2R $\alpha$  stammt hauptsächlich von aktivierten T-Zellen (Rubin et al., 1985), aber auch andere Immunzellen wie Monozyten, DCs und B-Zellen stellen Quellen des sIL-2R $\alpha$  dar (Rubin et al., 1985; Nelson et al., 1986; Holter et al., 1987; Kniep et al., 1992; Witkowska, 2005; von Bergwelt-Baildon et al., 2006).

Obwohl bekannt ist, dass der sIL-2R $\alpha$  eine ähnliche IL-2-Bindungsaffinität wie der membranständige IL-2R $\alpha$  aufweist (Rubin et al., 1986; Jacques et al., 1987; Robb & Kutny, 1987), ist die biologische Funktion dieser Bindung weitestgehend unbekannt. Vorgeschlagene Theorien über den Mechanismus, wie der sIL-2R $\alpha$  die Signalübertragung des IL-2 beeinflusst, umfassen immuninhibitorische bis immunstimulierende Effekte des sIL-2R $\alpha$

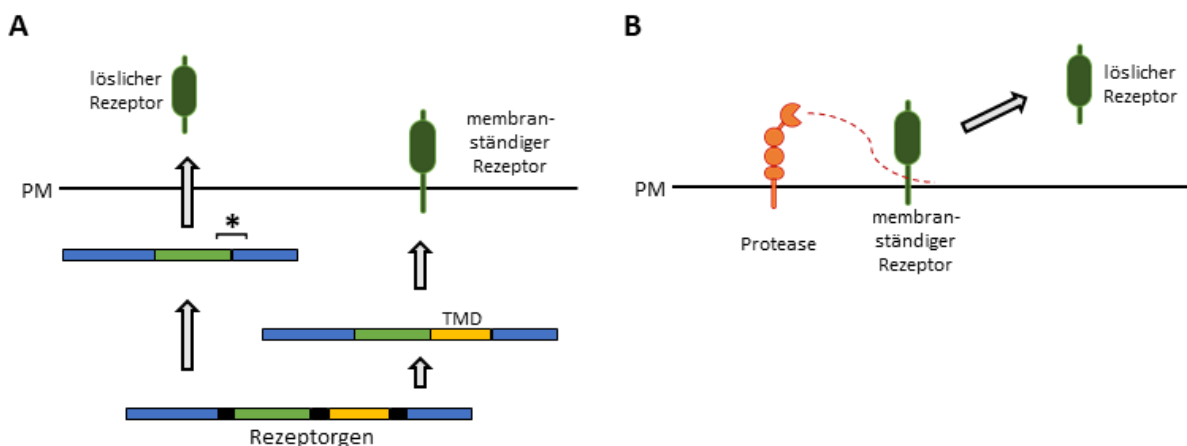
(Dik & Heron, 2020). Eine Theorie ist, dass die Produktion des sIL-2R $\alpha$  ein negativer *feedback*-Mechanismus zur Wiederherstellung der Immunhomöostase ist, um die Immunaktivität zu regulieren und die Balance zwischen Immunität und Toleranz wiederherzustellen. Dabei bindet der sIL-2R $\alpha$  freies IL-2 und verhindert damit die Bindung des IL-2 an den membrangebundenen Rezeptor (Abb. 5A), so dass die IL-2-Signaltransduktion gehemmt ist (Rubin et al., 1986; Rubinstein et al., 2006; Maier et al., 2009; Lindqvist et al., 2010; Russell et al., 2012). Eine weitere Theorie ist, dass die Bindung des IL-2 durch den sIL-2R $\alpha$  das IL-2 vor Degradation schützt und dadurch dessen Halbwertszeit verlängert (Abb. 5B), was die immunstimulierenden Eigenschaften des IL-2 verstärkt (Kobayashi et al., 1999; Vanmaris & Rijkers, 2017). In einer dritten Theorie wird beschrieben, dass der IL-2/sIL-2R $\alpha$ -Komplex membrangebundenen IL-2R $\beta$ / $\gamma_c$ -Komplexen präsentiert wird (Abb. 5C), um hoch-affine trimere Rezeptorkomplexe zu bilden und die IL-2-Signaltransduktion zu erhöhen (Yang et al., 2011). Diese Art dieser Präsentation entspricht dabei einer Form der *trans*-Präsentation, bei der der Komplex aus löslichem IL-2R $\alpha$  und IL-2 dimeren Rezeptoren auf der Zelloberfläche präsentiert wird (Yang et al., 2011; Damoiseaux, 2020). Abhängig vom involvierten Zelltyp kann hierbei die Immunaktivität beeinflusst werden (Yang et al., 2011; Damoiseaux, 2020). Es ist jedoch unklar, welche dieser Theorien zu den Mechanismen zutrifft oder ob sogar alle beschriebenen Mechanismen abhängig vom zellulären Kontext auftreten (Dik & Heron, 2020).



**Abb. 5:** **Mögliche Mechanismen der sIL-2R $\alpha$ -Funktion.** **A:** Der lösliche IL-2R $\alpha$  bindet IL-2 und verhindert eine Bindung des IL-2 an den membrangebundenen dimeren oder trimeren Rezeptor. **B:** Der sIL-2R $\alpha$  bindet IL-2, um es vor enzymatischer Degradation zu schützen und die Halbwertszeit des IL-2 zu verlängern. **C:** Der sIL-2R $\alpha$  bindet IL-2 und steigert dadurch die Affinität des IL-2 für den dimeren Rezeptor. Die Abbildung wurde verändert nach Dik & Heron (2020).

## 1.6. Proteolytisches *Shedding* zur Generierung löslicher Rezeptoren

Lösliche Rezeptoren können entweder durch alternatives *Splicen* von mRNA oder durch proteolytisches Ektodomänen-*Shedding* des membrangebundenen Rezeptors generiert werden (Lokau & Garbers, 2020). Durch das mRNA *Splicen* wird nach der Transkription das für die Transmembran kodierende Exon ausgespleißt, welches im endgültigen Transkript fehlt und zu einem löslichen Rezeptor führt (Abb. 6A). Aufgrund der DNA-Neuanordnung kann es zu einer Leserasterverschiebung kommen, wodurch ein neuer C-Terminus und gegebenenfalls ein Stopcodon entstehen (Jones et al., 2001; Lokau & Garbers, 2020).



**Abb. 6:** Vereinfachte schematische Darstellung zweier Mechanismen zur Generierung eines löslichen Rezeptors. **A:** Entstehung eines löslichen Rezeptors durch mRNA *Splicing*. Die ursprüngliche Rezeptorsequenz kann zu verschiedenen Transkripten führen. Wird das Exon, das für die Transmembrandomäne (TMD) kodiert, ausgespleißt, fehlt dieses im folgenden Transkript, was schließlich zu einem löslichen Rezeptor führt. Durch die DNA-Neuanordnung kann eine Leserasterverschiebung entstehen, was als Stern (\*) gekennzeichnet ist. **B:** Generierung eines löslichen Rezeptors durch proteolytisches *Shedding*. Eine membrangebundene Protease (orange) schneidet den membranständigen Rezeptor nah an der Plasmamembran, so dass die Ektodomänen in die Umgebung abgegeben werden. Die Abbildung wurde verändert nach Jones et al. (2001).

Beim Ektodomänen-*Shedding* hingegen spalten Proteasen hydrolytisch die Ektodomänen eines membranständigen Rezeptors nah an der Plasmamembran ab und geben diese als lösliche Form des Rezeptors in die Umgebung frei (Müllberg et al., 1993; Hooper et al., 1997; Chalaris et al., 2011) (Abb. 6B). Dieser Prozess, der auch als limitierte Proteolyse bezeichnet wird, kann einerseits die Expression des Proteins auf der Zelloberfläche reduzieren, andererseits können die nun löslichen Proteine über autokrine und parakrine Prozesse wirken (Garbers, 2011).

Bisher konnte kein alternatives *Splicing* des *IL2RA*-Gens festgestellt werden (Rubin et al., 1990; Damoiseaux, 2020), so dass davon ausgegangen wird, dass der sIL-2R $\alpha$  ausschließlich durch die enzymatische Abspaltung der Ektodomänen des membranständigen IL-2R $\alpha$  von

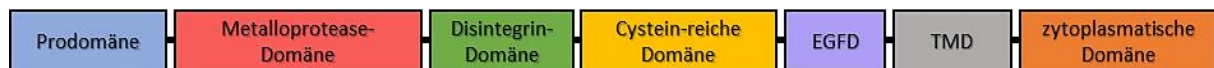
der Zelloberfläche entsteht. Diese Theorie konnte durch Studien bestärkt werden, in denen die Stimulation von T-Zell-Linien zu einer signifikant erhöhten Menge an sIL-2R $\alpha$  führte (Cabrera et al., 2010; Lindqvist et al., 2010) und der Anstieg des sIL-2R $\alpha$  mit einer reduzierten Menge des IL-2R $\alpha$  auf der Zelloberfläche verbunden ist (Yang et al., 2011). Dabei standen vor allem Enzyme wie Neutrophile Elastase und Proteinase 3 (PR3), Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) und Dermatophagoides pteronyssinus Peptidase 1 (Der p 1) im Fokus, da für diese Proteasen beschrieben wurde, dass sie in der Lage sind, den IL-2R $\alpha$  zu schneiden (Schulz et al., 1998; Bank et al., 1999; Sheu et al., 2001; El Houda Agueznay et al., 2007; Yang et al., 2011). Studien von El Houda Agueznay et al. (2007) zeigten zudem, dass das sIL-2R $\alpha$ -*Shedding* in Phytohämagglutinin (PHA)-stimulierten PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) unter Verwendung des Metalloprotease-Inhibitors TAPI-0 (*TNF alpha processing inhibitor-0*) nahezu vollständig ausbleibt, was auf die Beteiligung einer oder mehrerer Metalloproteasen im IL-2R $\alpha$ -*Shedding* hindeutet. Um welche Proteasen es sich handelt, war jedoch bislang unbekannt.

### 1.7. ADAM-Proteasen

Weitere Enzyme, die sich bisher als wichtige Faktoren im Rezeptor-*Shedding* erweisen konnten, sind Metalloproteasen der *A-Disintegrine and Metalloproteasen* (ADAM)-Familie. ADAM-Proteasen sind Zn<sup>2+</sup>-abhängige Typ-I-Transmembranproteinen und gehören zur Superfamilie der Zinkproteasen (Seals & Courtneidge, 2003). Sie setzen sich zusammen aus einer Prodomäne, die über die katalytische Metalloprotease-Domäne an eine Disintegrin-Domäne anschließt, gefolgt von einer Cystein-reichen Domäne und einer *epidermal growth factor* (EGF)-ähnlichen Domäne, die an die Transmembrandomäne sowie der zytoplasmatischen Domäne anschließt (Black & White, 1998; Seals & Courtneidge, 2003) (Abb. 7). Die Prodomäne verhindert dabei die Zymogenaktivierung (Moss et al., 2007; Duffy et al., 2009) und den Abbau der Protease während des Transports zur Zellmembran (Leonard et al., 2005). Zur Aktivierung der ADAM-Protease wird die Prodomäne durch Proprotein-Konvertasen wie Furin abgespalten (Endres et al., 2003; Seals & Courtneidge, 2003). Die Metalloprotease-Domäne spielt beim *Shedding* die entscheidende Rolle, da diese die konservierte HEXXHXXGXXH-Sequenz enthält, welche für die hydrolytische Abspaltung der Proteinsubstrate notwendig ist (Stöcker et al., 1995). Obwohl alle 22 bisher identifizierten humanen ADAM-Proteasen diese Metalloprotease-Domäne mit der charakteristischen



Sequenz erhalten, zeigt nur die Hälfte davon eine Proteaseaktivität (Seals & Courtneidge, 2003; Weber & Saftig, 2012). Zu den proteolytisch aktiven ADAM-Proteasen, auch als *Sheddases* bezeichnet, zählen ADAM8, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30 und 33 (Weber & Saftig, 2012). Während die Disintegrin-Domäne der Interaktion mit Integrinen auf benachbarten Zellen sowie mit Proteinen der extrazellulären Matrix dient (Reiss et al., 2006), wodurch dieser Domäne eine Rolle bei der Zelladhäsion zugesprochen wird (Mullooly et al., 2016), ist die Cystein-reiche Domäne für die spezifische Substraterkennung und die Regulierung der Interaktion zwischen Disintegrin-Domäne und Integrinen verantwortlich (Reddy et al., 2000; Seals & Courtneidge, 2003). Die EGF-ähnliche Domäne ist nicht bei allen ADAM-Proteasen exprimiert, die genaue Funktion dieser Domäne ist auch bislang noch nicht geklärt. Während die Rolle der Transmembrandomäne in der Verankerung der Proteasen mit der Zellmembran liegt, gibt es bei der zytoplasmatischen Domäne zwischen den ADAM-Proteasen Unterschiede in der Länge und Sequenzabfolge, wodurch sie auch unterschiedliche Funktionen erfüllen. So reguliert die zytoplasmatische Domäne von ADAM10 die konstitutive Aktivität, ist jedoch nach Stimulation nicht mehr für die *Shedding*-Aktivität notwendig (Maretzky et al., 2015). Bei ADAM17 hingegen steht die Phosphorylierung dieser Domäne mit der Regulierung der *Shedding*-Aktivität in Zusammenhang (Díaz-Rodríguez et al., 2002).



**Abb. 7:** Vereinfachte schematische Darstellung des Aufbaus von ADAM-Proteasen. Aufgebaut sind die ADAM-Proteasen aus einer Prodomäne, die an die Metalloprotease-Domäne anschließt, gefolgt von einer Disintegrin-Domäne, einer Cystein-reichen Domäne und einer *epidermal growth factor* (EGF)-ähnlichen Domäne (EGFD), die über die Transmembrandomäne (TMD) mit der zytoplasmatischen Domäne verbunden sind.

Bei Untersuchungen zum Ektodomänen-*Shedding* fiel der Fokus besonders auf ADAM10 und ADAM17, da sie von den katalytisch aktiven ADAM-Proteasen die meisten Substrate spalten. Durch Schneiden von Zytokinrezeptoren sind sie in der Lage, die Funktion verschiedener Immunzellen zu beeinflussen (Edwards et al., 2008; Scheller et al., 2011; Lambrecht et al., 2018). Beide Proteasen spalten ihre Substrate nahe der Plasmamembran (Müllberg et al., 1994; Scheller et al., 2011; Goth et al., 2015; Riethmüller et al., 2017). Berichte von Briso et al. (2008) zeigten zudem, dass die Expression von ADAM10 und ADAM17 in *in vitro*-aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen hochreguliert sind. Eine direkte Beteiligung von ADAM10 und ADAM17 am IL-2R $\alpha$ -*Shedding* wurde bisher jedoch nicht beschrieben.

### 1.7.1. ADAM10

ADAM10 wurde erstmals in der *Drosophila melanogaster* als essentieller Regulator für den Notch-Signalweg identifiziert und eine Zeit lang unter dem Namen Kuzbanian beschrieben (Rooke et al., 1996). Murine Embryonen mit einem ADAM10-Knockout sind charakterisiert durch schwere Defekte im zentralen Nervensystem, Immunsystem und Herz-Kreislauf-System und sterben meist innerhalb der ersten Tage der Embryonalentwicklung (Hartmann et al., 2002). Da Notch-defiziente Mäuse ähnliche Anomalien wie ADAM10-defiziente Tiere aufweisen, wird angenommen, dass sich diese Anomalien auf das fehlende Spalten und Aktivieren von Notch durch ADAM10 zurückführen lassen (Hartmann et al., 2002). Aufgrund der essentiellen Rolle im Notch-Signalweg und der maßgeblichen Beteiligung an der Embryonalentwicklung wird ADAM10 auch als Notch-*Sheddase* betitelt (Weber & Saftig, 2012). Doch auch im adulten Organismus ist ADAM10 durch die Proteolyse von Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Hikita et al., 2009) und CXCL16 (Abel et al., 2004; Gough et al., 2004) oder Wachstumsfaktoren wie Betacellulin und EGF (Sahin et al., 2004) an verschiedenen Prozessen beteiligt. Aus weiteren Versuchen mit konditionalen ADAM10-Knockout-Mäusen geht hervor, dass ADAM10 eine essentielle Rolle in der Entwicklung von B-Zellen spielt und ein Mangel der Protease in B-Zellen zu einer beeinträchtigten Antikörperproduktion führt (Gibb et al., 2010; Gibb et al., 2011; Chaimowitz et al., 2011). Im Gegensatz zu vielen anderen ADAM-Proteasen ist ADAM10 ubiquitär in Säugetierzellen exprimiert und setzt bis zu 40 verschiedene Substrate um (Dreymueller et al., 2012; Saftig & Lichtenthaler, 2015). Bisher ist der IL-6R einer von wenigen Zytokinrezeptoren, der als Substrat von ADAM10 bekannt ist (Matthews et al., 2003).

Die Aktivierung von ADAM10 kann durch einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ausgelöst werden. Eine solche Stimulation kann mit dem Ionophor Ionomycin erfolgen, welches den Transfer von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle erleichtert (Pinton et al., 2008). Obwohl Ionomycin bereits als geeigneter Stimulator für die ADAM10-Aktivierung eingesetzt wird (Hundhausen et al., 2007), ist es nicht als spezifischer ADAM10-Aktivator zu betrachten, da es aufgrund der reinen Modulation der Calcium-Konzentration unter bestimmten Bedingungen auch andere Proteasen wie ADAM17 aktivieren kann (Düsterhöft et al., 2015) und als Aktivator für den Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) vertrieben wird.

### 1.7.2. ADAM17

ADAM17 wurde ursprünglich als verantwortliche Protease für die Spaltung von TNF- $\alpha$  identifiziert, wodurch ADAM17 auch unter dem Namen TACE für *tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme* bekannt ist (Gearing et al., 1994; Black et al., 1997). Während Tiere mit etwa 5 % exprimiertem ADAM17 lebensfähig sind (Chalaris et al., 2010), wurden Tiere mit einem vollständigen ADAM17-Knockout als nicht lebensfähig beschrieben (Peschon et al., 1998). Der Phänotyp dieser Tiere zeigte zudem Ähnlichkeiten mit dem von Tieren mit einer Defizienz des *transforming growth factor alpha* (TGF- $\alpha$ ), einem Liganden des EGFR-Rezeptors (EGFR) (Zunke & Rose-John, 2017). Basierend auf der Tatsache, dass alle EGFR-Liganden gespalten werden müssen, um systemische Prozesse beeinflussen zu können (Jones et al., 2016), wurde ADAM17 als verantwortliche Protease für das *Shedding* von EGFR-Liganden vermutet (Peschon et al., 1998). Inzwischen konnten über 80 Substrate von ADAM17 identifiziert werden, zu denen unter anderem Zytokine, Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsproteine zählen (Becherer & Blobel, 2003; Black et al., 2003; Scheller et al., 2011; Uchikawa et al., 2015). Bei Mäusen mit einer Defizienz des *tissue inhibitor of metalloproteinase-3* (TIMP3), einem physiologischen Inhibitor von Metalloproteasen wie ADAM17 (Amour et al., 1998; Amour et al., 2000; Jackson et al., 2017), zeigte sich, dass die Tiere bedingt durch die fehlende Inhibition von ADAM17 durch TIMP3 eine erhöhte ADAM17-Aktivität und verstärkte Proteolyse von TNF- $\alpha$  aufwiesen, was zu einer Nekrose mit Versagen der Leber und schließlich zum Tod der Tiere führte (Mohammed et al., 2004). Beim Menschen konnten bislang bei zwei Familien genetische ADAM17-Defizienzen festgestellt werden (Blaydon et al., 2011; Bandsma et al., 2015), bei einer davon war diese hervorgerufen durch eine homozygote Deletion im ADAM17-Gen, was zu einem verkürzten Protein ohne funktionelle Domänen führte (Blaydon et al., 2011). In der zweiten Familie führte eine Leserasterverschiebung im ADAM17-Gen zu einem vorzeitigen Stoppcodon, das ein stark verkürztes oder ein fehlendes Protein zur Folge hatte (Bandsma et al., 2015). Klinische Konsequenzen der Mutationen waren eine verringerte Menge an löslichem TNF- $\alpha$  sowie eine verminderte Produktion von IL-2, was Hautausschläge, entzündliche Darmerkrankungen, Sepsis oder Myokarditis auslöste (Blaydon et al., 2011; Bandsma et al., 2015). Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass ADAM17 durch Modulation von Zytokinen und deren Rezeptoren eine kritische Rolle in der Regulation von Immunität, Infektion und Entzündungsprozessen spielt.

Obwohl ADAM17 eine konstitutive Aktivität aufweist, kann eine Stimulation der Protease die *Shedding*-Aktivität verstärken. Die Aktivierung von ADAM17 kann dabei über verschiedene Mechanismen erfolgen, die die Proteinkinase C (PKC), den *extracellular signal-regulated kinases* (ERK)/MAPK-Signalweg, die p38 MAPK und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren involvieren (Schäfer et al., 2004; Xu & Derynck, 2010; Dang et al., 2011). Für eine solche Stimulation ist der Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) eine häufig genutzte Substanz, da diese die Proteinkinase C sowie ERK und damit das ADAM17-regulierte *Shedding* aktiviert (Horiuchi et al., 2007).

### **1.8. Ziel der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Ektodomänen-*Shedding* des IL-2R $\alpha$  zu untersuchen und die Faktoren zur Generierung des löslichen IL-2R $\alpha$  sowie dessen biologische Funktion zu identifizieren. Mitte der 1980er Jahren konnte eine lösliche Form des IL-2R $\alpha$  identifiziert werden (Rubin et al., 1985), welche bei einer erhöhten Menge mit einer Vielzahl an Krankheiten assoziiert ist. Der Mechanismus, der zur Generierung des löslichen IL-2R $\alpha$  führt, ist jedoch noch immer nicht geklärt. Da es keine Hinweise darauf gibt, dass die Generierung des sIL-2R $\alpha$  über alternatives *Splicen* der mRNA erfolgt (Rubin et al., 1990; Damoiseaux, 2020), wird angenommen, dass der sIL-2R $\alpha$  durch proteolytische Spaltung der Rezeptor-Ektodomänen entsteht. Wichtig hierbei ist die Identifizierung der hauptverantwortlichen Proteasen im IL-2R $\alpha$ -*Shedding*. Verschiedene Zytokinrezeptoren wurden bereits als Substrate für die beiden wichtigen Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 identifiziert (Scheller et al., 2011; Lambrecht et al., 2018), so dass insbesondere die Rolle dieser Proteasen im IL-2R $\alpha$ -*Shedding in vitro* und ihre Beteiligung an der Produktion des sIL-2R $\alpha in vivo$  untersucht wurde.

Andere Substrate von ADAM10 und ADAM17 wurden nahe der Plasmamembran gespalten und bei Zytokinrezeptoren wie dem IL-6R schneiden die beiden Proteasen im membranproximalen *Stalk*-Bereich (Müllberg et al., 1994; Scheller et al., 2011; Goth et al., 2015; Riethmüller et al., 2017). Um zu untersuchen, ob auch der IL-2R $\alpha$  im membranproximalen Bereich der *Stalk*-Region geschnitten wird, sollen Expressionsplasmide generiert werden, die für den IL-2R $\alpha$  mit deletierten Abschnitten des *Stalk*-Bereichs codieren, und das *Shedding* der mit diesen Plasmiden transfizierten Zellen untersucht werden.

Ein weiterer Faktor, der möglicherweise eine funktionelle Rolle im Rezeptor-*Shedding* haben könnte, sind Glykosylierungen des Rezeptors. Beim IL-2R $\alpha$  gibt es sechs beschriebene Glykosylierungsstellen, zwei N-Glykane und vier O-Glykane (Miedel et al., 1988), deren Funktion im *Shedding* des IL-2R $\alpha$  jedoch nahezu unbekannt sind. Es soll daher untersucht werden, ob die Glykosylierungsstellen des IL-2R $\alpha$  einen Einfluss auf das IL-2R $\alpha$ -*Shedding* haben.

Obwohl es verschiedene Theorien über die funktionelle Rolle des sIL-2R $\alpha$  gibt (Dik & Heron, 2020), ist die genaue biologische Funktion des löslichen IL-2R $\alpha$  noch weitestgehend unbekannt. Dazu soll in der vorliegenden Arbeit in Jurkat-Zellen und schließlich in primären humanen CD3<sup>+</sup> T-Zellen das *Shedding* des IL-2R $\alpha$  und die Wirkung des sIL-2R $\alpha$  auf den IL-2-Signalweg in T-Zellen untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Antibiotika

**Tab. 1:** Verwendete Antibiotika.

Antibiotika	Hersteller
Ampicillin	Roche, Basel, CHE
Penicillin - Streptomycin	PAN-Biotech, Aidenbach, DEU

#### 2.1.2. Antikörper

##### 2.1.2.1. Primäre Antikörper

**Tab. 2:** Verwendete primäre Antikörper.

Antikörper	Hersteller
$\alpha$ -Actinin (D6F6) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Akt Rabbit Ab	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
ADAM10 Antibody	Abcam, Cambridge, GBR
ADAM 17 Antibody	Millipore by Merck, Darmstadt, DEU
CD3 Monoclonal Antibody (OKT3)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
CD28 Monoclonal Antibody (CD28.6)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
GAPDH (14C10) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
IL-2R $\alpha$ /CD25 (D6K5F) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Mouse IgG2a kappa Isotype Control (eBM2a)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
Myc-Tag (71D10) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p44/42 MAPK (Erk1/2) (L34F12) Mouse mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phospho-STAT3 (Tyr705) (D2A7) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phospho-STAT5 (Tyr694) (D47E7) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
STAT3 (124H6) Mouse mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
STAT5 alpha/beta (ST5-8F7) Mouse mAb	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA

### 2.1.2.2. Sekundäre Antikörper

**Tab. 3:** Liste der verwendeten sekundären Antikörper.

Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor™ 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
FITC anti-human CD25 (BC96)	BioLegend, San Diego, USA
FITC Mouse IgG1, $\kappa$ isotype Ctrl (MOPC-21)	BioLegend, San Diego, USA
IRDye® 680RD-Goat anti-Mouse IgG	LI-COR, Lincoln, USA
IRDye® 680RD Donkey anti-Rabbit IgG	LI-COR, Lincoln, USA
IRDye® 800CW Donkey anti-Rabbit IgG	LI-COR, Lincoln, USA

### 2.1.3. Chemikalien

**Tab. 4:** Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, DEU
2-Propanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Aceton	Roth, Karlsruhe, DEU
Agarose LE	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DEU
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
BM Blue POD Substrat	Roche, Basel, CHE
Bovine Serum Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe, DEU
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PAN-Biotech, Aidenbach, DEU
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe, DEU
Ethanol absolut	Chemsolute by Th. Geyer, Renningen, DEU
Ethanol 96 % vergällt mit MEK	Fischar, Saarbrücken, DEU
Glycerol	Roth, Karlsruhe, DEU
Glycin	Roth, Karlsruhe, DEU
Immobilon Western HRP Substrat	Millipore by Merck, Darmstadt, DEU
Methanol	Roth, Karlsruhe, DEU
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, DEU
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, DEU
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, DEU
Phosphate Buffered Saline-Tween (PBST)	Calbiochem by Merck, Darmstadt, DEU

Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma Aldrich, St. Louise, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich, St. Louise, USA
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Rotiphorese® Gel 30 Acrylamidstammlösung	Roth, Karlsruhe, DEU
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe, DEU
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, St. Louise, USA
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe, DEU
TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe, DEU
TRIS-hydrochlorid (Tris HCl)	Roth, Karlsruhe, DEU
Triton-X-100	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DEU
Tween® 20	Roth, Karlsruhe, DEU

#### 2.1.4. Enzyme und dazugehörige Puffer

**Tab. 5:** Verwendete Enzyme und dazugehörige Puffer.

Enzyme / Puffer	Hersteller
10 % NP-40	New England BioLabs, Ipswich, USA
$\alpha$ 2-3,6,8 Neuraminidase	New England BioLabs, Ipswich, USA
CloneAmp HiFi PCR Premix (2x)	Takara Bio Inc. Kusatsu, JPN
FastAP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest NheI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest NotI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GlycoBuffer 2 (10x)	New England BioLabs, Ipswich, USA
Glyco Denaturing Buffer (10x)	New England BioLabs, Ipswich, USA
HiFi DNA Assembly Master Mix	New England BioLabs, Ipswich, USA
O-Glycosidase	New England BioLabs, Ipswich, USA
PNGase F	New England BioLabs, Ipswich, USA
T4-DNA-Ligase (5 U/ $\mu$ l)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T4-DNA-Ligase Puffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA



### 2.1.5. Geräte

**Tab. 6:** Liste der verwendeten Geräte.  
**Geräte**

Geräte	Hersteller
Binder CB Inkubator	Binder, Tuttlingen, DEU
Centrifuge 5430 R	Eppendorf, Hamburg, DEU
CLARIOstar® Plus Plattenreader	BMG Labtech, Ortenberg, DEU
Countess II FL Automated Cell Counter	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
DNA Engine Gradient Cycler	Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA
Eppendorf Research® plus Einkanal-Pipetten	Eppendorf, Hamburg, DEU
Eppendorf Research® plus 8-Kanal-Pipetten	Eppendorf, Hamburg, DEU
FastGene Mini Centrifuge	NIPPON Genetics Europe, Düren, DEU
FluorChem E Systems	Cell Biosciences, Santa Clara, USA
LSR Flow Cytometry Analyzer	BD, Franklin Lakes, USA
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DEU
Mighty Bright UV Transilluminator	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
MIKRO 220/220R centrifuge	Hettich, Tuttlingen, DEU
Mini-PROTEAN® Tetra electrophoresis system	Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA
Mini Trans-Blot® Cell System	Bio-Rad, Hercules, USA
MS3 basic Minishaker	IKA®-Werke GmbH, Staufen, DEU
Nalgene™ Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pH-Meter pH 526 MultiCal®	WTW, Weilheim, DEU
Pipetboy pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DEU
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Schwabach, DEU
PowerPac™ Basic	Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA
ScanDrop <sup>2</sup>	Analytik Jena, Jena, DEU
Sicherheitswerkbank HERA safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermomixer comfort 5355	Eppendorf, Hamburg, DEU
Tube RollerRS-TR 5/10	Phoenix Instrument, Garbsen, DEU
Universalschüttler SM-30	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, DEU
Venenstauer	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Wasserbad W6	Labortechnik Medigen, Dresden, DEU
WB ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA

### 2.1.6. Größenmarker und Ladepuffer

Tab. 7: Verwendete Größenmarker und Ladepuffer.

Marker / Ladepuffer	Hersteller
DNA Loading Buffer, Blue (5x)	Bioline, Cincinnati, USA
GelRed® Nucleic Acid	Biotium, Fremont, USA
HyperLadder I, II, IV	Bioline, Cincinnati, USA
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

### 2.1.7. Inhibitoren und Aktivatoren

#### 2.1.7.1. Protease-Inhibitoren und -Aktivatoren

Tab. 8: Verwendete Protease-Inhibitoren und -Aktivatoren.

Inhibitoren	Zielprotein	Hersteller
4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (AEBSF)	Serinproteasen-Inhibitor	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
E-64	Cysteinproteasen-Inhibitor	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
GI254023X (GI)	ADAM10-Inhibitor	Iris Biotech, Marktredwitz, DEU
GW280264X (GW)	ADAM10/ADAM17-Inhibitor	Iris Biotech, Marktredwitz, DEU
Ionomycin	ADAM10-Aktivator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Marimastat (MM)	Metalloproteasen-Inhibitor	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
PepstatinA (PepA)	Aspartatproteasen-Inhibitor	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	ADAM17-Aktivator	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

#### 2.1.7.2. Signalweg-Inhibitoren

Tab. 9: Verwendete Signalweg-Inhibitoren.

Inhibitoren	Zielprotein	Hersteller
LY-294,002	PI3K/Akt	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Rapamycin	mTOR	Calbiochem by Merck, Darmstadt, DEU
SB203580	p38 MAPK	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tofacitinib	JAK1/3	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
U0126	ERK	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

### 2.1.8. Kits

**Tab. 10: Verwendete Kits.**  
**Kits**

	<b>Hersteller</b>
DC Protein Assay	Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA
Gene Jet Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Human CD25/IL-2R alpha Duo Set ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse CD25/IL-2R alpha DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren, DEU
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren, DEU
Mix & Go E.coli Transformation Kit™	Zymo Research, Irvine, USA

### 2.1.9. Kulturmedien und -reagenzien

#### 2.1.9.1. Bakterienmedium und -reagenzien

**Tab. 11: Bakterienmedium und -reagenzien.**  
**Reagenzien**

	<b>Hersteller</b>
Lysogeny-Broth (LB)-Agar	Roth, Karlsruhe, DEU
Lysogeny-Broth (LB)-Medium	Roth, Karlsruhe, DEU

#### 2.1.9.2. Zellkulturmedien und -reagenzien

**Tab. 12: Zellkulturmedien und -reagenzien.**  
**Reagenzien**

	<b>Hersteller</b>
DMEM, w: 4.5 g/L Glucose, stable Glutamine, 3.7 g/L NaHCO <sub>3</sub> , w/o Sodium pyruvate	PAN-Biotech, Aidenbach, DEU
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
Human TruStain FcX™	BioLegend, San Diego, USA
RPMI 1640, w: 4.5 g/L Glucose, 2 mM L-Glutamine, 1.5 g/L NaHCO <sub>3</sub> , 1 mM Sodium pyruvate, 10 mM HEPES	PAN-Biotech, Aidenbach, DEU
StraightFrom™ Whole Blood CD3 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DEU
Trypan Blue Stain (0.4 %)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Turbofect™ Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Whole Blood Column Elution Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DEU

### 2.1.10. Mausseren

Die Seren der ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Mäuse, der CD4-ADAM10<sup>-/-</sup>, CD4-ADAM17<sup>-/-</sup> und CD4-ADAM10<sup>-/-</sup>/ADAM17<sup>-/-</sup>-Mäuse sowie der jeweiligen Wildtyp-Mäuse wurden von Dr. Neele Schumacher (AG Rose-John, Biochemisches Institut, Universität Kiel, Kiel, DEU) und Dr. Tatiana Sezin (AG Scheffold, Institut für Immunologie, Universität Kiel & UKSH Schleswig-Holstein, Kiel, DEU) zur Verfügung gestellt. Serum von TIMP3<sup>-/-</sup>-Mäusen und der dazugehörigen Wildtyp-Tiere wurden von Prof. Anne Joutel (INSERM, Universität Paris, Paris, FRA) bezogen.

### 2.1.11. Plasmide

**Tab. 13:** Im Rahmen dieser Arbeit selbst hergestellte Plasmide.

Plasmid	Beschreibung
pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$	Expressionsvektor mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den Wildtyp des humanen IL-2R $\alpha$ kodiert.
pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ $\Delta$ A201_E210	Expressionsvektor mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den hIL-2R $\alpha$ kodiert, welcher eine Deletion von 10 AS im <i>Stalk</i> -Bereich ( $\Delta$ A201_E210) aufweist.
pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ $\Delta$ E187_E210	Expressionsvektor mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den hIL-2R $\alpha$ kodiert, welcher eine Deletion von 24 AS im <i>Stalk</i> -Bereich ( $\Delta$ E187_E210) aufweist.
pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ $\Delta$ E187_Q240	Expressionsvektor mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den hIL-2R $\alpha$ kodiert, welcher eine Deletion des <i>Stalk</i> -Bereichs von 54 AS ( $\Delta$ E187_Q240) aufweist.
pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ $\Delta$ E187_T190	Expressionsvektor mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den hIL-2R $\alpha$ kodiert, welcher eine Deletion von 4 AS im <i>Stalk</i> -Bereich ( $\Delta$ E187_T190) aufweist.
pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ $\Delta$ E231_Q240	Expressionsvektor mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den hIL-2R $\alpha$ kodiert, welcher eine Deletion von 10 AS im <i>Stalk</i> -Bereich ( $\Delta$ E231_Q240) aufweist.
pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ $\Delta$ Q221_M230	Expressionsvektor mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den hIL-2R $\alpha$ kodiert, welcher eine Deletion von 10 AS im <i>Stalk</i> -Bereich ( $\Delta$ Q221_M230) aufweist.
pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ $\Delta$ S191_Q200	Expressionsvektor mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den hIL-2R $\alpha$ kodiert, welcher eine Deletion von 10 AS im <i>Stalk</i> -Bereich ( $\Delta$ S191_Q200) aufweist.
pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ $\Delta$ T211_F220	Expressionsvektor mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den hIL-2R $\alpha$ kodiert, welcher eine Deletion von 10 AS im <i>Stalk</i> -Bereich ( $\Delta$ T211_F220) aufweist.

Tab. 14: Weitere im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung und Herkunft
pcDNA3.1	Expressionsvektor für transiente Proteinexpressionen in Säugetierzellen. Der Vektor wurde von Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA bezogen und von Dr. Juliane Lokau (AG Garbers, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Magdeburg, DEU) zur Verfügung gestellt.
pcDNA3.1-myc-IL-11R	Expressionsvektor mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den Wildtyp des hIL-11R kodiert. Der Vektor wurde erstmals von Düsterhöft et al. (2014) publiziert und von Dr. Juliane Lokau (AG Garbers, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Magdeburg, DEU) zur Verfügung gestellt.
pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ _N70A	Expressionsvektor mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den hIL-2R $\alpha$ kodiert und eine Punktmutation an der Stelle N70 enthält. Die Aminosäure Asparagin (N) wurde durch Alanin (A) ersetzt, welche eine ähnliche Konformation wie N hat, jedoch keine Bindestelle für Glykane darstellt. Das Plasmid wurde von Amelie Hagedorn (AG Garbers, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Magdeburg, DEU) kloniert.
pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ _N89A	Expressionsvektor mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den hIL-2R $\alpha$ kodiert und eine Punktmutation an der Stelle N89 enthält. Die Aminosäure Asparagin (N) wurde durch Alanin (A) ersetzt, welche keine Bindestelle für Glykane darstellt. Das Plasmid wurde von Amelie Hagedorn (AG Garbers, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Magdeburg, DEU) kloniert.
pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ _T218A	Expressionsvektor mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den hIL-2R $\alpha$ kodiert und eine Punktmutation an der Stelle T218 enthält. Die Aminosäure Threonin (T) wurde durch Alanin (A) ersetzt, so dass an dieser Stelle keine Glykane gebunden werden können. Das Plasmid wurde von Amelie Hagedorn (AG Garbers, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Magdeburg, DEU) kloniert.
pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ _T224A	Expressionsvektor mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den hIL-2R $\alpha$ kodiert und eine Punktmutation an der Stelle T224 enthält. Die Aminosäure Threonin (T) wurde durch Alanin (A) ersetzt, welche keine Bindestelle für Glykane darstellt. Das Plasmid wurde von Amelie Hagedorn (AG Garbers, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Magdeburg, DEU) kloniert.

pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ _T229A	Expressionsvektor mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den hIL-2R $\alpha$ kodiert und eine Punktmutation an der Stelle T229 enthält. Die Aminosäure Threonin (T) wurde durch Alanin (A) ersetzt, welche keine Bindestelle für Glykane darstellt. Das Plasmid wurde von Amelie Hagedorn (AG Garbers, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Magdeburg, DEU) zur Verfügung gestellt.
pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ _T237A	Expressionsvektor mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den hIL-2R $\alpha$ kodiert und eine Punktmutation an der Stelle T237 enthält. Die Aminosäure Threonin (T) wurde durch Alanin (A) ersetzt welche keine Bindestelle für Glykane darstellt. Das Plasmid wurde von Amelie Hagedorn (AG Garbers, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Magdeburg, DEU) kloniert.
pUC57-myc-IL-2R $\alpha$ ( <i>myc-tagged sequence</i> )	Plasmid mit <i>myc-tag</i> , dessen Insert für den hIL-2R $\alpha$ kodiert. Das Plasmid wurde von Genscript Biotech (Piscataway Township, USA) bezogen.

### 2.1.12. Primer

**Tab. 15:** Verwendete Primer.  
**Primer**

Primer	Sequenz (5'-3')
IL-2Ra_GA_fwd	TAGGGAGACCCAAGCTGGGCTTATCGAAATTAA
IL-2Ra_GA_rev	CTAGACTCGAGCGGCCATCAGCGGGTTTAA
IL-2Ra $\Delta$ A201_E210_1rev	GACGAGGCAGGAAGTCTGAGGCTTCTCTTC
IL-2Ra $\Delta$ A201_E210_2fwd	GAAGAGAAGCCTCAGACTTCTGCCTCGTC
IL-2Ra $\Delta$ E187_E210_1rev	GACGAGGCAGGAAGTACCTGTGCATATGAG
IL-2Ra $\Delta$ E187_E210_2fwd	CTCATATGCACAGGTA CTCTGCCTCGTC
IL-2Ra $\Delta$ E187_Q240_1rev	GCCGGCCACTGCTACACCTGTGCATATGAG
IL-2Ra $\Delta$ E187_Q240_2fwd	CTCATATGCACAGGTGTAGCAGTGGCCGGC
IL-2Ra $\Delta$ E187_T190_1rev	ACCTGGAACTGACTACCTGTGCATATGAG
IL-2Ra $\Delta$ E187_T190_2fwd	CTCATATGCACAGGTAGTCAGTTTCCAGGT
IL-2Ra $\Delta$ E231_Q240_1rev	GCCGGCCACTGCTACCATGGTTGCAGCCAT
IL-2Ra $\Delta$ E231_Q240_2fwd	ATGGCTGCAACCATGGTAGCAGTGGCCGGC
IL-2Ra $\Delta$ S191_Q200_1rev	GCCTTCGGGGCTTGCGGTCTCCATTTACC
IL-2Ra $\Delta$ S191_Q200_2fwd	GGTGAAATGGAGACCGCAAGCCCCGAAGGC
IL-2Ra $\Delta$ Q221_M230_1rev	AAATATGGACGTCTCAAATCTGTTGTTGT
IL-2Ra $\Delta$ Q221_M230_2fwd	ACAACAACAGATTTTGAGACGTCCATATTT
IL-2Ra $\Delta$ T211_F220_1rev	TTCTGTCTGATTTGCTCACTCTCAGGACG
IL-2Ra $\Delta$ T211_F220_2fwd	CGTCCTGAGAGTGAGCAAATACAGACAGAA

### 2.1.13. Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Puffer und Lösungen in dH<sub>2</sub>O angesetzt.

#### 2.1.13.1. Agarose-Gelelektrophorese

Tab. 16: Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
Tris-Acetate-EDTA Puffer (TAE)	40 mM Tris 1 mM EDTA (pH 8,0) 0,6 % (V/V) Essigsäure

#### 2.1.13.2. Zellyse und Zellkultur

Tab. 17: Puffer und Lösungen für Zellyse und Zellkultur.

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
Einfriermedium	5 % DMSO in FCS
Lysepuffer pH 7,5	10 mM Tris HCl 140 mM NaCl 5 mM EDTA (pH 8,0) 1 % (V/V) Triton-X 100 1 % (V/V) Protease Inhibitor Cocktail 1 % (V/V) Phosphatase Inhibitor Cocktail 3
Phosphate Buffered Saline (PBS)	137 mM NaCl 27 mM KCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 14,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

#### 2.1.13.3. Durchflusszytometrie

Tab. 18: Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie.

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
FACS-Puffer	1 % (m/V) BSA in PBS

#### 2.1.13.4. *Magnetic Activated Cell Separation (MACS)*

Tab. 19: Puffer und Lösungen für MACS.

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
MACS Separation Puffer	0,5 % (m/V) BSA 2 mM EDTA in PBS (pH 7,2)

### 2.1.13.5. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

**Tab. 20: Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).  
Puffer / Lösungen**

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
Laemmlipuffer (2x)	4 % (m/V) SDS 20 % (V/V) Glycerol 10 % (V/V) $\beta$ -Mercaptoethanol 125 mM Tris HCl (pH 6,8) Spatelspitze Bromphenolblau
Laemmlipuffer (5x)	10 % (m/V) SDS 50 % (V/V) Glycerol 25 % (V/V) $\beta$ -Mercaptoethanol 312,5 mM Tris HCl (pH 6,8) Spatelspitze Bromphenolblau
Laufpuffer pH 8,3-8,8	25 mM Tris HCl 192 mM Glycin 0,1 % (m/V) SDS
Sammelgelpuffer pH 6,8	1,87 M Tris 0.5 % (m/V) SDS
Trenngelpuffer pH 8,8	1,87 M Tris 1 % (m/V) SDS

### 2.1.13.6. Western Blot

**Tab. 21: Puffer und Lösungen für den Western Blot.  
Puffer / Lösungen**

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
Blocking Puffer für Nitrocellulose-Membran	5 % (m/V) BSA in TBST
Blocking Puffer für PVDF-Membran	5 % (m/V) Milchpulver in TBST
Tris Buffered Saline (TBS) pH 7,4-7,6	7,4 mM Tris 56,5 mM Tris HCl 150 mM NaCl
Tris Buffered Saline - Tween (TBST)	1 % (V/V) Tween®20 in TBS
Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (V/V) Methanol
Verdünnungspuffer primäre Antikörper	5 % BSA (m/V) in TBST
Verdünnungspuffer sekundäre Antikörper für Nitrocellulose-Membran	5 % BSA (m/V) in TBST
Verdünnungspuffer sekundäre Antikörper für PVDF-Membran	5 % (m/V) Milchpulver in TBST



### 2.1.14. Rekombinante Zytokine und Rezeptoren

**Tab. 22: Verwendete Zytokine und Rezeptoren.**  
**Zytokine / Rezeptoren**

Zytokine / Rezeptoren	Hersteller
Recombinant Human CD25/IL-2R alpha His-tag Protein, CF	R&D Systems, Minneapolis, USA
Recombinant Human IL-2	ImmunoTools, Friesoythe, DEU

### 2.1.15. Verbrauchsmaterialien

**Tab. 23: Liste der Verbrauchsmaterialien.**

Materialien	Hersteller
Amersham™ Protran™ 0,2 µm Nitrocellulose Blotting Membrane	GE Healthcare, Chicago, USA
CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT
Corning® 100 mm TC-treated Culture Dish	Corning, New York, USA
Countess™ Cell Counting Chamber Slides	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CryoPure Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Discardit™ II Spritze 2 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Immobilon®-P Membran, PVDF, 0,45 µm	Millipore by Merck, Darmstadt, DEU
Mikrotestplatte 96 Well, F	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Multiply®-µStripPro LP PCR Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Nunc-Immuno™ 96 MicroWell™ Feste Platten	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Petrischalen 92 x 16 mm	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 300 µl, 1.000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Pipettenspitzen (5 ml, 10 ml)	Eppendorf, Hamburg, DEU
S-Monovette® Lithium-Heparin, 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
SafeSeal Reaktionsgefäß (500 µl, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Safety-Multifly®-Kanüle, 21 G x 3/4, grün	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	VWR, Radnor, USA
Spritzenfilter 0,45 µm	TPP, Trasadingen, CHE
Whatman™ Chromatography Paper 3 MM CHR	GE Healthcare, Chicago, USA
Whole Blood LS Column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DEU
Zellkultur Multiwellplatte, CELLSTAR®, TC (6well, 12well, 24well)	Greiner bio-one, Kremsmünster, AUT

### 2.1.16. Zelllinien und Bakterien

Tab. 24: Verwendete Zelllinien und Bakterien.  
Zelllinien / Bakterien

Zelllinien / Bakterien	Beschreibung/Herkunft
HEK293 WT	„Human Embryonic Kidney“-Zellen; immortalisierte humane embryonale Zellen aus der Niere, die sich als Modellzelllinie für Transfektionen etabliert hat; ATCC-Code: CRL-1573; DSMZ-Nummer: ACC 305
HEK293 ADAM10 <sup>-/-</sup>	HEK293-Zellen, die eine Defizienz der Metalloproteinase ADAM10 aufweisen. Das für ADAM10 codierende Gene wurde mittels CRISPR/Cas9 deletiert. Die Zellen sind in Riethmüller et al. (2016) beschrieben.
HEK293 ADAM17 <sup>-/-</sup>	HEK293-Zellen, die eine Defizienz der Metalloproteinase ADAM17 aufweisen. Das für ADAM17 codierende Gene wurde mittels CRISPR/Cas9 deletiert. Die Zellen sind in Riethmüller et al. (2016) beschrieben.
HEK293 ADAM10 <sup>-/-</sup> / ADAM17 <sup>-/-</sup>	HEK293-Zellen, die eine Defizienz der Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 aufweisen. Die für ADAM10 und ADAM17 codierenden Gene wurden mittels CRISPR/Cas9 deletiert. Die Zellen sind in Riethmüller et al. (2016) beschrieben.
HDLM-2	Humane Hodgkin Lymphom-Zellen; exprimieren alle drei IL-2 Rezeptortypen (IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$ und $\gamma_c$ ) (Gruss et al., 1992); die Zellen wurden von der DSMZ Braunschweig bezogen; DSMZ-Nummer: ACC 17
Jurkat	Immortalisierte humane T-Lymphozyten-Zellen, die sich als geeignete Zelllinie zu Untersuchungen des T-Zell- <i>signaling</i> etabliert hat; exprimieren nach <i>in vitro</i> -Aktivierung den IL-2R $\alpha$ auf der Zelloberfläche (Ryffel et al., 1995; Shatrova et al., 2015; Kirschke et al., 2022); ATCC-Code: TIB-152; DSMZ-Nummer: ACC 282
Subcloning Efficiency™ DH5 $\alpha$ Competent cells	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Messung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen erfolgte spektrometrisch mithilfe des Mikrovolumen Spektralphotometers ScanDrop<sup>2</sup> (Analytik Jena, Jena, DEU). Die DNA-Reinheit wurde über das Absorptionsverhältnis  $A_{260}/A_{280}$  gemessen, bei dem ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 als akzeptabler Reinheitsgrad gilt. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Plasmide verwendet, deren Reinheits-Quotient  $\geq 1,8$  war, um Verunreinigungen der DNA ausschließen zu können.

#### 2.2.1.2. Restriktionsspaltung von DNA

Um die Expression des IL-2R $\alpha$  in HEK293-Zellen zu ermöglichen, wurde das Insert aus dem pUC57-myc-IL-2R $\alpha$ -Plasmid in den pcDNA3.1-Expressionsvektor eingebracht. Die Spaltung der Plasmid-DNA wurde dabei mittels Restriktionsendonukleasen durchgeführt, die komplementäre Überhänge an Vektor und Insert erzeugten, um eine spätere Ligation beider Fragmente zu ermöglichen. Die Restriktionsansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

	Restriktionsansatz des Inserts	Restriktionsansatz des Vektors
pUC57-myc-IL2R $\alpha$	3 $\mu$ g	-
pcDNA3.1-myc-IL-11R	-	10 $\mu$ g
FastDigest Puffer	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
FastDigest NheI	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
FastDigest NotI	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l	ad 50 $\mu$ l

Die Ansätze wurden für 15 min bei 37 °C inkubiert, bevor der Ansatz des Vektors anschließend dephosphoryliert (s. Abschnitt 2.2.1.3) und die DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. Abschnitt 2.2.1.4) aufgetrennt wurden. Die DNA-Fragmente mit der Größe von etwa 880 bp (Insert) bzw. 5350 bp (Vektor) wurden extrahiert und gereinigt (s. Abschnitt 2.2.1.5), so dass Insert und Vektor anschließend mittels Ligation (s. Abschnitt 2.2.1.7) verbunden und damit das pcDNA3.1-myc-IL2R $\alpha$ -Plasmid generiert werden konnten.

### **2.2.1.3. Dephosphorylierung der Vektor-DNA**

Nachdem die Vektor-DNA mittels Restriktionsendonukleasen gespalten wurde, erfolgte die Zugabe von 1 U FastAP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und eine anschließende Inkubation des Ansatzes für 15 min bei 37 °C. Die enthaltene alkalische Phosphatase katalysiert dabei die Freisetzung von 5'- und 3'-Phosphatgruppen in der DNA, um eine vorzeitige Re-Ligation der Vektorenden zu verhindern. Der dephosphorylierte Vektor-Ansatz wurde anschließend auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen.

### **2.2.1.4. Agarose-Gelelektrophorese**

Um DNA-Fragmente ihrer Größe nach zu trennen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde 1 % Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, mit 0.005 % GelRed (Biotium, Fremont, USA) versetzt und zum Erkalten in einen Schlitten der Gel Kammer Gel Cell Compartment (Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA) gegossen. Die Proben wurden mit DNA-Probenpuffer (5x) (Bioline, Cincinnati, USA) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Bei einer konstanten Spannung von 100 V wurden die DNA-Fragmente aufgetrennt und mithilfe des FluorChem E Systems (Cell Biosciences, Santa Clara, USA) detektiert.

### **2.2.1.5. Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Extraktion der DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden die Fragmente unter dem UV-Licht des Mighty Bright UV Transilluminator (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) visualisiert und mithilfe eines Skalpells ausgeschnitten. Die Fragmente wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die DNA mithilfe des Gene Jet Extraction Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben isoliert, gereinigt und in 30 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

### **2.2.1.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA, bei der spezifische DNA-Sequenzen über mehrere Zyklen exponentiell vervielfältigt werden. Jeder Zyklus durchläuft dabei die drei Schritte aus der Denaturierung zum Trennen der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge, der anschließenden Primerhybridisierung, bei der sich die spezifischen Primer bei abgesenkter Temperatur an die DNA anlagern können, und der abschließenden Elongation, in der die DNA-Abschnitte mittels DNA-Polymerase vervielfältigt wird. Die PCRs wurden im DNA Engine Gradient Cycler (Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA) durchgeführt. Die PCR-Ansätze wurden nach folgendem Schema mit den spezifischen Primern und dem CloneAmp HiFi PCR Premix (2x)

(Takara Bio Inc. Kusatsu, JPN) pipettiert und liefern in folgend aufgeführtem Cyclers-Programm:

Ansatz PCRs:

Template	< 100 ng
5' Primer [5 µM]	1 µl
3' Primer [5 µM]	1 µl
Clone Amp HiFi PCR Premix (2x)	10 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad <b>20 µl</b>

Cycler-Programm:

95 °C	5 min	
95 °C	20 sec	} 32x
60 °C	15 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

Die Elongationszeit (hier 30 sec bei 72 °C) wurde in Abhängigkeit von der Größe des Amplifikats und der Leistung der Polymerase gewählt.

Nach Ablauf der PCR wurden die Produkte auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, nach Größe getrennt (s. Abschnitt 2.2.1.4), ausgeschnitten und mittels Gelextraktion gereinigt (s. Abschnitt 2.2.1.5).

Für den Einbau von Deletionen im *Stalk*-Bereich des IL-2R $\alpha$  wurden spezifische Primer verwendet, die die zu deletierenden Sequenzen begrenzen und dadurch den Startpunkt der DNA-Synthese um den neuen Deletionsbereich festlegen. Pro Deletion wurden zunächst Einzel-PCRs durchgeführt, bei denen zwei DNA-Fragmente mit Begrenzung vor oder hinter dem zu deletierenden Bereich entstanden. Mittels Fusions-PCR wurden diese beiden Fragmente ligiert und amplifiziert, so dass das Endprodukt die spezifische Deletion enthielt. Die PCR-Produkte der beiden einzelnen PCRs wurden hierbei als Templates für die Fusions-PCR eingesetzt und mit CloneAmp HiFi PCR Premix (2x) (Takara Bio Inc. Kusatsu, JPN) wie nachfolgend beschrieben angesetzt:

Ansatz Fusions-PCRs:

Template [1. PCR-Produkt]	2 µl
Template [2. PCR-Produkt]	2 µl
5' Primer (GA) [5 µM]	1 µl
3' Primer (GA) [5 µM]	1 µl
Clone Amp HiFi PCR Premix (2x)	10 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad <b>20 µl</b>

Cycler-Programm:

95 °C	5 min	
95 °C	20 sec	} 32x
60 °C	15 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

Die PCR-Produkte wurden für die Fertigstellung der Plasmide nach Ablauf der PCR mithilfe der Gibson-Assembly mit dem Vektor verbunden (s. Abschnitt 2.2.1.8) und damit die pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ -Plasmide generiert.

### 2.2.1.7. Ligation von Vektor und Insert

Zur Fertigstellung des pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ -Plasmids wurden das geschnittene Insert und der geschnittene und dephosphorylierte Vektor mithilfe der T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wie nachfolgend aufgeführt ligiert:

	Ligationsansatz	Negativkontrolle
Vektor	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Insert	9 $\mu$ l	-
T4 DNA-Ligase-Puffer (10x)	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
T4 DNA-Ligase (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l	ad 20 $\mu$ l

Neben dem Ligationsansatz wurde eine Negativkontrolle angesetzt, die im Gegensatz zum Probenansatz kein Insert enthielt. Die Ansätze wurden zunächst 3-4 Stunden bei 4 °C und anschließend für 1 h bei 37 °C inkubiert. Jeweils 1  $\mu$ l der Ansätze wurde für die Bakterientransformation eingesetzt (s. Abschnitt 2.2.1.9).

### 2.2.1.8. Gibson-Assembly

Die Gibson-Assembly ermöglicht unabhängig von der Länge der Fragmente das nahtlose Ligieren mehrerer DNA-Fragmente in einer einzigen, isothermen Reaktion. Im Gegensatz zur herkömmlichen Ligation bietet die Gibson-Assembly jedoch den Vorteil, dass keine Restriktionsspaltung der PCR-Produkte notwendig ist und die Durchführung weniger Zeitaufwand benötigt. Der verwendete HiFi DNA Assembly Master Mix (New England BioLabs, Ipswich, USA) enthält Exonuklease, Polymerasen und Ligasen, die eine zeitgleiche Reaktion mehrerer Enzyme ermöglicht. Mithilfe der Gibson-Assembly wurden die fusionierten PCR-Produkte des IL-2R $\alpha$  mit den enthaltenen spezifischen Deletionen im *Stalk*-Bereich mit dem geschnittenen und dephosphorylierten Vektor verbunden. Die Ansätze wurden wie nachfolgend aufgeführt angesetzt:

	Ligationsansätze	Negativkontrolle
Vektor	30 ng	30 ng
PCR-Produkt (Fusions-PCR)	60 ng	-
HiFi DNA Assembly Master Mix	5 µl	5 µl
dH <sub>2</sub> O	ad <b>10 µl</b>	ad <b>10 µl</b>

Zusätzlich zu den Ligationsansätzen wurde eine Negativkontrolle angesetzt, die statt des PCR-Produkts dH<sub>2</sub>O enthielt. Die Ansätze wurden für 15 min bei 50 °C im DNA Engine Gradient Cycler (Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA) inkubiert und 1 µl zur Transformation in kompetente Bakterien (Abschnitt 2.2.1.9) eingesetzt.

#### **2.2.1.9. Hitzeschock-Transformation von chemisch kompetenten *Escherichia coli* DH5α-Bakterien**

Die Hitzeschock-Transformation ist eine Methode zur Einbringung rekombinanter DNA in Bakterien. Die eingesetzten chemisch kompetenten DH5α-Bakterien wurden mithilfe des Mix & Go *E. coli* Transformation Kit™ (Zymo Research, Irvine, USA) vorbereitet und zur Lagerung in 30 µl-Aliquots weggefroren. Für die Hitzeschock-Transformation wurden die Bakterien zunächst auf Eis aufgetaut und kurz zentrifugiert, bevor 1 µl des Ligationsansatzes bzw. des entsprechenden Kontrollansatzes oder 1 µl des zu transformierenden Plasmids in die Bakteriensuspension pipettiert wurde. Nach 5 min Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock für 60 sec bei 42 °C und eine anschließende Abkühlung auf Eis für 5 min. Die Bakteriensuspension wurde mit 300 µl LB-Medium vermischt und für 45 min bei 37 °C und 350 rpm im Thermomixer comfort 5355 (Eppendorf, Hamburg, DEU) inkubiert, bevor die Suspension auf LB-Agar-Ampicillin (100 µg/ml)-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden.

#### **2.2.1.10. Plasmid-DNA-Mini-Präparation und Sequenzierung**

Um Plasmide sequenzieren zu lassen, wurde eine Plasmid-DNA-Mini-Präparation durchgeführt. Hierfür wurden die auf den LB-Agar-Ampicillin-Platten gewachsenen Kolonien mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß, versehen mit einem Loch im Deckel für eine ausreichende Sauerstoffzufuhr, mit 2 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin überführt. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C und 350 rpm im Thermomixer comfort 5355 (Eppendorf, Hamburg, DEU) erfolgte die Präparation mithilfe des

NUCLEOSPIN® PLASMID-Kits (Macherey-Nagel, Düren, DEU) nach Herstellerangaben. Die Plasmide wurden in 50 µl dH<sub>2</sub>O eluiert und schließlich von Eurofins Genomics (Luxemburg, LUX) via Sanger Sequenzierung unter Verwendung der IL-2Ra\_GA-Primer sequenziert.

#### **2.2.1.11. Plasmid-DNA-Midi-Präparation**

Nach erfolgreicher Bakterientransformation und Plasmidsequenzierung erfolgte das Ansetzen der Bakterien für die Plasmid-DNA-Midi-Präparation. Hierfür wurde mithilfe einer Pipettenspitze eine Bakterienkolonie von der LB-Ampicillin-Platte aufgenommen und in einen Kolben mit 100 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 160 rpm im Universalschüttler SM-30 (Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, DEU) wurden die Bakterien in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 4.000 rpm und 4 °C für 10 min in der Zentrifuge 5430 (Eppendorf, Hamburg, DEU) pelletiert. Die anschließende Durchführung der Midi-Präparation aus dem Bakterienpellet erfolgte mithilfe des NUCLEOBOND® XTRA MIDI-Kits (Macherey-Nagel, Düren, DEU) nach Protokoll des Herstellers.

### **2.2.2. Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.2.1. Kultivierung adhärenter Zellen**

Die Kultivierung der adhärent wachsenden HEK293-Zellen erfolgte in 10 cm-Schalen in 10 ml DMEM-Kulturmedium (s. Tab. 25) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Konfluente Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit 10 ml PBS gewaschen und im Verhältnis 1:20 in neue 10 cm-Schalen mit frischem Kulturmedium überführt.

#### **2.2.2.2. Kultivierung von Suspensionszellen**

HDLM-2-Zellen, Jurkat-Zellen und isolierte CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden in 10 cm-Schalen mit jeweils 10 ml RPMI-Kulturmedium (s. Tab. 25) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Um ein optimales Wachstum der Zellen zu erzielen, wurden die HDLM-2-Zellen alle drei bis vier Tage im Verhältnis 1:3 in neue Schalen mit frischem Medium überführt. Die Jurkat-Zellen wurden im gleichen zeitlichen Abstand im Verhältnis 1:10 in neue Schalen mit frischem Medium umgesetzt. Primäre CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden unmittelbar nach der Isolation aus Blut (s. Abschnitt 0) in RPMI-Medium (s. Tab. 25) aufgenommen und nur über wenige Tage kultiviert.



**Tab. 25: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.**

Zelllinie	Kulturform	Medium	FCS	Penicillin/Streptomycin
HEK293 WT	adhärente Zellen	DMEM	10 %	60 mg/l / 100 mg/l
HEK293 ADAM10 <sup>-/-</sup>	adhärente Zellen	DMEM	10 %	60 mg/l / 100 mg/l
HEK293 ADAM17 <sup>-/-</sup>	adhärente Zellen	DMEM	10 %	60 mg/l / 100 mg/l
HEK293 ADAM10 <sup>-/-</sup> / ADAM17 <sup>-/-</sup>	adhärente Zellen	DMEM	10 %	60 mg/l / 100 mg/l
HDLM-2	Suspensionszellen	RPMI	20 %	60 mg/l / 100 mg/l
Jurkat	Suspensionszellen	RPMI	10 %	60 mg/l / 100 mg/l
primäre humane CD3 <sup>+</sup>	Suspensionszellen	RPMI	10 %	60 mg/l / 100 mg/l

### 2.2.2.3. Kryokonservierung

Um Zellen für eine spätere Verwendung zu konservieren, wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von mindestens 80 % kultiviert. Nach einem Waschschrift mit 10 ml PBS wurden die Zellen mit 3 ml Einfriermedium pro Schale aufgenommen und jeweils 1 ml der Zellsuspension in CryoPure Kryoröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, DEU) überführt, die dann in Kryobehältern (Nalgene™ Mr. Frosty™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei -80 °C eingefroren wurden.

### 2.2.2.4. Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Eine transiente Transfektion beschreibt das Einbringen einer Fremd-DNA in Wirtszellen, bei der die DNA nicht permanent in das Wirtsgenom eingebaut, sondern nur zeitweilig integriert wird. Die Transfektion der HEK293-Zellen wurde mithilfe des TurboFect™ Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt, welches positiv geladene Komplexe mit der DNA bildet, diese damit vor dem Abbau schützt und somit den effizienten Einbau der DNA in die Wirtszelle erleichtert.

Für die Transfektion wurden  $2 \times 10^6$  HEK293-Zellen in 10 ml Kulturmedium in einer 10 cm-Schale ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Die Transfektionsansätze aus 5 µg DNA und 10 µl TurboFect™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in 1 ml serumfreiem DMEM wurden 15 min bei RT vorinkubiert, bevor diese auf die Zellen gegeben und über Nacht unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert wurden.

### 2.2.2.5. Isolierung von primären humanen CD3<sup>+</sup> T-Zellen (MACS)

Die magnetische Zellseparation (*Magnetic Activated Cell Separation*, MACS) ermöglicht es, Zellen durch ein mit Magnetismus unterstütztes Verfahren anhand ihrer Oberflächenstrukturen zu sortieren und bestimmte Zellpopulationen aus Blut zu isolieren. Dabei wird das Blut mit speziellen magnetischen *beads* inkubiert, die an Antikörper gebunden sind und damit die spezifischen Oberflächenstrukturen der Zielzellen erkennen und diese binden können. Die Isolierung von primären CD3<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte hier aus humanem Blut. Die ethische Zulassung zur Isolierung primärer humaner T-Zellen wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg eingeholt (Zulassungsnummer 129/19). Die Studie entspricht den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen der WMA Deklaration von Helsinki. Alle Spender dieser Studie gaben eine schriftliche Einverständniserklärung.

Alle nachfolgend genannten Materialien zur magnetischen Zellseparation wurden von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, DEU) bezogen. Das Blut der Spender wurde in Blutentnahmeröhrchen mit Lithium-Heparin gesammelt und einige Minuten bei 4 °C gerollt. Anschließend wurde das Blut in ein neues 15 ml Falcon überführt, mit 50 µl StraightFrom™ Whole Blood CD3 MicroBeads pro 1 ml Blut vermischt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte die Vorbereitung der Säule. Diese wurde in den MidiMACS™ Separator gesetzt und an den MACS® MultiStand gehängt. Die Matrix der verwendeten LS-Säulen besteht aus ferromagnetischen Kugeln, die ihr Magnetfeld im Separator um das 10.000-fache verstärken, so dass nur die magnetisch markierten Zellen in der Säulenmatrix gehalten werden. Diese Art der Selektion wird auch als positive Selektion bezeichnet. Die Säule wurde mit 3 ml *Separation Buffer* gewaschen und anschließend mit dem Blut beladen. Nach vollständigem Durchlaufen des Blutes durch die Säule wurde diese 3x mit 3 ml *Separation Buffer* gewaschen. Um nun die isolierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen zu sammeln, wurde die Säule aus dem Magneten genommen und auf ein neues 15 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Das Lösen der magnetisch gebundenen CD3<sup>+</sup> T-Zellen aus der ferromagnetischen Matrix der Säule erfolgte mit 4 ml raumwarmem *Elution Buffer*, der auf die Säule gegeben und mit dem Pumper durchgedrückt wurde. Die gesammelten CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden gezählt und direkt für den Versuchsansatz verwendet.

### 2.2.2.6. *In vitro*-Aktivierung von Jurkat- und primären CD3<sup>+</sup> T-Zellen

Zur Aktivierung des T-Zell-Rezeptors humaner T-Zellen oder Jurkat-Zellen wurden die Vertiefungen einer 12well-Platten mit 5 µg/ml αCD3 oder der entsprechenden Isotyp-Kontrolle in PBS über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am folgenden Tag wurden 1 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Vertiefung in die zuvor beschichteten Vertiefungen ausgesät und mit 2 µg/ml αCD28 oder Isotyp-Kontrolle behandelt, bevor sie für 48 h inkubiert wurden. Alternativ wurden die Zellen mit 100 nM PMA und 1 µM Ionomycin stimuliert oder zusätzlich mit 3 µM GI, 3 µM GW oder 10 µM MM für die Zeit der Aktivierung behandelt.

### 2.2.2.7. Analyse des Ektodomänen-*Shedding* des Interleukin-2 α-Rezeptors in HEK293- und HDLM-2-Zellen

Um das konstitutive und stimulierte Ektodomänen-*Shedding* zu untersuchen, wurden transfizierte HEK293-Zellen 24 h nach der Transfektion mit 4 ml Kulturmedium von der Platte gelöst und 1 ml pro Vertiefung in 6well-Platten überführt. Das Gesamtvolumen wurde mit Kulturmedium auf 2 ml pro Vertiefung aufgefüllt und die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und mit 1 ml serumfreiem DMEM-Medium versetzt.

Die HDLM-2-Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen, bevor sie in serumfreiem RPMI-Medium aufgenommen und in einem Volumen von 1.5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Vertiefung in 6well-Platten ausgesät wurden.

Zur Analyse des konstitutiven *Shedding* erfolgte die Inkubation der Zellen in serumfreiem Medium für 24 h. Zur Bestimmung der verantwortlichen Proteasen wurden die Zellen zusätzlich mit 3 µM GI, 3 µM GW, 10 µM Marimastat (MM), 1 mM AEBSF, 10 µM E64 oder 1 µM Pepstatin A (PepA) behandelt. Alternativ erfolgte für die Analyse des Einflusses von Signalweg-Inhibitoren auf das IL-2Rα-*Shedding* eine Behandlung mit 10 µM Tofacitinib, 10 µM U0126, 4 µM LY-294,002, 10 µM SB203580 oder 500 nM Rapamycin. Jeweils ein Ansatz blieb dabei als Negativkontrolle unbehandelt, ein weiterer wurde mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle angesetzt. Die Ernte der Zellen und der Zellkulturüberstände erfolgte nach 24 h Inkubation.

Um das stimulierte *Shedding* zu analysieren, wurden die Zellen für 1 h mit 1 µM Ionomycin oder für 2 h mit 100 nM PMA in serumfreiem Medium behandelt und nach der jeweiligen Inkubationszeit geerntet. Wo angegeben, erfolgte zusätzlich eine Behandlung mit 3 µM GI

oder 3  $\mu\text{M}$  GW zeitgleich zur Stimulation. Parallel wurde jeweils ein Ansatz mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt und analog zur Stimulation inkubiert.

Die Analyse des IL-2R $\alpha$ -*Shedding* erfolgte nach der Zelllyse (s. Abschnitt 2.2.3.1) und TCA-Fällung (s. Abschnitt 2.2.3.3) via SDS-PAGE und Western Blot (s. Abschnitte 2.2.3.6 und 2.2.3.7) oder ELISA (s. Abschnitt 2.2.3.9).

#### **2.2.2.8. Analyse des Einflusses vom löslichen IL-2R $\alpha$ auf die IL-2-induzierte STAT5-Phosphorylierung in HDLM-2- und primären humanen CD3<sup>+</sup> T-Zellen**

Um den Einfluss einer Behandlung mit rekombinanten löslichem IL-2R $\alpha$  (sIL-2R $\alpha$ ) und IL-2 auf den IL-2-Signalweg zu untersuchen, wurden die HDLM-2-Zellen 3 mal mit PBS gewaschen und in serumfreiem RPMI-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden in einer Menge von  $1.5 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Volumen pro Vertiefung in 12well-Platten ausgesät und für 24 h gehungert, bevor sie für 30 min mit 10 ng/ml IL-2 und steigender Konzentration (0  $\mu\text{g/ml}$ , 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  und 10  $\mu\text{g/ml}$ ) sIL-2R $\alpha$  bei 37°C inkubiert wurden.

Um den Einfluss des löslichen IL-2R $\alpha$  auf den IL-2-Signalweg in primären CD3<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen, wurden diese zunächst wie im Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben aus humanem Blut isoliert und schließlich  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Medium pro Vertiefung in 12well-Platten ausgesät. Nach der Aktivierung (s. Abschnitt 2.2.2.6) wurden die Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und durch Zentrifugation bei 700 g für 7 min pelletiert. Das Medium wurde verworfen und die Pellets in den vorbereiteten Stimulationsansätzen resuspendiert. Die Ansätze wurden aus 1 ml serumfreiem RPMI-Medium mit 5 ng/ml IL-2 und steigenden Konzentrationen (0  $\mu\text{g/ml}$ , 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  und 10  $\mu\text{g/ml}$ ) sIL-2R $\alpha$  hergestellt und für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Die anschließende Stimulation der Zellen erfolgte für 30 min bei 37°C.

Die Ernte der Zellen (s. Abschnitt 2.2.3.1) erfolgte unmittelbar nach der jeweiligen Stimulation in 1,5 ml Reaktionsgefäße. Die Zellen wurden pelletiert und der Überstand verworfen, bevor sie lysiert (s. Abschnitt 2.2.3.1) und die Proteinmenge bestimmt (s. Abschnitt 2.2.3.2) wurde, um die Proteine mittels SDS-PAGE (s. Abschnitt 2.2.3.6) aufzutrennen und mithilfe von Western Blots (s. Abschnitt 2.2.3.7) für die spätere Proteindetektion auf Membranen zu transferieren.

### **2.2.3. Protein-biochemische Methoden**

#### **2.2.3.1. Zellernte und -lyse**

Für die Ernte der Zellen wurden die Zellsuspensionen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 1.200 g und 4 °C für 5 min pelletiert. Nachdem der Überstand abgenommen und für TCA-Fällung (Abschnitt 2.2.3.3) oder ELISA (Abschnitt 2.2.3.9) aufbewahrt wurde, konnte das Pellet in 60 µl Lysepuffer mit 1 % Protease-Inhibitor-Cocktail und in Abhängigkeit des Experiments mit 1 % Phosphatase-Inhibitor Cocktail resuspendiert werden. Die Suspension wurde für 45 min bei 4 °C inkubiert und anschließend bei 18.000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Für die Proben zur Analyse des IL-2-Signalweges erfolgte zunächst eine Proteinbestimmung (Abschnitt 2.2.3.2), bevor die benötigte Menge für 35 µg Proteinlysate mit Laemmlipuffer erhitzt wurden. Für die Proben zur Analyse des IL-2R $\alpha$ -*Shedding* wurden unmittelbar nach der Lyse 10 µl des Zelllysats mit gleichem Volumen Laemmlipuffer (2x) für 10 min bei 96 °C und 650 rpm erhitzt. Hierbei erfolgte keine vorherige Proteinbestimmung, da andernfalls das Verhältnis der Proteinmengen aus dem Zelllysate und dem gefälltem Überstand (s. Abschnitt 2.2.3.3) verfälscht werden würde.

#### **2.2.3.2. Proteinbestimmung**

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Zelllysate wurde der DC Protein Assay (Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA) verwendet. Hierfür wurden jeweils 5 µl der Lysate und der Standardlösungen in Doppelbestimmung in die Vertiefungen einer 96well-Mikrotestplatte aufgetragen und 25 µl des AS-Reagens (aus 1 ml Reagenz A und 20 µl Reagenz S) dazu pipettiert. Anschließend wurden jeweils 200 µl des Reagenz B dazugegeben und die Ansätze für 15 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Detektion erfolgte bei 595 nm mit dem CLARIOstar® Plus Plattenreader (BMG Labtech, Ortenberg, DEU). Für Proben zur Analyse des IL-2-Signalweges wurde die benötigte Menge an Lysat für 35 µg Gesamtprotein mit Laemmlipuffer für 10 min bei 96 °C erhitzt.

#### **2.2.3.3. TCA-Fällung**

Wenn nicht anders angegeben, erfolgten alle folgenden Zentrifugationsschritte für 20 min bei 18.000 g und 4 °C. Die geernteten und vom Zellpellet getrennten Überstände wurden zentrifugiert und in neue 2 ml Reaktionsgefäße überführt, bevor diese mit gleichem Volumen an 20 % TCA-Lösung versetzt wurden. Nach mehrmaligen Intervieren und einer 20-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt. Der Überstand

wurde entfernt und das Pellet mit 350  $\mu$ l eiskaltem Aceton gewaschen. Nach erneutem Invertieren und 20-minütigem Inkubieren auf Eis erfolgte erneut eine Zentrifugation der Proben. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurde das Pellet in 25  $\mu$ l Laemmlipuffer (2x) bei 96 °C und 650 rpm für 10 min erhitzt.

#### **2.2.3.4. Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die quantitative Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen auf Zellen. Für die Analyse der IL-2R $\alpha$ -Expression auf transfizierten HEK293-Zellen wurden die Zellen wie im Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben transfiziert und für 48 h unter Standardbedingungen inkubiert. Eine weitere Schale wurde zudem mit einem Leerplasmid transfiziert, um diese bei der Messung als Negativkontrolle zu verwenden. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS von der Schale gespült und durch Zentrifugieren pelletiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden für 7 min bei 700 g und 4 °C durchgeführt. Die Pellets wurde erneut in 1 ml PBS aufgenommen und resuspendiert, 300  $\mu$ l der Zellsuspensionen wurden für die FACS-Analyse in die Vertiefungen einer konischen 96well-Platte überführt. Die restlichen 700  $\mu$ l wurden für die Zellyse verwendet und mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die IL-2R $\alpha$ -Expression untersucht, um damit den Erfolg der Transfektion zu prüfen. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen, die Pellets in 50  $\mu$ l verdünntem Primärantikörper ( $\alpha$ Myc, 1:100 in FACS-Puffer) resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation wurden die Zellen mit 300  $\mu$ l FACS-Puffer gewaschen und erneut pelletiert, bevor sie in 50  $\mu$ l zuvor verdünntem Sekundärantikörper ( $\alpha$ -rabbit-AlexaFluor488, 1:100 in FACS-Puffer) resuspendiert und 1 h im Dunkeln auf Eis inkubiert wurden. Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugation pelletiert, 2x mit FACS-Puffer gewaschen und in 250  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen. Bis zur Messung mit dem LSR Flow Cytometry Analyzer (BD, Franklin Lakes, USA) erfolgte die Lagerung der Zellen auf Eis und unter Lichtausschluss.

Zur Analyse der IL-2R $\alpha$ -Expression auf der Oberfläche von Jurkat-Zellen wurden die Zellen zuvor aktiviert und mit Protease-Aktivatoren bzw. Inhibitoren behandelt (s. Abschnitt 2.2.2.6). Nach der 48-stündigen Inkubation unter Standardbedingungen erfolgte die Ernte der Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße und ein Zentrifugationsschritt zum Pelletieren der Zellen. Die Zellpellets wurden in 50  $\mu$ l des zuvor verdünnten Fluoreszenz-markiertem Antikörper ( $\alpha$ CD25-FITC bzw. Isotype-Ctrl-FITC, 1:100 in FACS-Puffer) aufgenommen, in die

Vertiefungen einer konischen 96well-Platte überführt und für 1 h im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte analog zu den HEK293-Zellen.

Für die Analyse der Expression des IL-2R $\alpha$  auf der Oberfläche von primären CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden die Zellen analog zu den Jurkat-Zellen zuvor für 48 h unter Standardbedingungen aktiviert und behandelt. Nach der Ernte in 1.5 ml Reaktionsgefäße wurden die Zellen pelletiert, in 50  $\mu$ l Blockierlösung aus 50  $\mu$ l FACS-Puffer mit 0,5  $\mu$ l Human TruStain FcX<sup>TM</sup> (BioLegend, San Diego, USA) und 0,5  $\mu$ l humanem Serum aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt und dem Verwerfen der Blockierlösung erfolgte die weitere Durchführung analog zu den Jurkat-Zellen.

Die Auswertung der ermittelten Daten wurde mithilfe des Programms FlowJo\_v10.7.1 durchgeführt.

#### **2.2.3.5. Deglykosylierung**

Früheren Berichten zufolge (Miedel et al., 1988) hat der IL-2R $\alpha$  sechs Glykosylierungsstellen, an denen kovalent Glykane an Asparagin (N-Glykane) oder Serin- bzw. Threoninketten (O-Glykane) gebunden sind. Es soll untersucht werden, ob die vorhergesagten Bindungsstellen besetzt sind und die vorhandenen Glykane einen Einfluss auf das IL-2R $\alpha$ -Ektodomänen-*Shedding* haben. Hierfür wurden HEK293-Zellen wie im Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben transient mit IL-2R $\alpha$  transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion für 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert (s. Abschnitt 2.2.3.1) und eine Proteinbestimmung (s. Abschnitt 2.2.3.2) durchgeführt. Um vorhandene N- bzw. O-Glykane am IL-2R $\alpha$  zu entfernen, wurde PNGase F zur Abspaltung der N-Glykane und O-Glycosidase bzw. Neuraminidase zur Abspaltung der O-Glykane verwendet. Alle verwendeten Reagenzien für die Deglykosylierung wurden von New England BioLabs (Ipswich, USA) bezogen. Für jede zu untersuchende Probe wurden vier Ansätze vorbereitet, die jeweils 30  $\mu$ g des zu analysierenden Zelllysats und 2  $\mu$ l Glyco denaturing buffer (10x) enthielten. Die Proben wurden mit dH<sub>2</sub>O auf 20  $\mu$ l aufgefüllt und für 10 min bei 100 °C aufgeköcht. Die denaturierten Proben wurden wie in Tab. 26 aufgeführt jeweils mit 1  $\mu$ l PNGase F und/oder 2  $\mu$ l O-Glycosidase und 2  $\mu$ l Neuraminidase versetzt, mit jeweils 4  $\mu$ l GlycoBuffer 2 und NP-40 vermischt und mit dH<sub>2</sub>O auf 40  $\mu$ l aufgefüllt. Nach der Inkubation der Proben über Nacht bei 37 °C wurden die Ansätze mit 10  $\mu$ l Laemmli-puffer (5x) für 10 min bei 96 °C und 650 rpm erhitzt und jeweils 25  $\mu$ l aufs SDS-Gel geladen.

Tab. 26: Ansätze für die Deglykosylierung.

	unbehandelt	Entfernung der N-Glykane	Entfernung der O-Glykane	Entfernung der N- & O-Glykane
Protein	30 µg	30 µg	30 µg	30 µg
Glyco denaturing buffer (10x)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 20 µl	ad 20 µl	ad 20 µl	ad 20 µl
10 min bei 100 °C aufkochen				
GlycoBuffer 2 (10x)	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
NP-40	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
PNGase F	-	1 µl	-	1 µl
O-Glycosidase	-	-	2 µl	2 µl
Neuraminidase	-	-	2 µl	2 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 40 µl	ad 40 µl	ad 40 µl	ad 40 µl
über Nacht bei 37 °C inkubieren				

### 2.2.3.6. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, kurz SDS-PAGE, ist ein elektrophoretisches Verfahren, um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Die Proben wurden hierfür mit Laemmlipuffer aufgeköcht, der zur Reduktion von Disulfidbrücken  $\beta$ -Mercaptoethanol enthält. Das enthaltene SDS bildet mit den Proteinen negativ geladene Komplexe, so dass diese ihrer Größe nach aufgetrennt werden können. Für die SDS-PAGE wurden selbst gegossene 10%ige Polyacrylamidgele aus Trenngel und Sammelgel mit eingesetztem Taschenkamm in einer Dicke von 1,5 mm verwendet und nach dem Schema in Tab. 27 hergestellt.

Tab. 27: Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE.

	Trenngel (10 %)	Sammelgel (4 %)
dH <sub>2</sub> O	4,67 ml	3,167 ml
Acrylamidlösung	3,33 ml	825 µl
Trenngelpuffer (pH 8.8)	2 ml	-
Sammelgelpuffer (pH 6.8)	-	1 ml
10 % APS	75 µl	37,5 µl
TEMED	8 µl	4 µl



Die fertigen Gele wurde in eine Elektrophorese-Kammer Mini-PROTEAN® Tetra electrophoresis system (Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA) überführt und die Kammer mit Laufpuffer befüllt. Die mit Laemmlipuffer versetzten Proben sowie 5 µl des *Page ruler prestained* Markers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) als Größenmarker wurden in die Geltaschen pipettiert und bei konstanten 130 V voneinander getrennt.

### **2.2.3.7. Western Blot**

Die mittels SDS-PAGE getrennten Proteine wurden im Anschluss mithilfe vom *Tank transfer* aus dem Mini Trans-Blot® Cell System (Bio-Rad, Hercules, USA) auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)- oder Nitrocellulose-Membranen transferiert. Für den Transfer wurden nach Herstellerempfehlung fünf in Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere, das Trenngel, die Membran und erneut fünf Whatman-Papiere aufeinandergelegt und in die Kassetten eingespannt. Die PVDF-Membran wurde zuvor für mehrere Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend kurz in Transferpuffer inkubiert. Die Nitrocellulose-Membran wurde für kurze Zeit in Transferpuffer befeuchtet. Nachdem die Kassetten sowie ein Kühlakku in das Mini Trans-Blot® Cell System gesetzt und das System mit Transferpuffer aufgefüllt wurde, erfolgte der elektrophoretische Transfer für 2 h bei konstanter Spannung von 100 V. Nach Ablauf des Transfers wurden die Membranen in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und für kurze Zeit in TBST gerollt. Die anschließende Blockierung der PVDF-Membran erfolgte in 5 % Milchpulver in TBST für 1 h bei Raumtemperatur, die Nitrocellulose-Membran wurde unter denselben Bedingungen mit 5 % BSA in TBST blockiert. Die Membranen wurden anschließend 3x für 5 min mit TBST gewaschen und schließlich über Nacht bei 4 °C in Primärantikörpern (1:1.000 in 5 % BSA/TBST) gerollt. Nach 3-maligem Waschen der Membranen für 5 min in TBST erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern für 1 h bei Raumtemperatur. Bei der PVDF-Membran wurden ausschließlich HRP-verlinkte Antikörper (1:3.000 in 5 % Milchpulver in TBST) verwendet, die Nitrocellulose-Membran wurde abgedunkelt mit den IRDye Fluoreszenz-Antikörpern (1:10.000 in 5 % BSA/TBST) inkubiert. Nach Inkubation der PVDF-Membranen erfolgten drei Waschschrte mit TBST für jeweils 5 min, bevor die Membran für 2 min in das ECL-Substrat (Immobilon Western HRP Substrat von Millipore by Merck, Darmstadt, DEU) gelegt und die Proteine anschließend mithilfe des WB ChemiDoc™ MP Imaging Systems (Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA) oder FluorChem E Systems Cell (Biosciences, Santa Clara, USA) detektiert wurde. Die Nitrocellulose-Membran wurde vor der Fluoreszenz-Detektion mittels

des WB ChemiDoc™ MP Imaging Systems (Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA) 1x mit TBST und 3x mit TBS gewaschen.

#### **2.2.3.8. Stripping der Western Blot-Membranen**

Um nacheinander Proteine gleicher Größe auf derselben Membran detektieren zu können, wurden vorhandene Antikörper auf der Membran mittels *Stripping* entfernt. Dafür wurden die Membranen zunächst für 5 min in TBST gewaschen und anschließend für 20 min in 5 ml des Restore™ Western Blot *Stripping Buffer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei Raumtemperatur gerollt. Um den *Stripping Buffer* vollständig zu entfernen, erfolgten drei Waschschriffe mit TBST für jeweils 5 min. Die Membranen wurden erneut blockiert, bevor sie über Nacht mit entsprechenden Primärantikörpern inkubiert wurden. Das weitere Vorgehen bis zur Detektion erfolgte analog zu Abschnitt 2.2.3.7.

#### **2.2.3.9. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Um die Menge an IL-2R $\alpha$  im Zelllysat oder sIL-2R $\alpha$  im Zellkulturüberstand zu bestimmen, wurde das Human CD25/IL-2R alpha Duo Set ELISA von R&D Systems (Minneapolis, USA) verwendet und nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden die Vertiefungen einer 96well-Platte am Tag zuvor mit 50  $\mu$ l des nach Protokoll des Herstellers angesetzten Fängerantikörpers (2  $\mu$ g/ml) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser wurde am nächsten Tag durch zweimaliges Waschen mit 300  $\mu$ l PBST entfernt und offene Bindungsstellen in den Vertiefungen mit 1 % BSA in PBS für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Nach zwei erneuten Waschschriffen mit PBST wurden jeweils 50  $\mu$ l der Proben sowie der nach Herstellerprotokoll angesetzte Standard (0-2.000 pg/ml) in Doppelstimmung aufgetragen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die zu untersuchenden Proben wurden zuvor nach Bedarf in 1 % BSA/PBS verdünnt, um das Detektionslimit des ELISA nicht zu überschreiten. Nach anschließendem zweimaligen Waschen mit PBST wurden pro Vertiefung 50  $\mu$ l des Detektionsantikörpers (100 ng/ml) hinzugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Um nicht gebundenen Antikörper schließlich zu entfernen, erfolgten zwei Waschschriffe mit PBST, bevor die Vertiefungen mit jeweils 60  $\mu$ l der Streptavidin-Lösung bedeckt wurden. Nach 20-minütiger Inkubation unter Lichtausschluss wurden die Vertiefungen 2x mit PBST gewaschen und anschließend mit jeweils 60  $\mu$ l BM Blue POD Substrat (Roche, Basel, CHE) inkubiert. Die Reaktion wurde nach maximal 20 min Inkubation mit 60  $\mu$ l 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Detektion der Signale erfolgte bei

450 nm mithilfe des CLARIOstar® Plus Plattenreaders (BMG Labtech, Ortenberg, DEU) und die Auswertung der Dateien mittels Microsoft Excel (Microsoft Office Home and Student 2016).

Die quantitative Analyse des sIL-2R $\alpha$  aus den Seren von ADAM17<sup>ex/ex-</sup>, CD4-ADAM10<sup>-/-</sup>, CD4-ADAM17<sup>-/-</sup> und CD4-ADAM10<sup>-/-</sup>/ADAM17<sup>-/-</sup> sowie TIMP3<sup>-/-</sup>-Mäusen und der jeweiligen Wildtyp- bzw. Kontrolltiere wurde von Dr. Juliane Lokau (AG Garbers, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Magdeburg) mithilfe des Mouse CD25/IL-2R alpha DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Detektion und Auswertung erfolgten analog zu dem Human CD25/IL-2R alpha Duo Set ELISA.

#### **2.2.4. Statistische Analysen**

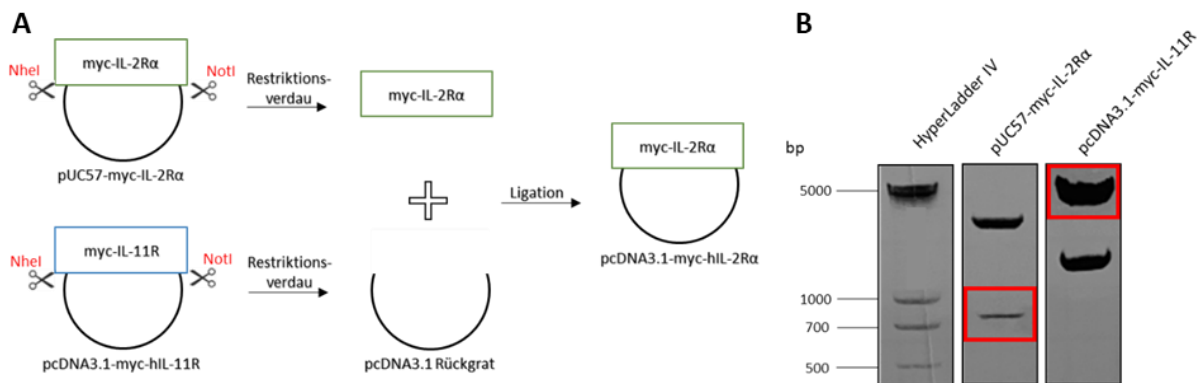
Die in den Diagrammen angegebenen Werte entsprechen, wenn nicht anders angegeben, dem Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, USA). Eine einfaktoriellen Varianzanalyse (auch einfaktorielle ANOVA) mit Dunnett-Test wurde verwendet, um drei oder mehr Datensets zu vergleichen. Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Sets von Zellen wurden mithilfe eines ungepaarten t-Tests mit Welch-Korrektur berechnet. Serumkonzentrationen zweier Mausgruppen wurden mittels Mann-Whitney-Test verglichen. Die Analyse normalisierter Daten mit mehr als zwei Gruppen erfolgte mithilfe eines Einstichproben-t-Tests und Bonferroni-Korrektur. Eine statistische Signifikanz wurde festgestellt, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 ist, was in den Diagrammen mit einem Stern (\*) gekennzeichnet wurde.

### 3. Ergebnisse

Ein Teil der nachfolgend aufgeführten Ergebnisse wurden bereits im *Journal of Biological Chemistry* unter dem Titel „The metalloprotease ADAM10 generates soluble interleukin-2 receptor alpha (sIL-2R $\alpha$ /sCD25) *in vivo*“ (Kirschke et al., 2022) veröffentlicht. Wenn in der vorliegenden Arbeit Experimente durch andere Personen außer mir durchgeführt wurden, ist dies unter den jeweiligen Inhalten vermerkt.

#### 3.1. Generierung des Expressionsplasmids für den IL-2R $\alpha$

Um eine effektive Überexpression des IL-2R $\alpha$  in HEK293-Zellen zu ermöglichen, wurde zunächst die für den IL-2R $\alpha$  kodierende Sequenz myc-IL-2R $\alpha$  aus dem pUC57-Plasmidvektor (Genscript Biotech, Piscataway Township, USA) in den pcDNA3.1-Expressionsvektor eingebracht. Hierfür wurden die eingesetzten Plasmide wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben mit den Restriktionsendonukleasen NheI und NotI gespalten, um das IL-2R $\alpha$ -Insert mit myc-tag aus dem pUC57-Plasmid und das pcDNA3.1-Rückgrat mit komplementären Überhängen zu erhalten (Abb. 8A). Die Produkte wurden anschließend mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese (s. Abschnitt 2.2.1.4) aufgetrennt und das Insertfragment von etwa 880 bp sowie das Vektorfragment von ca. 5350 bp (Abb. 8B) extrahiert und aufgereinigt (s. Abschnitt 2.2.1.5).



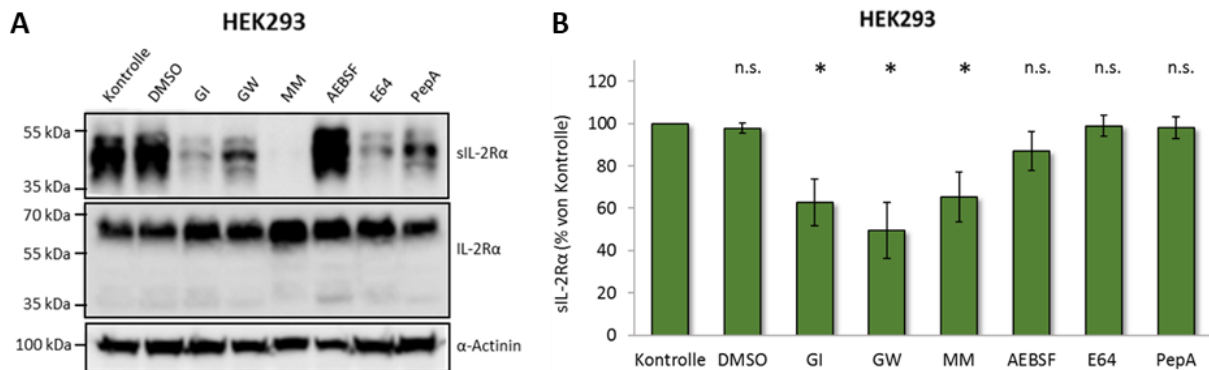
**Abb. 8:** **Generierung des Expressionsplasmids für den IL-2R $\alpha$ .** **A:** Schematische Darstellung der Schritte zur Generierung des Expressionsplasmids pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$  aus dem Vektorplasmid pUC57-myc-IL-2R $\alpha$ . Die eingesetzten Plasmide wurden mithilfe von NheI und NotI (in rot dargestellt) gespalten und das extrahierte myc-IL-2R $\alpha$ -Insertfragment mit dem dephosphorylierten pcDNA3.1-Vektor-Rückgrat ligiert, um das pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ -Plasmid zu erhalten. **B:** Ausschnitte des Agarosegels mit den Fragmenten von Insert und Vektor. Das rot markierte Fragment aus pUC57-myc-IL-2R $\alpha$  (ca. 880 bp) wurde nach der Aufreinigung als Insert verwendet, das rot markierte Fragment aus der pcDNA2.1-myc-IL-11R (ca. 5350 bp) diente als Vektor. Als Marker wurde der HyperLadder IV (Biolone, Cincinnati, USA) verwendet.

Das Insert wurde anschließend mittels DNA-Ligation (s. Abschnitt 2.2.1.7) in das dephosphorylierte pcDNA3.1-Rückgrat (s. Abschnitt 2.2.1.3) eingebaut, um so das pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ -Plasmid zu erhalten (Abb. 8A).

### 3.2. IL-2R $\alpha$ wird konstitutiv durch ADAM-Proteasen geschnitten

Es ist bekannt, dass eine Vielzahl an Zytokin-Rezeptoren proteolytisch gespalten werden und damit lösliche Formen der Rezeptoren existieren (Rubin et al., 1990; Mülberg et al., 1993; Orlando et al., 1997; Uchikawa et al., 2015; Lokau et al., 2016; Kefaloyianni, 2022). Auch für den IL-2R $\alpha$  gibt es Berichte über eine lösliche Form des Rezeptors (Rubin et al., 1985; Gallo et al., 1991; De Rie et al., 1996), die Art seiner Entstehung ist aber weitestgehend unbekannt. Ziel dieser Arbeit war unter anderem herauszufinden, ob und wodurch der IL-2R $\alpha$  proteolytisch gespalten wird, so dass zunächst das konstitutive *Shedding* analysiert und die Proteasen, die den IL-2R $\alpha$  schneiden, identifiziert werden sollten. Hierfür wurden HEK293-Zellen transient mit dem IL-2R $\alpha$ -Expressionsplasmid transfiziert und mit verschiedenen Protease-Inhibitoren behandelt. Verwendet wurden hierbei AEBSF zur Hemmung von Serinproteasen, E64 zur Blockierung von Cysteinproteasen und Pepstatin A als Inhibitor für Aspartatproteasen. Da bekannt ist, dass bei anderen Zytokin-Rezeptoren vor allem Metalloproteasen aus der Familie der ADAM-Proteasen schneiden (Mortier et al., 2004; Chalaris et al., 2011; Lambrecht et al., 2018; Sammel et al., 2019), wurden zudem Marimastat als Breitband-Hemmer für Metalloproteasen sowie die spezifischeren Inhibitoren GI zur Blockierung von ADAM10 und GW als ADAM10/ADAM17-Inhibitor verwendet. Die Zellen wurden nach 24 Stunden Inkubation und Behandlung mit den Protease-Inhibitoren geerntet und das konstitutive *Shedding* mittels Western Blot und ELISA analysiert (Abb. 9). Erkennbar ist hierbei die gleichmäßige Expression des IL-2R $\alpha$  im Zelllysate (Abb. 9A) sowie die in Abhängigkeit der verwendeten Inhibitoren ausgeprägten Mengen an löslichem Rezeptor im Überstand. Zellen, die mit den ADAM-spezifischen Inhibitoren GI und GW sowie dem Breitband-Inhibitor für Metalloproteasen behandelt wurden, zeigen verringerte Mengen an löslichem Rezeptor im Überstand. Diese Ergebnisse decken sich mit der ELISA-Messung, die eine signifikante Abnahme des IL-2R $\alpha$ -*Shedding* verdeutlichen (Abb. 9B). Auch die Inhibierung von Cysteinproteasen durch E64 und Aspartatproteasen durch Pepstatin A scheinen anhand des Western Blots in Abb. 9A ein reduziertes *Shedding* hervorzurufen, was jedoch anhand der quantitativen Analyse (Abb. 9B) nicht bestätigt

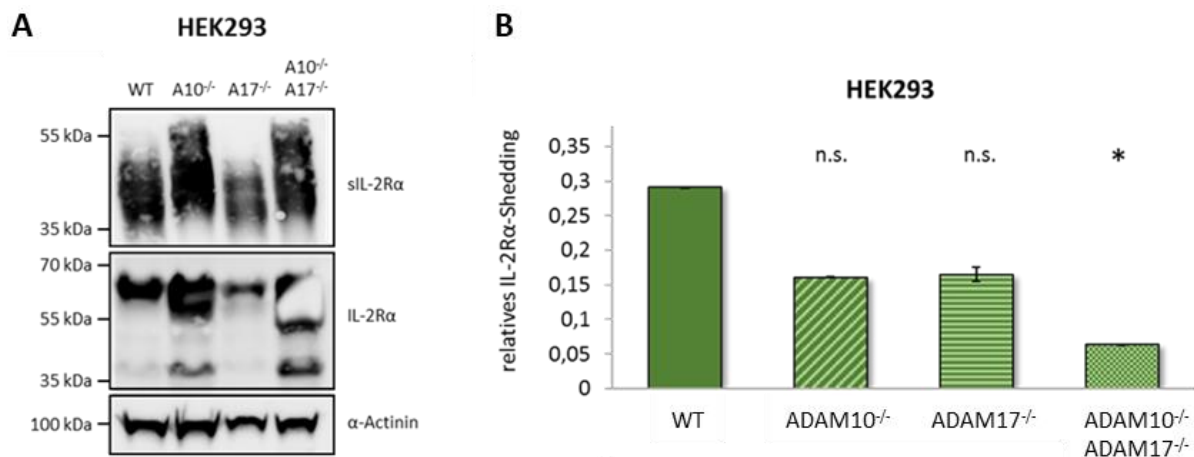
werden kann. Die Behandlung mit AEBFS zeigt hingegen weder im Western Blot noch im ELISA einen erkennbaren Einfluss auf das IL-2R $\alpha$ -*Shedding*. Anhand dieser Ergebnisse können somit ADAM10 und ADAM17 als hauptverantwortliche Proteasen zur konstitutiven Generierung des sIL-2R $\alpha$  identifiziert werden.



**Abb. 9:** Konstitutives IL-2R $\alpha$ -*Shedding* in HEK293-Zellen wird durch ADAM-Proteasen reguliert. Transient transfizierte HEK293-Zellen wurden mit 3  $\mu$ M GI254023X (GI), 3  $\mu$ M GW280264X (GW), 10  $\mu$ M Marimastat (MM), 1 mM AEBFS, 10  $\mu$ M E64, 1  $\mu$ M Pepstatin A (PepA) oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und das konstitutive IL-2R $\alpha$ -*Shedding* mittels Western Blot (A) und ELISA (B) analysiert. **A:** Western Blot-Analyse des konstitutiven IL-2R $\alpha$ -*Shedding* unter der Behandlung mit Protease-Inhibitoren. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert und der lösliche Rezeptor mithilfe der TCA-Fällung präzipitiert. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und per Western Blot analysiert. Das  $\alpha$ -Actinin wurde als Ladekontrolle detektiert. Dargestellt ist eines von vier unabhängigen Experimenten. **B:** ELISA zur Quantifizierung des sIL-2R $\alpha$  in den Zellkulturüberständen. Die Abbildung zeigt die prozentualen Mengen des sIL-2R $\alpha$  aus den Zellkulturüberständen normiert auf die Kontrolle. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Statistische Unterschiede zwischen behandelten Zellen und der Kontrolle sind mit einem \* gekennzeichnet (\*: p < 0,05), ausbleibende Signifikanzen sind mit „nicht signifikant“ (n.s.) gekennzeichnet.

Zur weiteren Analyse der ADAM-Proteasen als primäre Katalysatoren des konstitutiven IL-2R $\alpha$ -*Shedding* wurden HEK293-Zellen verwendet, die eine Defizienz für ADAM10 (A10 $^{-/-}$ ), ADAM17 (A17 $^{-/-}$ ) oder beide Proteasen (A10 $^{-/-}$ /A17 $^{-/-}$ ) (Riethmüller et al., 2016) aufweisen. Diese wurden analog zu HEK293 WT-Zellen transient mit dem IL-2R $\alpha$ -Expressionsplasmid transfiziert und das konstitutive *Shedding* der verschiedenen Zelllinien analysiert und verglichen (Abb. 10). Die Western Blot-Analyse zeigt die Mengen des Rezeptors im Lysat sowie die Mengen an löslichem Rezeptor im Überstand (Abb. 10A). Erkennbar ist hierbei, dass sowohl der IL-2R $\alpha$  im Lysat als auch der sIL-2R $\alpha$  im Überstand in A10 $^{-/-}$ - und A10 $^{-/-}$ /A17 $^{-/-}$ -Zellen stärker exprimiert sind als bei den WT-Zellen. Die Expression des Rezeptors in A17 $^{-/-}$ -Zellen scheint hingegen im Vergleich zu den WT-Zellen schwächer zu sein. Um hierbei jedoch genaue Unterschiede im *Shedding* unabhängig von der

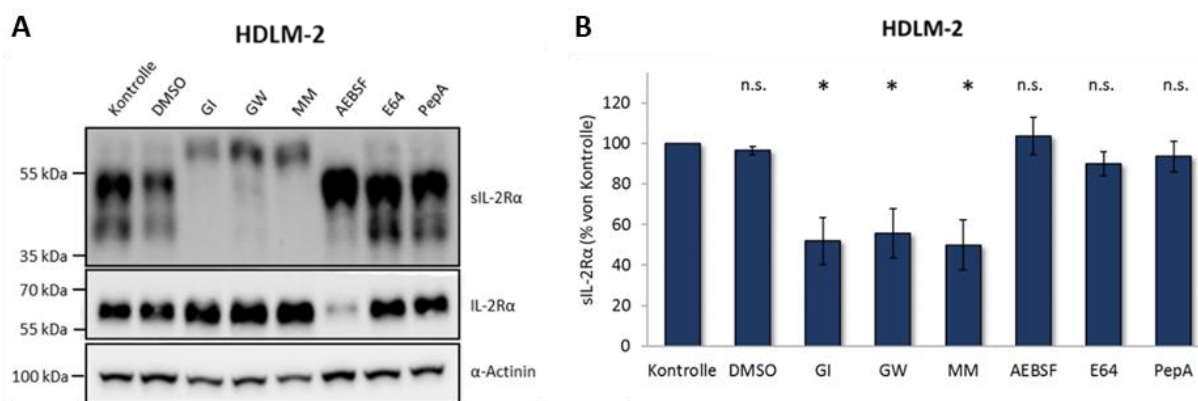
Expressionseffizienz zu erkennen, zeigt Abb. 10B die relative IL-2R $\alpha$ -*Shedding*-Rate, die Aufschluss über die tatsächliche Menge des sIL-2R $\alpha$  im Überstand im Verhältnis zur exprimierten Rezeptor-Menge im Lysat gibt. Erkennbar ist hierbei, dass Zellen mit ADAM10- oder ADAM17-Defizienz eine verringerte IL-2R $\alpha$ -*Shedding*-Rate aufweisen, sich diese jedoch nicht signifikant vom WT unterscheidet (Abb. 10B). Im Gegensatz dazu ist das IL-2R $\alpha$ -*Shedding* bei den doppelt-defizienten Zellen signifikant reduziert, so dass hierbei auf eine Beteiligung beider Proteasen beim konstitutiven *Shedding* geschlossen werden kann. Die vorhandene Menge an sIL-2R $\alpha$  im Überstand der A10 $^{-/-}$ /A17 $^{-/-}$ -Zellen nach den 24 Stunden weist jedoch darauf hin, dass ADAM10 und ADAM17 zwar die Haupt-Mediatoren der konstitutiven sIL-2R $\alpha$ -Produktion sind, es aber dennoch andere Mechanismen geben muss, die am IL-2R $\alpha$ -*Shedding* beteiligt sind.



**Abb. 10:** Defizienz von ADAM10 und ADAM17 in HEK293-Zellen führt zu reduziertem IL-2R $\alpha$ -*Shedding*. Transient transfizierte HEK293 WT-, ADAM10 $^{-/-}$ -, ADAM17 $^{-/-}$ - und ADAM10 $^{-/-}$ /ADAM17 $^{-/-}$ -Zellen wurden für 24 Stunden mit serumfreiem Medium versetzt. Die Analyse des konstitutiven *Shedding* erfolgte mittels Western Blot (A) und ELISA (B). **A:** Western Blot-Analyse des konstitutiven IL-2R $\alpha$ -*Shedding* von HEK293 WT-, A10 $^{-/-}$ -, A17 $^{-/-}$ - und A10 $^{-/-}$ /A17 $^{-/-}$ -Zellen. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert und der lösliche Rezeptor mithilfe der TCA-Fällung präzipitiert. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und per Western Blot analysiert. Das  $\alpha$ -Actinin wurde als Ladekontrolle detektiert. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten. **B:** ELISA zur Quantifizierung des konstitutiven IL-2R $\alpha$ -*Shedding*. Die Abbildung zeigt die relative *Shedding*-Rate des IL-2R $\alpha$ , die sich aus der Division des sIL-2R $\alpha$  aus dem Überstand als Dividend und des IL-2R $\alpha$  aus dem Lysat als Divisor berechnet. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen den KO-Zelllinien und dem WT sind mit einem \* gekennzeichnet, ausbleibende Signifikanzen sind mit „n.s.“ dargestellt.

Durch die transiente Transfektion mit dem IL-2R $\alpha$ -Expressionsplasmid weisen die HEK293-Zellen eine Überexpression des IL-2R $\alpha$  auf. Es ist daher möglich, dass sich Teile der beschriebenen Ergebnisse nur in der Überexpression beobachten lassen. Daher wurde im nächsten Schritt die humane Hodgkin Lymphom-Zelllinie HDLM-2 verwendet, die den IL-2R $\alpha$

endogen exprimiert (Gruss et al., 1992). Die Zellen wurden analog zu den HEK293-Zellen mit den verschiedenen Protease-Inhibitoren behandelt und mittels Western Blot und ELISA auf das konstitutive IL-2R $\alpha$ -*Shedding* untersucht (Abb. 11). Die Western Blot-Analyse in Abb. 11A zeigt, dass die Banden des sIL-2R $\alpha$  bei etwa 50 kDa nahezu vollständig abgeschwächt sind, wenn die Zellen mit GI, GW oder MM behandelt wurden. Interessanterweise zeigen sich stattdessen Banden bei etwa 60 kDa, die auf *full-length* Isoformen des IL-2R $\alpha$  in Mikrovesikeln hindeuten können, wie es beispielsweise für den IL-6R beschrieben werden konnte (Schumacher et al., 2015). Die Behandlung mit AEBSF, E64 oder Pepstatin A zeigen hingegen keinen Einfluss auf die Menge an sIL-2R $\alpha$  und lassen darauf schließen, dass diese Proteasen weder in den HEK293-Zellen noch in den HDLM-2-Zellen im IL-2R $\alpha$ -*Shedding* involviert sind. Die quantitative Analyse des sIL-2R $\alpha$  im Überstand (Abb. 11B) bestätigt diese Ergebnisse und lässt zudem erkennen, dass die Menge an löslichem Rezeptor unter der Behandlung von GI als ADAM10-spezifischer Inhibitor und MM als Breitband-Inhibitor für Metalloproteasen gleich stark ist. Da dies auch bei den HEK293-Zellen zu erkennen war (Abb. 9B), kann auf eine maßgebliche Funktion von ADAM10 als hauptverantwortliche Protease im konstitutiven IL-2R $\alpha$ -*Shedding* geschlossen werden.

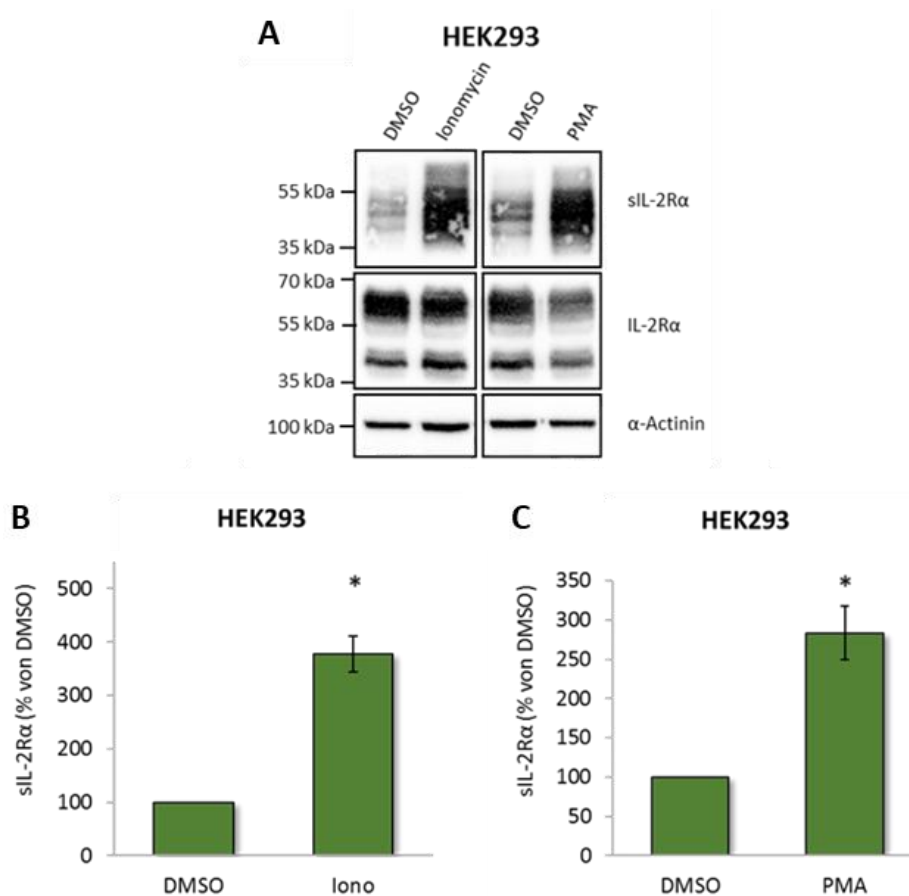


**Abb. 11:** IL-2R $\alpha$  wird in HDLM-2-Zellen konstitutiv von ADAM-Proteasen geschnitten. HDLM-2-Zellen wurden für 24 h mit Protease-Inhibitoren (3  $\mu$ M GI, 3  $\mu$ M GW, 10  $\mu$ M MM, 1 mM AEBSF, 10  $\mu$ M E64, 1  $\mu$ M PepA) bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. **A:** Western Blot-Analyse des konstitutiven IL-2R $\alpha$ -*Shedding* unter Protease-Inhibitoren. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert und der lösliche Rezeptor im Überstand mithilfe der TCA-Fällung präzipitiert. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und per Western Blot analysiert. Das  $\alpha$ -Actinin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten. **B:** ELISA zur Quantifizierung des sIL-2R $\alpha$  unter Einfluss von Protease-Inhibitoren. Das Diagramm zeigt die prozentualen Mengen des sIL-2R $\alpha$  normiert auf die Kontrolle. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus vier unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen behandelten Zellen und der Kontrolle sind mit einem \* gekennzeichnet (\*:  $p < 0,05$ ), ausbleibende Signifikanzen sind durch „n.s.“ gekennzeichnet.



### 3.3. Stimulation von ADAM10 und ADAM17 steigert das IL-2R $\alpha$ -Shedding

Proteasen sind nicht nur konstitutiv aktiv, sondern werden z.B. bei Entzündungen auch direkt aktiviert, was zu einer verstärkten Proteolyse von Substraten bei vielen pathophysiologischen Zuständen führt. Nachdem ADAM17 und vor allem ADAM10 als hauptverantwortliche Proteasen im konstitutiven IL-2R $\alpha$ -Shedding identifiziert werden konnten, sollte eine Stimulation der beiden Proteasen Aufschluss darüber geben, ob die sIL-2R $\alpha$ -Produktion durch deren Aktivierung gesteigert werden kann.



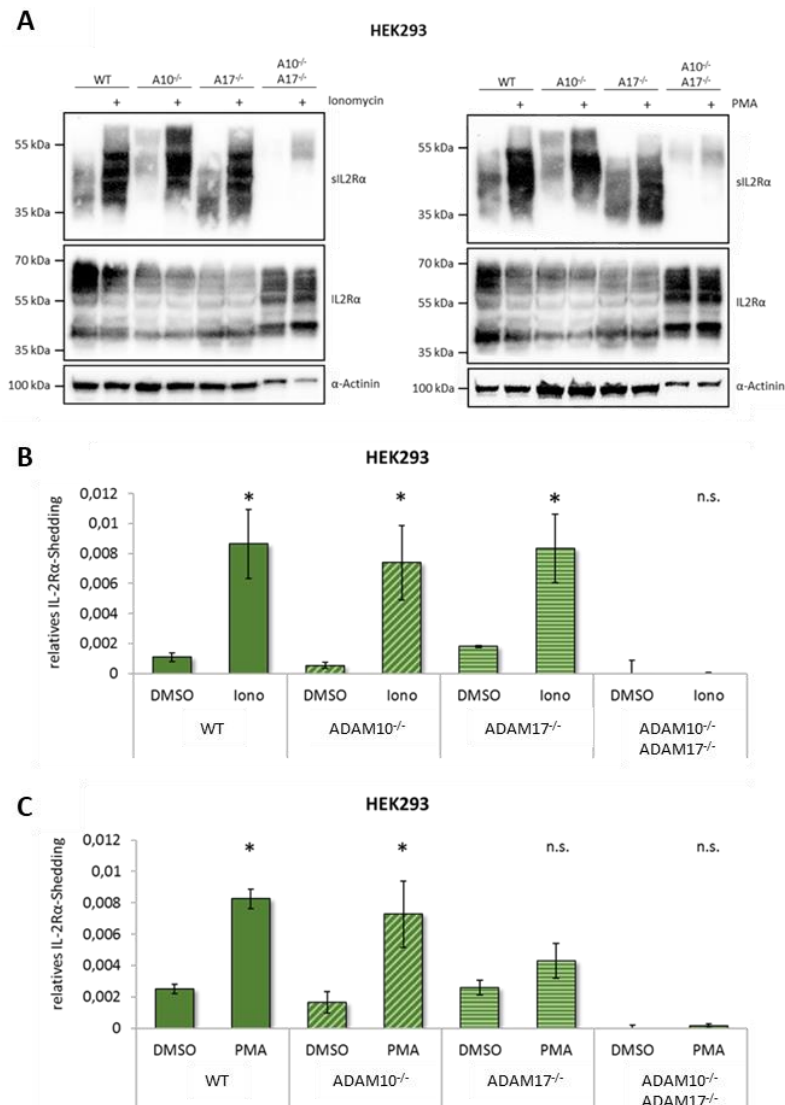
**Abb. 12:** Stimulation von ADAM10 und ADAM17 steigert das IL-2R $\alpha$ -Shedding in HEK293-Zellen. Transient transfizierte HEK293-Zellen wurden für 1 h mit 1  $\mu$ M Ionomycin (Iono) zur ADAM10-Aktivierung oder für 2 Stunden mit 100 nM PMA zur ADAM17-Aktivierung bzw. mit DMSO als jeweilige Kontrolle behandelt. Die Analyse des stimulierten Shedding erfolgte mittels Western Blot (A) und ELISA (B, C). **A:** Western Blot-Analyse des stimulierten IL-2R $\alpha$ -Shedding von HEK293-Zellen unter Ionomycin- und PMA-Behandlung. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert und der lösliche Rezeptor im Überstand mithilfe der TCA-Fällung präzipitiert. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und per Western Blot analysiert. Das  $\alpha$ -Actinin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten. **B & C:** ELISA zur Quantifizierung des IL-2R $\alpha$ -Shedding unter der Behandlung von Ionomycin (B) oder PMA (C). Die Diagramme zeigen die prozentualen Mengen des sIL-2R $\alpha$  normiert auf die DMSO-Kontrollen. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus jeweils drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen behandelten Zellen und der DMSO-Kontrolle sind mit einem \* gekennzeichnet (\*:  $p < 0,05$ ).

Dazu wurden HEK293-Zellen mit dem IL-2R $\alpha$ -Expressionsplasmid transient transfiziert und die Zellen für 1 h mit Ionomycin als etabliertem ADAM10-Aktivator (Hundhausen et al., 2007) oder für 2 h mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) als Aktivator der Protein Kinase C und nachfolgend ADAM17 (Folgosa et al., 2013) behandelt. Das stimulierte Shedding wurde schließlich mittels Western Blot und ELISA analysiert (Abb. 12). Anhand der Western Blot-Analyse in Abb. 12A ist deutlich erkennbar, dass sowohl die Behandlung mit Ionomycin (linke Seite) als auch mit PMA (rechte Seite) zu einer deutlich erhöhten Menge an löslichem Rezeptor führt. Auch der ELISA zu quantitativen Analyse des löslichen Rezeptors im Überstands zeigt deutlich, dass eine Aktivierung von ADAM10 durch Ionomycin die Produktion an sIL-2R $\alpha$  etwa vervierfacht (Abb. 12B) und die Aktivierung von ADAM17 mittels PMA die Menge an löslichem Rezeptor im Überstand im Vergleich zur Kontrolle fast verdreifacht wird (Abb. 12B).

Zur weiteren Analyse der bisherigen Ergebnisse wurden die verschiedenen HEK293-Zelllinien mit ADAM10- und ADAM17-Defizienz transient mit IL-2R $\alpha$  transfiziert und für 1 h mit Ionomycin oder für 2 Stunden mit PMA behandelt. Das stimulierte *Shedding* der ADAM-defizienten Zelllinien wurde mithilfe von Western Blot-Analyse und ELISA untersucht (Abb. 13). Die zuvor bereits untersuchte Stimulation von WT-Zellen mit Ionomycin und der damit verbundene Anstieg an sIL-2R $\alpha$  ist in den Abb. 13A (linke Seite) und Abb. 13B erneut erkennbar. Interessanterweise führt die Ionomycin-Stimulation in A10<sup>-/-</sup>-Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu einer signifikant erhöhten Menge an sIL-2R $\alpha$ , diese ist jedoch ähnlich hoch wie in A17<sup>-/-</sup>- und auch WT-Zellen (Abb. 13B), so dass hierbei ein durch ADAM17 katalysiertes IL-2R $\alpha$ -*Shedding* möglich ist. In Zellen, die weder ADAM10 noch ADAM17 aufweisen, bleibt ein IL-2R $\alpha$ -*Shedding* vollständig aus (Abb. 13A, linke Seite und Abb. 13B). Anhand der Ergebnisse kann somit von einer kompensatorischen Funktion von ADAM17 in Abwesenheit von ADAM10 ausgegangen werden, von der bereits Garbers et al. (2011) sowie Amour et al. (1998) und Amour et al. (2000) für andere Substrate berichteten.

Die PMA-Stimulation zur Aktivierung von ADAM17 führte sowohl in WT-Zellen als auch in A10<sup>-/-</sup>-Zellen zu einer signifikant erhöhten Menge an sIL-2R $\alpha$  (Abb. 13A, rechte Seite und Abb. 13C). In A17<sup>-/-</sup>-Zellen konnte hingegen kein signifikanter Anstieg im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Hier ist somit zwar ein kompensatorischer Effekt durch ADAM10 in Abwesenheit von ADAM17 erkennbar, jedoch scheint dieser Effekt nicht in

gleicher Intensität stattzufinden, wie die kompensatorische Funktion von ADAM17 in ADAM10-Abwesenheit. Das IL-2R $\alpha$ -*Shedding* in Zellen mit einer doppelten ADAM10/17-Defizienz bleibt auch bei einer Stimulation mit PMA vollständig aus (Abb. 13A und Abb. 13C).



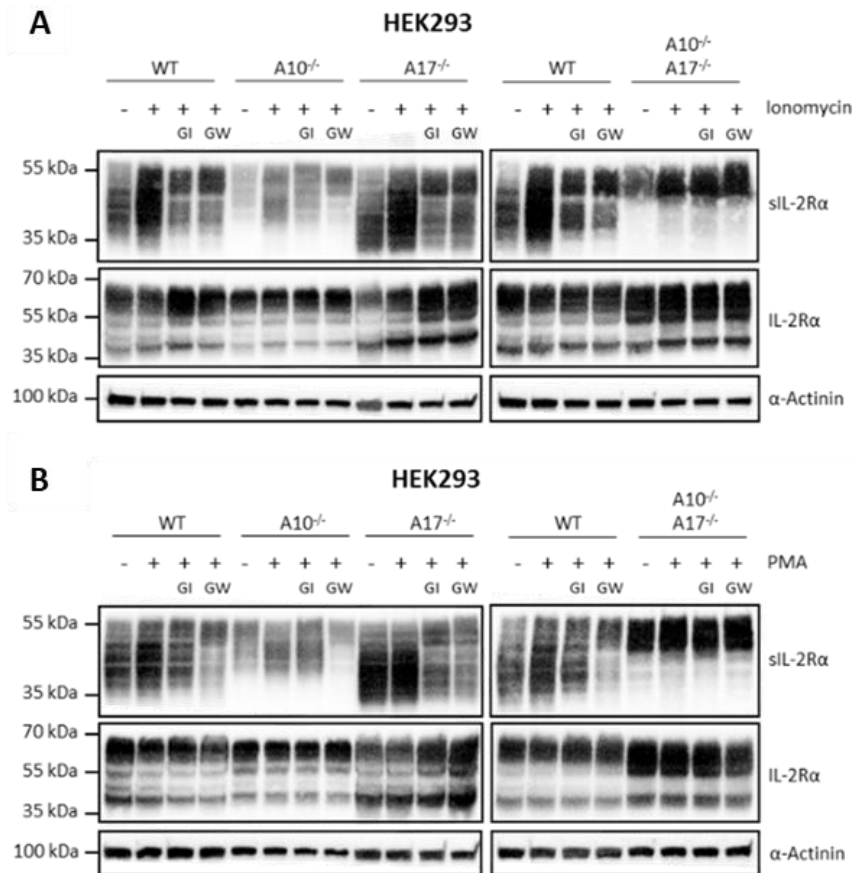
**Abb. 13: Aktivierungen von ADAM10 und ADAM17 steigern in HEK293-KO-Zelllinien das IL-2R $\alpha$ -*Shedding*.** Transient transfizierte HEK293-Zellen defizient für ADAM10, ADAM17 oder beide Proteasen wurden für 1 h mit 1  $\mu$ M Ionomycin (Iono) zur ADAM10-Aktivierung oder für 2 Stunden mit 100 nM PMA zur ADAM17-Aktivierung bzw. mit DMSO als jeweilige Kontrolle behandelt. Die Analyse des stimulierten *Shedding* erfolgte mittels Western Blot (A) und ELISA (B, C). **A:** Western Blot-Analyse des stimulierten IL-2R $\alpha$ -*Shedding* von HEK293-Zelllinien unter Ionomycin- (linke Seite) und PMA-Behandlung (rechte Seite). Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert und der lösliche Rezeptor im Überstand mithilfe der TCA-Fällung präzipitiert. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und per Western Blot analysiert. Das  $\alpha$ -Actinin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist eines von vier unabhängigen Experimenten. **B & C:** ELISA zur Quantifizierung des IL-2R $\alpha$ -*Shedding* in HEK293-Zelllinien unter der Behandlung von Ionomycin (B) oder PMA (C). Die Diagramme zeigen das relative *Shedding* des IL-2R $\alpha$ , berechnet aus der Division des sIL-2R $\alpha$  aus dem Überstand als Dividend und des IL-2R $\alpha$  aus dem Lysat als Divisor. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus jeweils drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen stimulierten Zellen und der jeweiligen DMSO-Kontrolle sind mit einem \* gekennzeichnet (\*:  $p < 0,05$ ), ausbleibende Signifikanzen sind mit „n.s.“ dargestellt.

Zur Analyse der Kompensation von ADAM10 oder ADAM17 bei Abwesenheit der jeweils anderen Protease wurden die HEK293-Zelllinien mit ADAM10- bzw. ADAM17-Defizienz mit Ionomycin oder PMA stimuliert und gleichzeitig mit GI zur Hemmung von ADAM10 oder mit GW zur Inhibierung von ADAM10 und ADAM17 behandelt. Das stimulierte *Shedding* wurde zunächst per Western Blot analysiert (Abb. 14).

Die Stimulation mit Ionomycin zur ADAM10-Aktivierung (Abb. 14A) führt in allen verwendeten HEK293-Zelllinien zu einem verstärkten IL-2R $\alpha$ -*Shedding*, welches unter der Inhibierung von ADAM10 bzw. ADAM10 und ADAM17 verringert wird. In stimulierten A10<sup>-/-</sup>-Zellen ist vor allem eine Reduktion im *Shedding* erkennbar, wenn durch GW neben ADAM10 auch ADAM17 und damit dessen kompensatorische Funktion in ADAM10-Abwesenheit blockiert wird. Auch in A17<sup>-/-</sup>-Zellen ist das *Shedding* durch die Inhibierung der Proteasen reduziert, jedoch ist hierbei kein Unterschied zwischen GI- und GW-behandelten Proben erkennbar. Dies bestätigt die schon zuvor aufgestellte Theorie der kompensatorischen Funktion von ADAM17 in ADAM10-Abwesenheit, wohingegen ADAM10 keine solche kompensatorische Funktion in ADAM17-Abwesenheit aufzuweisen scheint. Doppelt defiziente Zellen zeigen unter der Ionomycin-Stimulation zwar noch immer ein verstärktes IL-2R $\alpha$ -*Shedding*, jedoch ist dieses im Vergleich zu den anderen Zelllinien deutlich schwächer. Die Behandlungen mit GI und GW haben hierbei zudem keinen Einfluss darauf, so dass auch hier von mindestens einem weiteren Mechanismus angegangen werden kann, der neben ADAM10 und ADMA17 in das IL-2R $\alpha$ -*Shedding* involviert ist. Die Signale der Banden, vor allem die des sIL-2R $\alpha$  im Überstand der A10<sup>-/-</sup>/A17<sup>-/-</sup>-Zellen, sind im Vergleich zu den Signalen in Abb. 13A stärker, was sich auf die durch den Einsatz der Protease-Inhibitoren verlängerte Inkubationszeit zurückführen lassen kann oder auf IL-2R $\alpha$  in Mikrovesikeln hinweist, welche durch den ELISA nicht detektiert werden konnten.

Die Stimulation mit PMA zur ADAM17-Aktivierung (Abb. 14B) zeigt nur in WT- und A10<sup>-/-</sup>-Zellen, in denen ADAM17 exprimiert ist, einen verstärkenden Effekt auf das IL-2R $\alpha$ -*Shedding*, welches durch die Behandlung mit GW reduziert wird. Die Behandlung mit GI zeigt hierbei keinen Einfluss auf das *Shedding*. Durch die Abwesenheit von ADAM17 in A17<sup>-/-</sup>- und A10<sup>-/-</sup>/A17<sup>-/-</sup>-Zellen zeigt die Stimulation mit PMA keine Wirkung, die Behandlung mit GI und GW in A17<sup>-/-</sup>-Zellen führt jedoch zu einem durch die Blockierung der gering kompensatorischen Effekte von ADAM10 verringerten *Shedding*. In doppelt defizienten

Zellen ist durch die Abwesenheit beider Proteasen kein Einfluss der Behandlungen mit GI und GW auf das *Shedding* erkennbar.



**Abb. 14:** Inhibierung von ADAM10 und ADAM17 reduzieren in Ionomycin- und PMA-stimulierten HEK293-KO-Zelllinien das IL-2Rα-*Shedding*. Transient transfizierte HEK293-Zellen defizient für ADAM10, ADAM17 oder beide Proteasen wurden für 30 min mit 3 μM GI oder 3 μM GW bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt und anschließend für 1 h mit 1 μM Ionomycin zur ADAM10-Aktivierung oder für 2 Stunden mit 100 nM PMA zur ADAM17-Aktivierung bzw. mit DMSO als jeweilige Kontrolle stimuliert. Die Analyse des *Shedding* unter Behandlung von Ionomycin (A) oder PMA (B) unter Einfluss von Protease-Inhibitoren erfolgte mittels Western Blot. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert und der lösliche Rezeptor im Überstand mithilfe der TCA-Fällung präzipitiert. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und per Western Blot analysiert. Das α-Actinin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist jeweils eines von drei unabhängigen Experimenten.

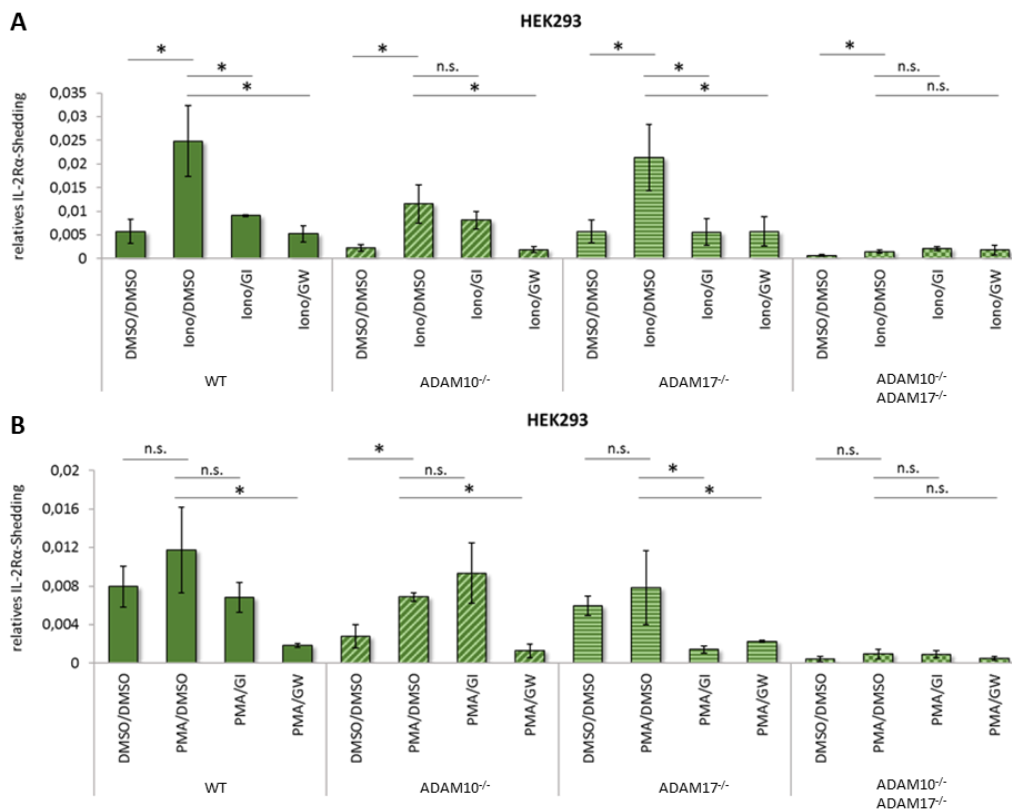
Zur quantitativen Analyse des stimulierten IL-2Rα-*Shedding* wurden zusätzliche ELISA durchgeführt, welche die Ergebnisse aus den Western Blots bestätigen. In Abb. 15 ist das relative *Shedding* der verschiedenen HEK293-Zelllinien unter Ionomycin (Abb. 15A)- und PMA (Abb. 15B)-Stimulation unter Einfluss von ADAM10- und ADAM10/ADAM17-spezifischen Inhibitoren gezeigt.

Wie bereits beobachtet führt die Aktivierung von ADAM10 mithilfe von Ionomycin in allen HEK293-Zelllinien zu einem signifikant erhöhten IL-2Rα-*Shedding*, welches durch die Inhibierung mit GI und damit das ADAM10-bedingte *Shedding* in WT- und A17<sup>-/-</sup>-Zellen

signifikant reduziert wird (Abb. 15A). Die Behandlung mit GW zeigt in WT- und A10<sup>-/-</sup>-Zellen eine signifikante Reduktion im *Shedding*, was sich auf die zusätzliche Blockierung der kompensatorischen Funktion von ADAM17 zurückzuführen lässt. Auch in A17<sup>-/-</sup>-Zellen führt die GW-Behandlung zu einem signifikant reduzierten *Shedding*, welches sich hierbei jedoch hauptsächlich auf die Inhibierung der ADAM10-Aktivität in ADAM17-Abwesenheit zurückführen lässt. In A10<sup>-/-</sup>/A17<sup>-/-</sup>-Zellen haben GI und GW aufgrund der Abwesenheit beider Proteasen keinen Einfluss auf das IL-2R $\alpha$ -*Shedding*.

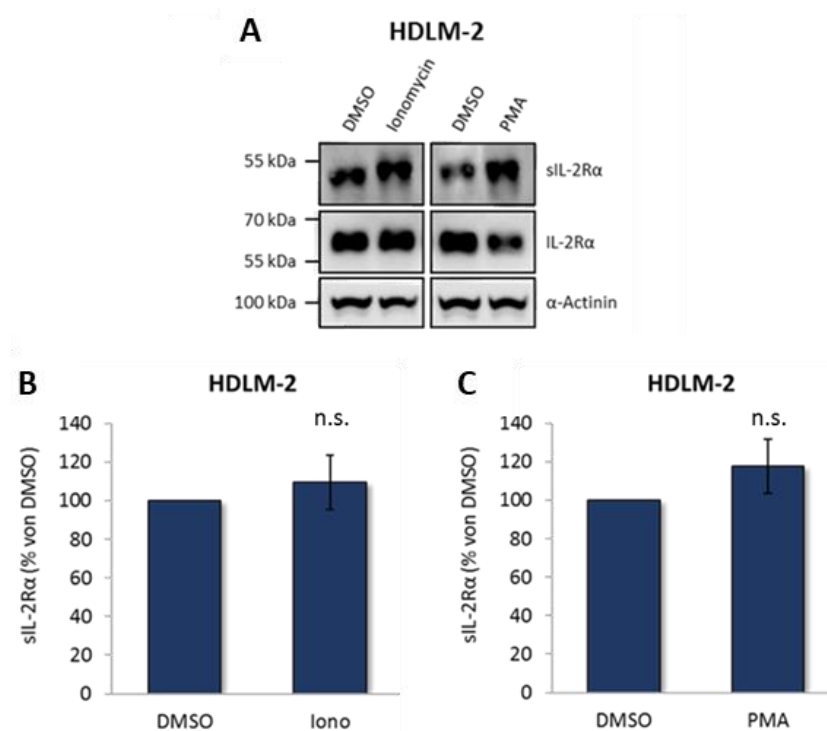
Auch die Stimulation mit PMA (Abb. 15B) zeigt in der quantitativen Analyse Übereinstimmungen mit den Ergebnissen der Western Blot-Analyse. Die ADAM17-Aktivierung durch PMA zeigt in A10<sup>-/-</sup>-Zellen einen signifikanten Anstieg des relativen IL-2R $\alpha$ -*Shedding*. Interessanterweise konnte im Gegensatz dazu in WT-Zellen kein signifikanter Effekt der Stimulation festgestellt werden, was sich möglicherweise auf die hohen Standardabweichungen innerhalb der Experimente zurückführen lässt. In A17<sup>-/-</sup>-Zellen ist bedingt durch die Abwesenheit von ADAM17 kein Effekt der Stimulation zu erkennen. Die zusätzliche Behandlung mit GI zeigt weder in WT- noch in A10<sup>-/-</sup>-Zellen einen Einfluss auf das *Shedding*, was auf eine dominierende Funktion der durch PMA stimulierten ADAM17-Aktivität schließen lässt. In A17<sup>-/-</sup>-Zellen hingegen ist unter GI-Behandlung eine signifikante Reduktion im IL-2R $\alpha$ -*Shedding* zu beobachten, da ADAM10 in Abwesenheit von ADAM17 das IL-2R $\alpha$ -*Shedding* reguliert. Die Blockierung beider Proteasen mittels GW zeigt sowohl in WT- als auch in A10<sup>-/-</sup>-Zellen ein signifikant reduziertes IL-2R $\alpha$ -*Shedding*, was erneut die Funktion von ADAM17 als dominante Protease im stimulierten IL-2R $\alpha$ -*Shedding* verdeutlicht. Auch in A17<sup>-/-</sup>-Zellen wird das *Shedding* unter GW-Behandlung signifikant reduziert, diese unterscheidet sich jedoch bedingt durch die Inhibierung von ADAM10 bei ADAM17-Abwesenheit nur marginal von der GI-Behandlung. In Zellen defizient für beide Proteasen ist hingegen weder ein Einfluss der Stimulation noch der Proteasen-Inhibierung erkennbar, was darauf hindeutet, dass die geringen Mengen an sIL-2R $\alpha$ , die durch die Zelle produziert werden, durch einen Mechanismus unabhängig von ADAM10 und ADAM17 entstehen.

Anhand dieser Ergebnisse kann ADAM17 auch anhand der kompensatorischen Funktion in ADAM10-Abwesenheit als hauptverantwortliche Protease im induzierten IL-2R $\alpha$ -*Shedding* betrachtet werden. ADAM10 ist im stimuliertes *Shedding* involviert, zeigt jedoch keine gleichartige Kompensationsfähigkeit wie ADAM17.



**Abb. 15: ADAM17 ist die hauptverantwortliche Protease im induzierten IL-2R $\alpha$ -Shedding.** Transient transfizierte HEK293-Zelllinien defizient für ADAM10, ADAM17 oder beide Proteasen wurden für 30 min mit 3  $\mu$ M GI oder 3  $\mu$ M GW bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert und anschließend für 1 h mit 1  $\mu$ M Ionomycin zur ADAM10-Aktivierung (A) oder für 2 Stunden mit 100 nM PMA zur ADAM17-Aktivierung (B) bzw. mit DMSO als jeweilige Kontrolle behandelt. Die quantitative Analyse des IL-2R $\alpha$ -Shedding unter Behandlung von Ionomycin (A) oder PMA (B) unter Protease-Inhibitoren erfolgte mittels ELISA. Die Diagramme zeigen das relative IL-2R $\alpha$ -Shedding, das aus der Division des sIL-2R $\alpha$  aus dem Überstand als Dividend und des IL-2R $\alpha$  aus dem Lysat als Divisor berechnet wurde. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus jeweils drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen den DMSO/DMSO-Kontrollen und der jeweiligen Stimulation/DMSO sowie zwischen Stimulation/DMSO und den stimulierten Proben unter Behandlung mit GI oder GW sind mit einem \* gekennzeichnet (\*:  $p < 0,05$ ), ausbleibende Signifikanzen sind mit „n.s.“ dargestellt.

Um die bisherigen Ergebnisse in Zellen mit endogener IL-2R $\alpha$ -Expression nachzuprüfen, wurden HDLM-2-Zellen für 1 h mit Ionomycin oder für 2 h mit PMA stimuliert und das stimulierte Shedding mittels Western Blot und ELISA analysiert (Abb. 16). Jedoch zeigte weder die Western Blot-Analyse (Abb. 16A) deutliche Unterschiede zwischen stimulierter und unstimulierter Probe noch konnten die ELISA-Messungen signifikante Unterschiede in der Menge des sIL-2R $\alpha$  unter der Behandlung mit Ionomycin (Abb. 16B) oder PMA (Abb. 16C) nachweisen. Zurückzuführen lässt sich dies wahrscheinlich auf die hohe konstitutive sIL-2R $\alpha$ -Freisetzung in HDLM-2-Zellen.



**Abb. 16:** Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 hat in HDLM-2-Zellen keinen Einfluss auf IL-2R $\alpha$ -Shedding. HDLM-2-Zellen wurden für 1 h mit 1  $\mu$ M Ionomycin zur ADAM10-Aktivierung oder für 2 Stunden mit 100 nM PMA zur ADAM17-Aktivierung bzw. mit DMSO als jeweilige Kontrolle behandelt. Die Analyse des stimulierten Shedding erfolgte mittels Western Blot (A) und ELISA (B, C). **A:** Western Blot-Analyse des stimulierten IL-2R $\alpha$ -Shedding in HDLM-2-Zellen unter Ionomycin- und PMA-Behandlung. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert und der lösliche Rezeptor im Überstand mithilfe der TCA-Fällung präzipitiert. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und per Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente  $\alpha$ -Actinin. Dargestellt ist eines von vier unabhängigen Experimenten. **B & C:** ELISA zur Quantifizierung des IL-2R $\alpha$ -Shedding in HDLM-2-Zellen unter der Behandlung von Ionomycin (B) oder PMA (C). Die Diagramme zeigen die prozentualen Mengen des sIL-2R $\alpha$  normiert auf die jeweilige DMSO-Kontrolle. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus jeweils vier unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den stimulierten Proben und der jeweiligen Kontrolle festgestellt werden, welche mit „n.s.“ gekennzeichnet sind.

### 3.4. Generierung von Expressionsplasmiden mit Deletionen im membranproximalen IL-2R $\alpha$ -Stalk-Bereich zur Analyse von Protease-Schnittstellen

Aus bisher veröffentlichten Berichten geht hervor, dass die Substrate von ADAM10 und ADAM17 hauptsächlich im membranproximalen Stalk-Bereich geschnitten werden (Scheller et al., 2011). Um auch für den IL-2R $\alpha$  potenzielle ADAM-Schnittstellen im Rezeptor-Stalk-Bereich zu identifizieren, wurden verschiedene Deletionsvarianten des IL-2R $\alpha$  generiert, um deren Shedding zu analysieren. Anhand der Aminosäuresequenz in Abb. 17 ist erkennbar, dass der Stalk-Bereich 54 Aminosäuren (AS) (Positionen 187-240) umfasst. Während bei der hergestellten Variante myc-IL-2R $\alpha$  $\Delta$ E187-Q240 der vollständige Stalk-Bereich deletiert



wurde, fehlen bei den übrigen Varianten nur einzelne Bereiche der *Stalk*-Region von jeweils 10 AS. Bei der myc-IL-2R $\alpha$  $\Delta$ E231-Q240-Variante fehlt der Abschnitt, der unmittelbar an die Membran anschließt. Die Variante myc-IL-2R $\alpha$  $\Delta$ Q221-M230 enthält eine Deletion der zehn AS, die direkt vor dem membranproximalen Abschnitt liegen und der Variante myc-IL-2R $\alpha$  $\Delta$ T211-F220 fehlen die davor befindlichen zehn AS. Die genauen Sequenzen der verschiedenen Deletionsvarianten sind im Abschnitt 8.2 des Anhangs einzusehen. Das myc-tag wurde sowohl bei der WT-Variante als auch bei allen Deletionsvarianten hinter dem Signalpeptid zwischen den Positionen E22 und L23 eingefügt.

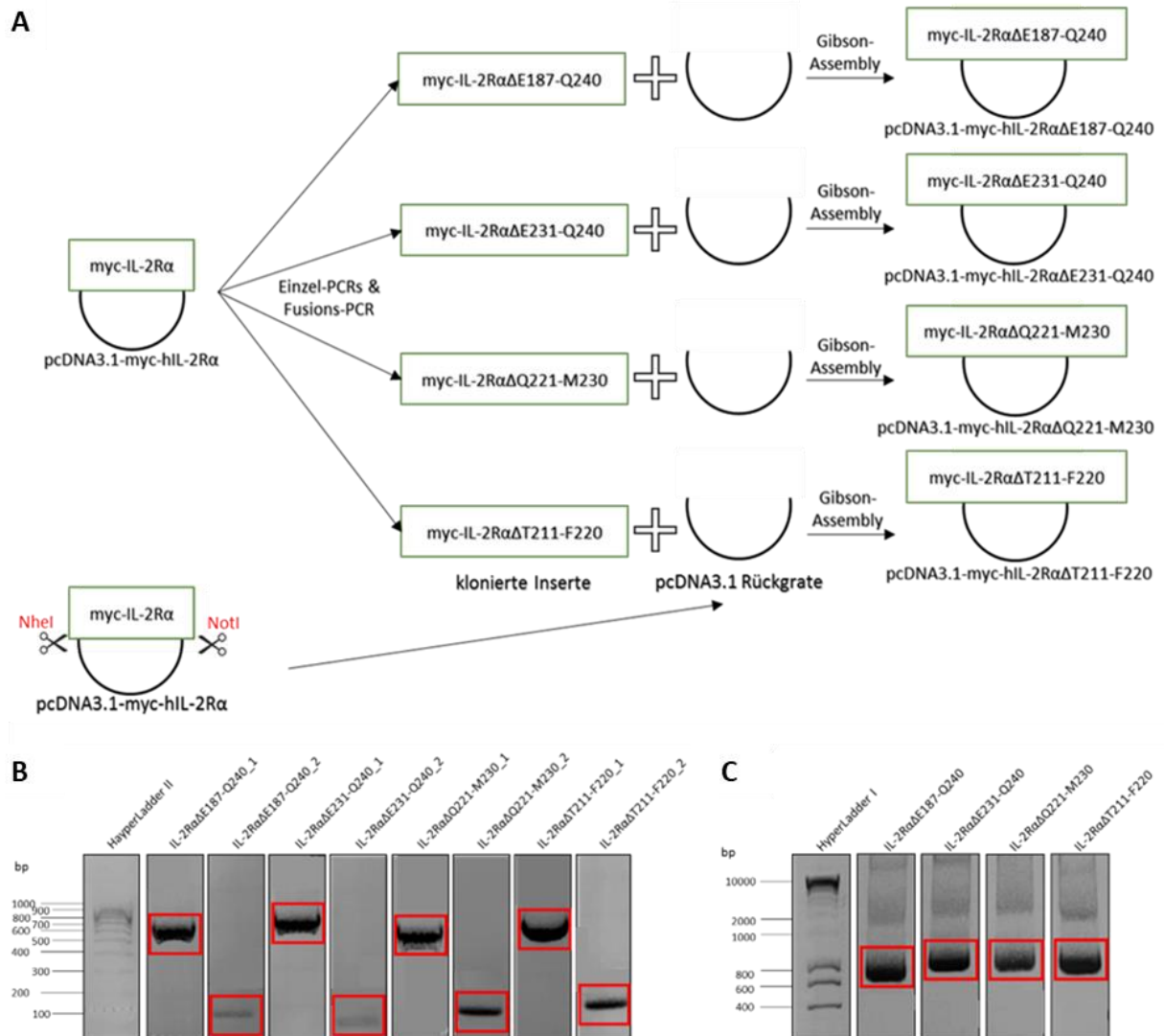
```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
IL2RA  MDSYLLMWGL LTFIMVPGCQ AELCDDDDPPE IPHATFKAMA YKEGTMLNCE CKRGFRIKS GSLYMLCTGN SSHSSWDNQC QCTSSATRNT TKQVTPQPEE
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
IL2RA  QKERKTTEMQ SPMQPVDAQS LPGHCREPPP WENEATERIY HFVVGQMVYY QCVQGYRALH RGPAESVCKM THGKTRWTQP QLICTGEMET SQFPGEKPKQ
      210     220     230     240     250     260     270
IL2RA  ASFEGRPESE TSCLVTTTDF OIOTEMAATM ETSIFTTTEYO VAVAGCVFLL ISVLLLSGLT WORRORKSRR TI

```

**Abb. 17: Aminosäuresequenz des IL-2R $\alpha$ .** Dargestellt sind die Aminosäuresequenz und die Positionsangaben der Aminosäuren des IL-2R $\alpha$ . Farblich in blau hervorgehoben ist die Sequenzabfolge des *Stalk*-Bereichs (Positionen E187-Q240). Die Informationen hierzu wurden von Uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprot/P01589>) bezogen.

Der Ablauf zur Generierung der Plasmide mit den verschiedenen Deletionen ist in Abb. 18 schematisch dargestellt. Die Inserte für die einzelnen myc-IL-2R $\alpha$ -Deletionsvarianten ( $\Delta$ E187-Q240,  $\Delta$ E231-Q240,  $\Delta$ Q221-M230 und  $\Delta$ T211-F220) wurden unter Verwendung spezifischer Primer (s. Abschnitt 2.1.12) mittels Einzel-PCRs mit Begrenzung vor oder hinter dem zu deletierenden Bereich erstellt und schließlich mittels Fusions-PCRs ligiert, um das Endprodukt mit spezifischer Deletion zu erhalten (s. Abschnitt 2.2.1.6) (Abb. 18A). Das pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ -Plasmid diente hierbei als *Template* für die Einzel-PCRs. Die PCR-Produkte der Einzel-PCRs mit einer Größe von ca. 600 bp und 100 bp (für  $\Delta$ E187-Q240), ca. 730 bp und 130 bp (für  $\Delta$ E231-Q240), etwa 700 bp und 160 bp (für  $\Delta$ Q221-M230) sowie ca. 670 bp und 190 bp (für  $\Delta$ T211-F220) (Abb. 18B) wurden nach Ablauf der Agarose-Gelelektrophorese (s. Abschnitt 2.2.1.4) extrahiert und gereinigt (s. Abschnitt 2.2.1.5) und als *Templates* für die Fusions-PCRs verwendet. Die anschließenden Produkte der Fusions-PCRs wurden ebenfalls über eine Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach getrennt und die Zielfragmente mit einer Größe von etwa 700 bp ( $\Delta$ E187-Q240) und jeweils ca. 860 bp ( $\Delta$ E231-Q240,  $\Delta$ Q221-M230 und  $\Delta$ T211-F220) (Abb. 18C) extrahiert und gereinigt. Die so generierten Inserte mit enthaltenem myc-tag konnten schließlich mittels Gibson-Assembly mit den pcDNA3.1-Rückgraten ligiert (s. Abschnitt 2.2.1.8) und die pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Varianten erstellt werden (Abb. 18A).

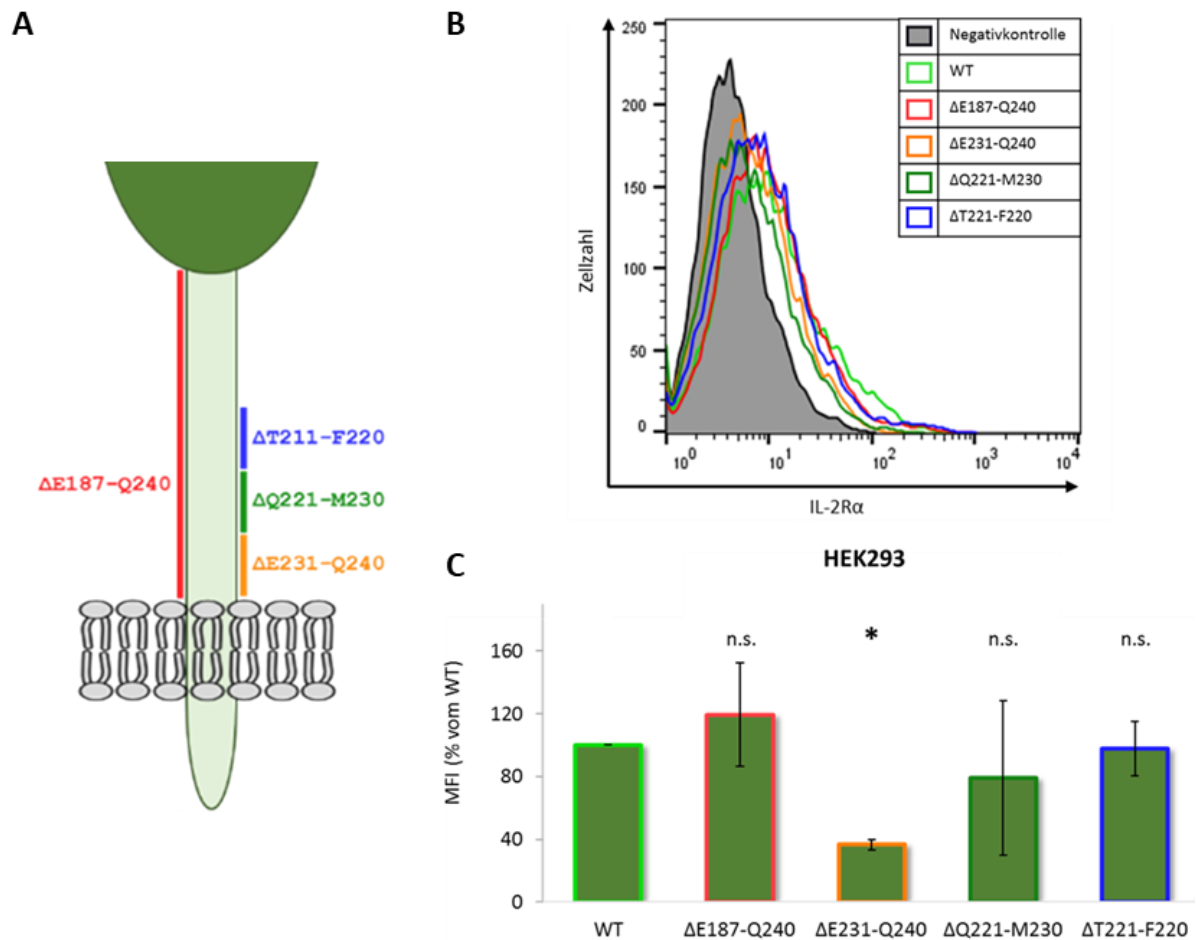


**Abb. 18: Generierung von IL-2R $\alpha$ -Expressionsplasmiden mit Deletionen im membranproximalen *Stalk*-Bereich. A:** Schematische Darstellung der Generierung von IL-2R $\alpha$ -Expressionsplasmiden mit *myc-tag*. Die Inserte der membranproximalen Deletionsvarianten wurden mittels Einzel-PCRs unter Verwendung spezifischer Primer und mit dem pcDNA.3.1-myc-hIL-2R $\alpha$ -Plasmid als *Template* erstellt. Die gereinigten Produkte dienten schließlich als *Templates* für die anschließenden Fusions-PCRs, deren gereinigte Produkte mit den pcDNA3.1-Rückgraten mittels Gibson-Assembly ligiert und die IL-2R $\alpha$ -Plasmide erstellt wurden. Die pcDNA3.1-Rückgrate stammen aus dem pcDNA3.1-myc-hIL-2R $\alpha$ -Vektor, der zuvor mithilfe der Restriktionsenzyme *NheI* und *NotI* (in rot dargestellt) gespalten und anschließend dephosphoryliert wurde. **B:** Ausschnitte der Agarosegele mit den Fragmenten der Einzel-PCRs. Die rot markierten Fragmente aus IL-2R $\alpha$ ΔE287-Q240 (ca. 600 und 100 bp), IL-2R $\alpha$ ΔE231-Q240 (ca. 730 und 130 bp), IL-2R $\alpha$ ΔQ221-M230 (etwa 700 und 160 bp) und IL-2R $\alpha$ ΔT211-F220 (ca. 670 und 190 bp) wurden nach der Reinigung als *Templates* für die Fusions-PCRs verwendet. Als Marker wurde der HyperLadder II (Bioline, Cincinnati, USA) verwendet. **C:** Ausschnitte der Agarosegele mit den Fragmenten der Fusions-PCRs. Die rot markierten Fragmente aus IL-2R $\alpha$ ΔE287-Q240 (etwa 700 bp), IL-2R $\alpha$ ΔE231-Q240 (ca. 860 bp), IL-2R $\alpha$ ΔQ221-M230 (ca. 860 bp) und IL-2R $\alpha$ ΔT211-F220 (etwa 860) wurden nach der Reinigung mit den pcDNA3.1-Rückgraten mittels Gibson-Assembly ligiert. Als Marker wurde der HyperLadder I (Bioline, Cincinnati, USA) verwendet.

Die pcDNA3.1-Rückgrate wurden hierbei aus dem Vektor pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$  bezogen, der zuvor unter Verwendung der Restriktionsnukleasen NheI und NotI zur Entfernung des vorhandenen Inserts gespalten (s. Abschnitt 2.2.1.2) und anschließend dephosphoryliert wurde (s. Abschnitt 2.2.1.3). Alle Sequenzen wurden durch Sanger Sequenzierung (Eurofins Genomics) bestätigt.

### **3.5. IL-2R $\alpha$ -Shedding hängt von der Rezeptor-Stalk-Region ab**

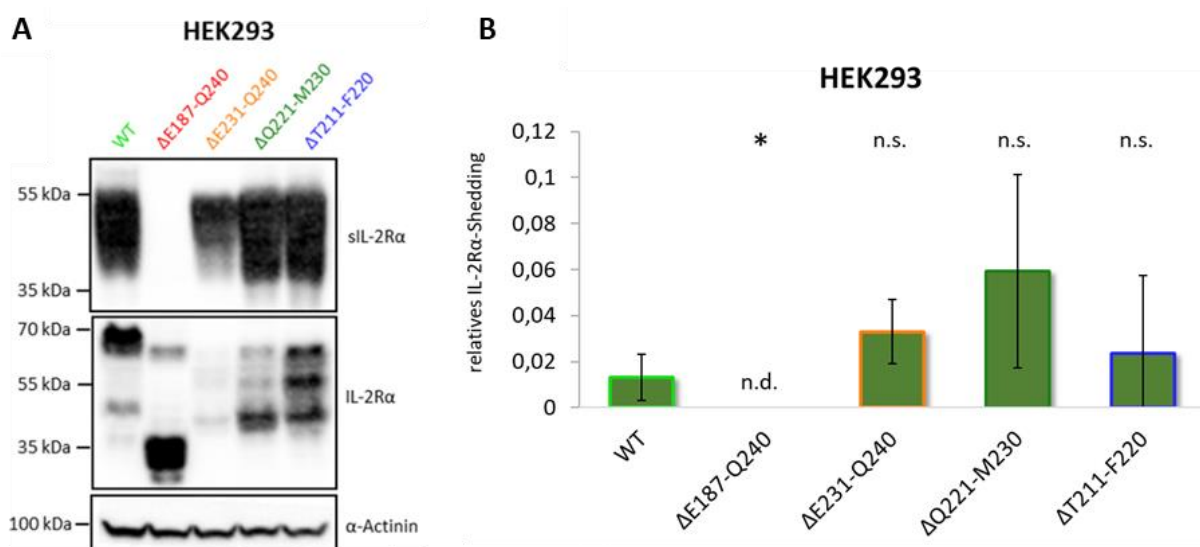
Bevor ein möglicher Einfluss der *Stalk*-Deletionen auf das IL-2R $\alpha$ -Shedding untersucht werden sollte, wurde mithilfe der Durchflusszytometrie die Oberflächenexpression der Varianten analysiert. Hierfür wurden HEK293-Zellen wie in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben transient mit den zuvor generierten IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Expressionsplasmiden transient transfiziert und für die Messung mit dem primären myc-tag-Antikörper und anschließend mit dem fluoreszenzmarkierten  $\alpha$ -rabbit-AlexaFluor488 Sekundärantikörper inkubiert (s. Abschnitt 2.2.3.4). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit einem pcDNA3.1-Leerplasmid transfiziert wurden. Anhand des Histogramms in Abb. 19B ist erkennbar, dass sowohl der WT (in hellgrün) als auch alle generierten Rezeptor-Varianten (schematisch dargestellt in Abb. 19A:  $\Delta$ E187-Q240 in rot,  $\Delta$ E231-Q240 in orange,  $\Delta$ Q221-M230 in dunkelgrün und  $\Delta$ T211-F220 in blau) im Vergleich zur Negativkontrolle (in grau) stärkere Fluoreszenzintensitäten aufweisen, was auf die Expression aller untersuchten Rezeptor-Varianten auf der Zelloberfläche schließen lässt. Die Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) in Abb. 19C bestätigen die Beobachtungen und zeigt, dass sich die Varianten  $\Delta$ E187-Q240,  $\Delta$ Q221-M230 und  $\Delta$ T211-F220 in ihrer Fluoreszenzintensität nicht signifikant vom WT unterscheiden und keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression der Rezeptor-Varianten zu haben. Die Variante  $\Delta$ E231-Q240 hingegen ist in ihrer Fluoreszenzintensität gegenüber dem WT reduziert, was auf einen möglichen Einfluss der Deletion auf die Oberflächenexpression des Rezeptors hinweisen kann.



**Abb. 19: Oberflächenexpression des IL-2R $\alpha$  ist unabhängig von Deletionen im Rezeptor-*Stalk*-Bereich.** HEK293-Zellen wurden transient mit IL-2R $\alpha$  oder IL-2R $\alpha\Delta$ -Varianten transfiziert. Nach 48-stündiger Inkubation erfolgte die Oberflächenanalyse des IL-2R $\alpha$  und der  $\Delta$ -Varianten mittels Durchflusszytometrie. **A:** Schematische Darstellung der Deletionen im IL-2R $\alpha$ -*Stalk*-Bereich. **B:** Oberflächenanalyse der IL-2R $\alpha$ -Varianten. Als Negativkontrolle (grau) dienen HEK293-Zellen, die mit einem Leerplasmid transfiziert wurden. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten. **C:** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der IL-2R $\alpha$ -Varianten. Das Diagramm zeigt die prozentuale, mittlere Fluoreszenzintensität normiert auf die des WT. Die Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle wurde zuvor von den gemessenen Intensitäten der anderen Proben abgezogen. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen den Deletionsvarianten und dem WT sind mit einem \* gekennzeichnet (\*:  $p < 0,05$ ), ausbleibende Signifikanzen sind mit „n.s.“ dargestellt.

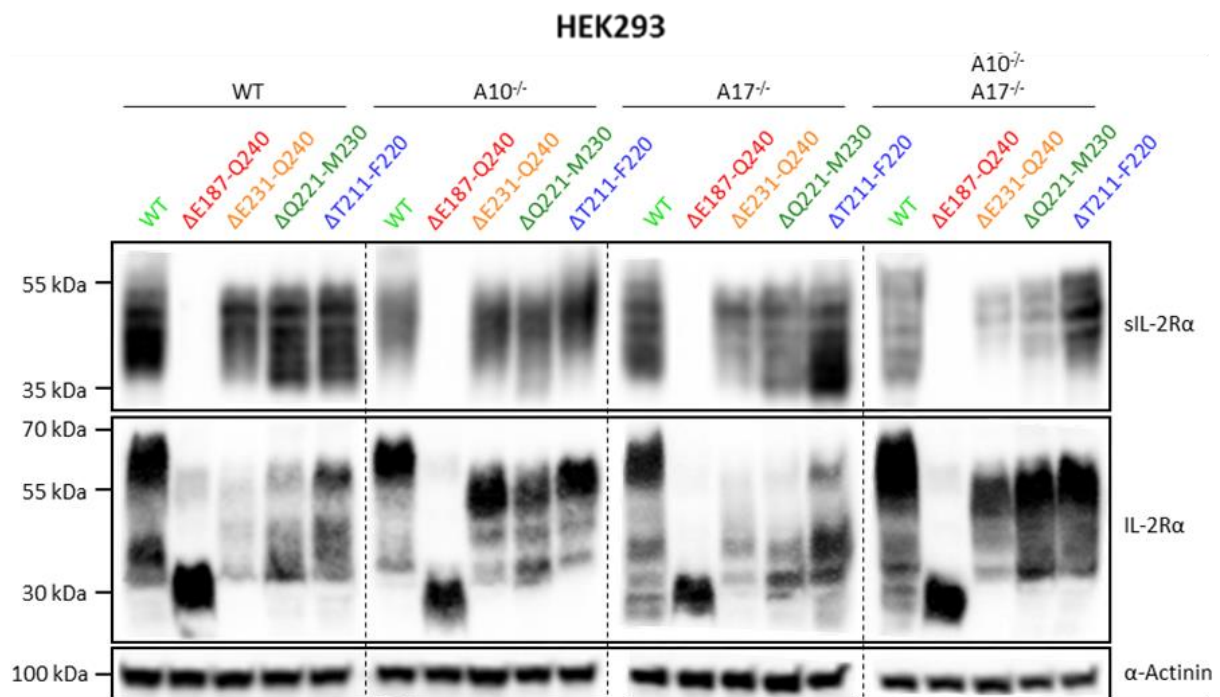
Nachdem gezeigt werden konnte, dass alle IL-2R $\alpha$ -Varianten auf der Zelloberfläche exprimiert werden, wurde der Einfluss der Deletionen auf das konstitutive *Shedding* untersucht. Hierfür wurden die mit den verschiedenen IL-2R $\alpha\Delta$ -Expressionsplasmiden transfizierten HEK293-Zellen wie in Abschnitt 2.2.2.7 beschrieben für 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert und das IL-2R $\alpha$ -*Shedding* mittels Western Blot und ELISA analysiert (Abb. 20). Anhand der Western Blot-Analyse in Abb. 20A zeigt sich, dass der im Lysat exprimierte IL-2R $\alpha\Delta$ E187-Q240 aufgrund der Deletion des *Stalk*-Bereichs mit einer Größe von etwa 35 kDa deutlich kleiner ist als die die WT-Variante. Interessant ist hierbei

jedoch vor allem, dass diese Variante nicht geschnitten wird und somit nicht im Überstand vorhanden ist. Auch die relative *Shedding*-Rate bestätigt, dass von dem im Lysat exprimierten Rezeptor keine messbare Menge geschnitten wird (Abb. 20B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Schnittstelle der ADAM-Proteasen innerhalb des *Stalk*-Bereichs liegen muss und das konstitutive *Shedding* von dem *Stalk*-Bereich abhängt. Die übrigen Varianten zeigen bedingt durch die Deletion von lediglich 10 AS eine ähnliche Größe wie die WT-Variante (Abb. 20A), das *Shedding* scheint jedoch durch diese deletierten Bereiche nicht beeinflusst zu sein, so dass alle drei Varianten ähnlich zum WT geschnitten werden (Abb. 20B). Dies lässt vermuten, dass die von ADAM10 und ADAM17 verwendete Schnittstelle entweder nicht zwischen den AS T211 und Q240 liegt oder sogar mehrere Schnittstellen innerhalb des *Stalk*-Bereichs des IL-2R $\alpha$  existieren. Eine weitere Möglichkeit wäre die Entstehung neuer Schnittstellen durch die deletierten Bereiche im *Stalk*-Bereich.



**Abb. 20:** IL-2R $\alpha$ -*Stalk*-Bereich ist notwendig für ADAM10- und ADAM17-reguliertes *Shedding*. Mit IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Varianten transfizierte HEK293-Zellen wurden mit serumfreiem Medium versetzt und nach 24 h Inkubation geerntet. Die Analyse des konstitutiven *Shedding* der IL-2R $\alpha$ -Varianten erfolgte mittels Western Blot (A) und ELISA (B). **A:** Western Blot-Analyse des konstitutiven *Shedding* der IL-2R $\alpha$ -Varianten. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert und der lösliche Rezeptor im Überstand mithilfe der TCA-Fällung präzipitiert. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und per Western Blot analysiert. Das  $\alpha$ -Actinin wurde als Ladekontrolle detektiert. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten. **B:** ELISA zur Quantifizierung des konstitutiven *Shedding* der IL-2R $\alpha$ -Varianten. Das Diagramm zeigt die relative *Shedding*-Rate des IL-2R $\alpha$  und der  $\Delta$ -Varianten, die aus der Division des sIL-2R $\alpha$  aus dem Überstand als Dividend und des IL-2R $\alpha$  aus dem Lysat als Divisor berechnet wurde. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen den IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Varianten und dem WT sind mit einem \* gekennzeichnet (\*:  $p < 0,05$ ), ausbleibende Signifikanzen sind mit „n.s.“ dargestellt. Nicht detektierbare Proben sind mit „n.d.“ gekennzeichnet.

Im nächsten Schritt wurden die verschiedenen HEK293-Zelllinien mit ADAM10-, ADAM17- und ADAM10/ADAM17-Defizienz mit den verschiedenen IL-2R $\alpha$ -Expressionsplasmiden transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert und das konstitutive Shedding mittels Western Blot (Abb. 21) und ELISA (Abb. 22) analysiert. Anhand der Western Blot-Analyse (Abb. 21) ist erkennbar, dass die IL-2R $\alpha$  $\Delta$ E187-Q240-Variante mit vollständig deletiertem *Stalk*-Bereich unabhängig von der ADAM10-, ADAM17- und ADAM10/ADAM17-Defizienz in HEK293-Zellen nicht geschnitten wird.

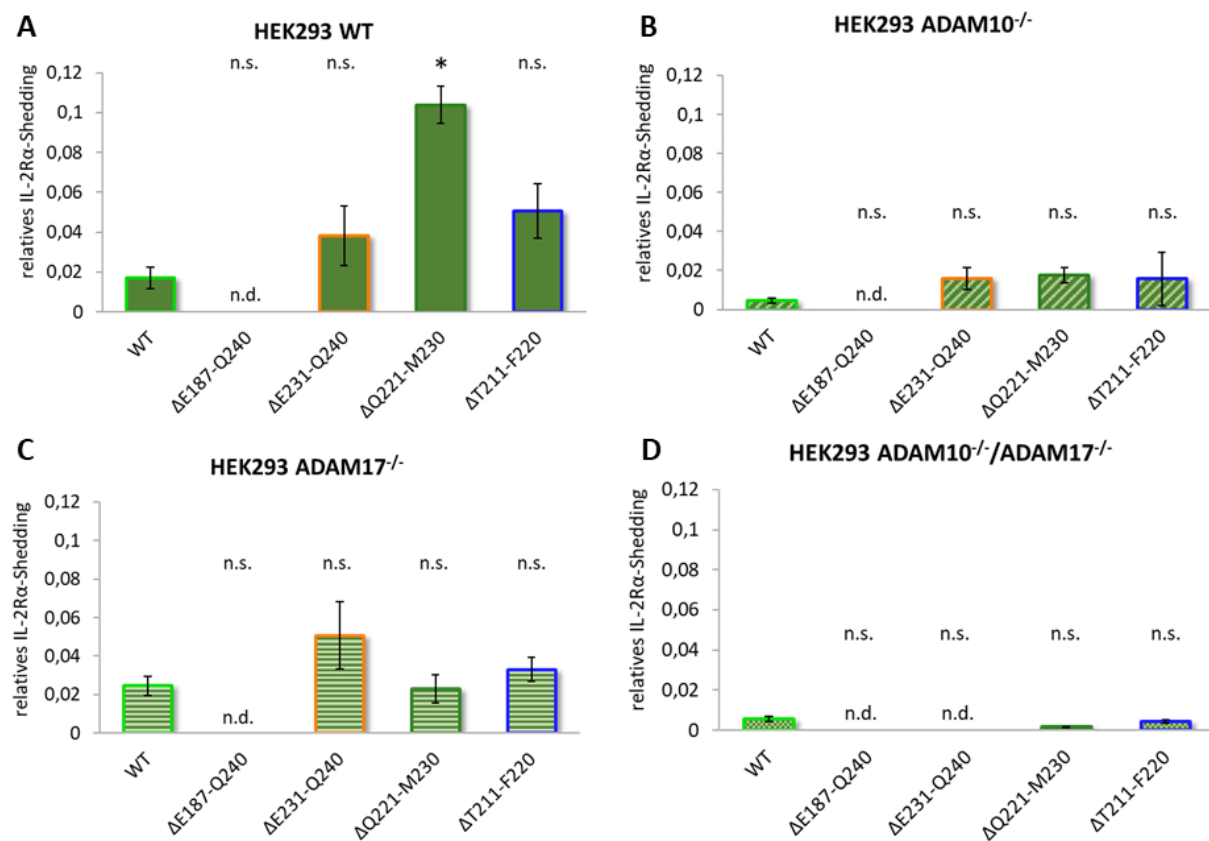


**Abb. 21:** Deletion des IL-2R $\alpha$ -*Stalk*-Bereichs verhindert in HEK293-KO-Linien das IL-2R $\alpha$ -*Shedding*. Mit IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Varianten transfizierte HEK293-KO-Zellen wurden für 24 h mit serumfreiem Medium versetzt. Die Analyse des konstitutiven *Shedding* der IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Varianten in den HEK293-Zelllinien erfolgte mittels Western Blot. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und per Western Blot analysiert. Das  $\alpha$ -Actinin wurde als Ladekontrolle detektiert. Dargestellt ist eines von zwei unabhängigen Experimenten.

In Abwesenheit von ADAM10 bzw. ADAM17 wirkt hierbei auch kein kompensatorischer Effekt der jeweils vorhandenen Protease und auch andere Mechanismen scheinen keinen Einfluss auf das IL-2R $\alpha$ -*Shedding* zu haben, wenn die *Stalk*-Region deletiert ist. In A10<sup>-/-</sup>- und A10<sup>-/-</sup>/A17<sup>-/-</sup>-Zellen ist ein sichtbar reduziertes Rezeptor-*Shedding* des WT-Rezeptors erkennbar, was auf die Defizienz von ADAM10 bzw. ADAM10/ADAM17 und damit die fehlende *Shedding*-Aktivität zurückzuführen ist. In A17<sup>-/-</sup>-Zellen ist eine Reduktion des IL-2R $\alpha$ -*Shedding* hingegen nur schwach erkennbar, was auf eine sekundäre Funktion von

ADAM17 gegenüber ADAM10 als potenziell primäre Protease im konstitutiven IL-2R $\alpha$ -*Shedding* deuten könnte. In A10<sup>-/-</sup>-Zellen ist ein generell verringertes *Shedding* der IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Varianten erkennbar, jedoch ist hierbei kein Unterschied in Abhängigkeit der ADAM10- oder ADAM17-Defizienz erkennbar. In A17<sup>-/-</sup>- und A10<sup>-/-</sup>/A17<sup>-/-</sup>-Zellen hingegen scheint die IL-2R $\alpha$  $\Delta$ T211-F220-Variante etwas stärker als die IL-2R $\alpha$  $\Delta$ E231-Q240- und IL-2R $\alpha$  $\Delta$ Q221-M230-Varianten geschnitten zu werden.

Die quantitative Analyse hierzu belegt, dass wie bereits beobachtet die IL-2R $\alpha$  $\Delta$ E187-Q240-Variante in keiner der untersuchten Zelllinien geschnitten wird und damit nicht detektierbar ist (Abb. 22).

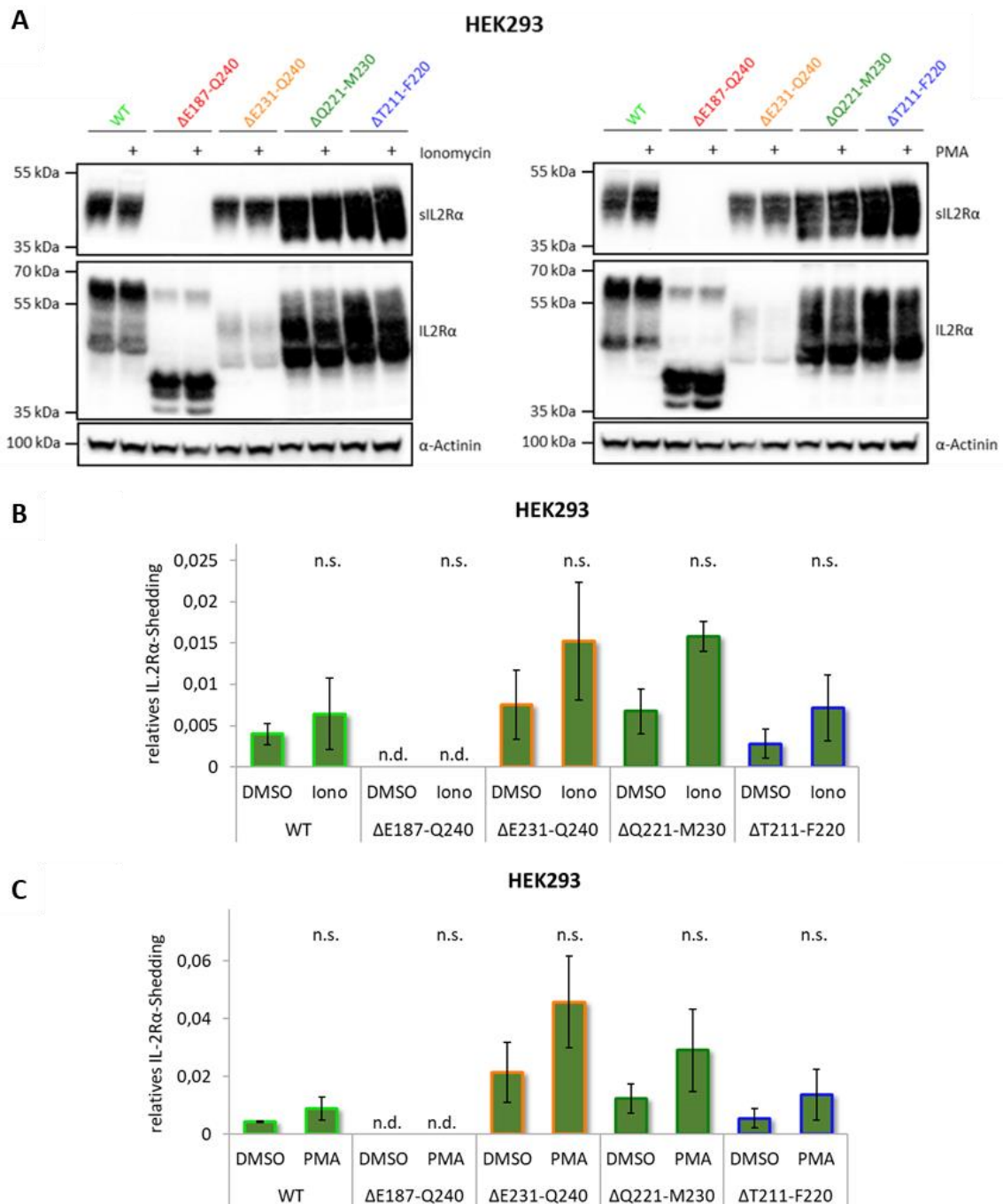


**Abb. 22:** Deletion des IL-2R $\alpha$ -*Stalk*-Bereichs in HEK293-KO-Linien führt zu ausbleibendem IL-2R $\alpha$ -*Shedding*. Mit IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Varianten transfizierte HEK293-KO-Zellen wurden für 24 h mit serumfreiem Medium versetzt. Die Quantifizierung des konstitutiven *Shedding* der IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Varianten in den HEK293-KO-Linien erfolgte mittels ELISA. Die Diagramme zeigen die relative *Shedding*-Rate des IL-2R $\alpha$  und der  $\Delta$ -Varianten in HEK293 WT-Zellen (A), ADAM10<sup>-/-</sup>-Zellen (B), in ADAM17<sup>-/-</sup>-Zellen (C) sowie ADAM10<sup>-/-</sup>/ADAM17<sup>-/-</sup>-Zellen (D). Die *Shedding*-Raten wurde aus der Division des sIL-2R $\alpha$  aus den Überständen als Dividenden und des IL-2R $\alpha$  aus den Lysaten als Divisoren berechnet. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus jeweils zwei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen den  $\Delta$ -Varianten und dem WT sind mit einem \* gekennzeichnet (\*: p < 0,05), ausbleibende Signifikanzen sind mit „n.s.“ vermerkt. Nicht detektierbare Proben sind mit „n.d.“ gekennzeichnet.

Dies zeigt, dass diese Variante unabhängig von der Anwesenheit von ADAM10 oder ADAM17 auch durch keine anderen, unbekanntenen Mechanismen geschnitten werden kann und bestärkt die vorherigen Beobachtungen, dass die einzigen Schnittstellen innerhalb des Rezeptor-*Stalk*-Bereichs existieren. In WT-Zellen (Abb. 22A) ist unerwarteterweise ein signifikant verstärktes Rezeptor-*Shedding* der IL-2R $\alpha$  $\Delta$ Q221-M230-Variante erkennbar, wohingegen sich dieser Effekt in A10<sup>-/-</sup> (Abb. 22B), A17<sup>-/-</sup> (Abb. 22C) und A10<sup>-/-</sup>/A17<sup>-/-</sup>-Zellen (Abb. 22D) nicht zeigt. Ein signifikant reduziertes *Shedding* der  $\Delta$ -Varianten im Vergleich zur WT-Variante kann hierbei in keiner der KO-Zelllinien nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass die kompensatorische Aktivität der verbliebenen Protease unabhängig von der Deletion im *Stalk*-Bereich ist, solange dieser nicht vollständig deletiert ist oder beide Proteasen fehlen.

Zur Vertiefung der Beobachtungen sollte die Stimulation der Zellen mit Ionomycin und PMA Aufschluss darüber geben, ob eine Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 das *Shedding* der untersuchten IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Varianten beeinflusst. Hierfür wurden erneut HEK293-Zellen mit den verschiedenen IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Expressionsplasmiden transfiziert und für 1 Stunde mit Ionomycin zur Aktivierung von ADAM10 oder für 2 Stunden mit PMA zur ADAM17-Stimulation behandelt. Die Analyse des induzierten IL-2R $\alpha$ -*Shedding* erfolgte mittels Western Blot und ELISA (Abb. 23). Sowohl die ADAM10-Aktivierung mit Ionomycin als auch die ADAM17-Aktivierung durch PMA zeigen im Western Blot (Abb. 23A) weder beim WT noch bei den untersuchten Varianten einen Einfluss auf das *Shedding*. Ungewöhnlicherweise führt die Stimulation des WT mit Ionomycin und PMA in diesem Experiment nicht bzw. nur sehr gering zu einer verstärkten Induktion des IL-2R $\alpha$ , was den vorherigen Beobachtungen widerspricht. Die Ursache für dieses Ergebnis könnte in der unterschiedlichen Transfektionseffizienz liegen oder aufgrund der zu hohen Abweichungen der einzelnen Experimente innerhalb eines Versuchs hervorgerufen werden. Zu beachten wäre hierbei jedoch, dass diese Ergebnisse nur auf zwei Versuchen beruhen. Für eine eindeutige Aussage wäre hier die Durchführung weiterer Versuche notwendig.





**Abb. 23: Deletierter Stalk-Bereich verhindert IL-2Rα-Shedding stimulierter HEK293-Zellen.** Mit IL-2RαΔ-Varianten transfizierte HEK293-Zellen wurden für 1 h mit 1  $\mu$ M Ionomycin (A, links & B) oder 2 h mit 100 nM PMA (A, rechts & C) behandelt. Die Analyse des stimulierten *Shedding* der IL-2RαΔ-Varianten erfolgte mittels Western Blot (A) und ELISA (B, C). **A:** Western Blot-Analyse des stimulierten *Shedding* der IL-2RαΔ-Varianten. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert, der lösliche Rezeptor im Überstand mithilfe der TCA-Fällung präzipitiert. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und per Western Blot analysiert. Das  $\alpha$ -Actinin wurde als Ladekontrolle detektiert. Dargestellt ist jeweils eines von drei unabhängigen Experimenten. **B & C:** ELISA zur Quantifizierung des stimulierten *Shedding* der IL-2RαΔ-Varianten. Die Diagramme zeigen die relative *Shedding*-Rate des IL-2Rα und der  $\Delta$ -Varianten unter Behandlung von Ionomycin (B) und PMA (C). Die *Shedding*-Rate wurde aus der Division des sIL-2Rα aus dem Überstand als Dividend und des IL-2Rα aus dem Lysat als Divisor berechnet. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen stimulierten Proben und der jeweiligen Kontrolle festgestellt werden, was mit „n.s.“ dargestellt ist. Nicht detektierbare Proben sind mit „n.d.“ gekennzeichnet.

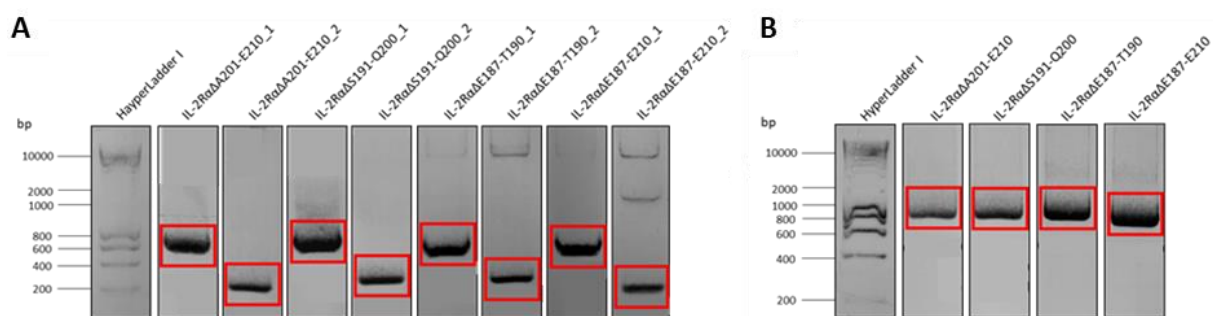
Auch in der ergänzenden quantitativen Analyse (Abb. 23B & C) ist erkennbar, dass sich zwar eine Tendenz zur einem verstärkten *Shedding* unter der Aktivierung der Proteasen zeigt, diese Unterschiede jedoch nicht signifikant sind. Interessanterweise wird die  $\Delta E187$ -Q240-Variante trotz der Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 weiterhin nicht geschnitten, was die zuvor getätigte These bestärkt, dass das IL-2R $\alpha$ -*Shedding* vom *Stalk*-Bereich abhängig ist, dass die Deletion der *Stalk*-Region somit das *Shedding* verhindert und dass die Schnittstellen von ADAM10 und ADAM17 beim IL-2R $\alpha$  somit ausschließlich im *Stalk*-Bereich existieren. Auch in diesem Experiment ist zu beachten, dass die Ergebnisse auf nur zwei Versuchen beruhen.

Zusammenfassend ist erkennbar, dass das konstitutive und auch das induzierte *Shedding* durch die vollständige Deletion des Rezeptor-*Stalk*-Bereichs verhindert wird. Eine Deletion von ADAM10 oder ADAM17 bzw. beider Proteasen in HEK293-Zellen haben auf das *Shedding* dieser Rezeptor-Variante keinen Einfluss. Die IL-2R $\alpha$  $\Delta$ Q221-M230-Variante scheint in WT-Zellen tendenziell stärker als die WT-Rezeptor-Variante geschnitten zu werden, dies kann jedoch nicht in allen Versuchen statistisch bestätigt werden. In A10<sup>-/-</sup>, A17<sup>-/-</sup> und A10<sup>-/-</sup>/A17<sup>-/-</sup>-Zellen ist dies hingegen nicht zu beobachten. Bei den Varianten  $\Delta E231$ -Q240 und  $\Delta T211$ -F220 ist weder in WT-Zellen noch in A10<sup>-/-</sup>, A17<sup>-/-</sup> oder A10<sup>-/-</sup>/A17<sup>-/-</sup>-Zellen im *Shedding* ein statistischer Unterschied zur WT-Variante erkennbar. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Schnittstelle für ADAM10 und ADAM17 im *Stalk*-Bereich des IL-2R $\alpha$  liegen muss, jedoch nicht im membranproximalen Bereich. Darüber hinaus wird deutlich, dass die kompensatorische Funktion von ADAM10 und ADAM17 bei Abwesenheit der jeweils anderen Protease unabhängig von der Deletion im IL-2R $\alpha$ -*Stalk*-Bereich ist. Beim Fehlen beider Proteasen ist sowohl beim WT-IL-2R $\alpha$  als auch bei den IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Varianten kein *Shedding* erkennbar.

### **3.6. Generierung von Expressionsplasmiden zur Analyse von möglichen Protease-Schnittstellen im membrandistalen IL-2R $\alpha$ -*Stalk*-Bereich**

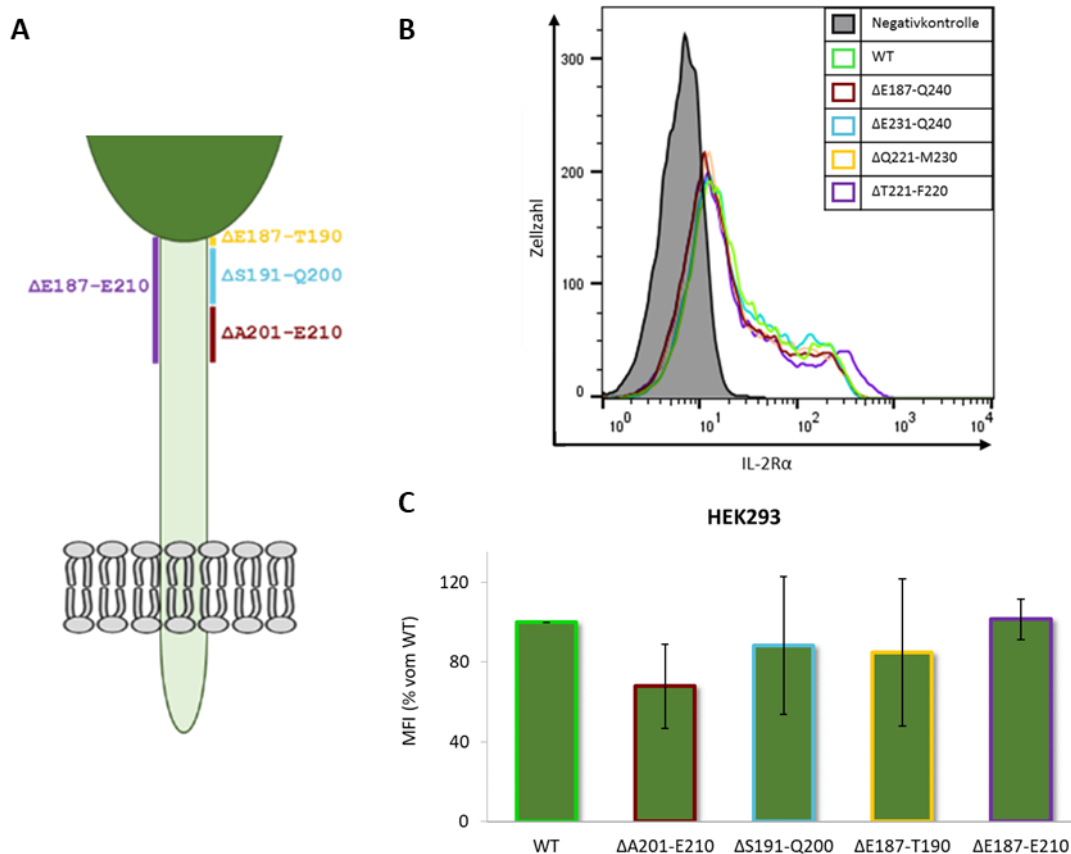
Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Schnittstellen von ADAM10 und ADAM17 zwar im IL-2R $\alpha$ -*Stalk*-Bereich liegen, sich diese jedoch nicht zwischen den AS T211 und Q240 befinden. Aufgründessen wurden weitere Expressionsplasmide generiert, die verschiedene Deletionen im membrandistalen IL-2R $\alpha$ -*Stalk*-Bereich aufweisen (myc-IL-2R $\alpha$  $\Delta$ A201-E210, myc-IL-2R $\alpha$  $\Delta$ S191-Q200, myc-IL-2R $\alpha$  $\Delta$ E187-T190 und myc-IL-2R $\alpha$  $\Delta$ E187-

E210, Abb. 25A). Bei der Variante  $\Delta$ E187-T190 sind die 3 AS deletiert, die unmittelbar an die zweite Sushi-Domäne angrenzen und damit die drei membrandistalsten AS des *Stalk*-Bereichs darstellen. Die Varianten S191-Q200 hat eine Deletion der darauffolgenden 10 AS und der Variante A201-E210 fehlen die 10 anschließenden AS. Bei der Variante E187-E210 ist der gesamte membrandistale *Stalk*-Bereich in der Größe von 24 AS deletiert. Die Generierung der Plasmide erfolgte analog zu der Generierung der Expressionsplasmide der membranproximalen  $\Delta$ -Varianten (Abb. 18A). Auch hier wurden zunächst Einzel-PCRs durchgeführt, bei denen das pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha$ -Plasmid als *Template* diente. Die Zielfragmente der Einzel-PCRs (Abb. 24A) mit einer Größe von etwa 640 bp und 220 bp (für  $\Delta$ A201-E210), ca. 610 bp und 250 bp (für  $\Delta$ S191-Q200), ca. 600 bp und 270 bp (für  $\Delta$ E187-T190) sowie etwa 610 bp und 190 bp (für  $\Delta$ E187-E210) wurden nach Ablauf der Gelelektrophorese (s. Abschnitt 2.2.1.4) extrahiert und aufgereinigt (s. Abschnitt 2.2.1.5), bevor sie als *Templates* für die anschließende Fusions-PCR verwendet wurden. Die Produkte der Fusions-PCR (Abb. 24B) wurden ebenfalls mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt und die Zielfragmente von etwa 860 bp ( $\Delta$ A201-E210), ca. 860 bp ( $\Delta$ S191-Q200), etwa 870 bp ( $\Delta$ E187-T190) und ca. 800 bp ( $\Delta$ E187-E210) extrahiert. Die aufgereinigten Produkte wurden anschließend mittels Gibson-Assembly mit den pcDNA3.1-Rückgraten ligiert und die membrandistalen pcDNA3.1-myc-IL-2R $\alpha\Delta$ -Varianten erstellt.



**Abb. 24: Generierung von IL-2R $\alpha\Delta$ -Expressionsplasmiden mit Deletionen im membrandistalen IL-2R $\alpha$ -*Stalk*-Bereich.** **A:** Ausschnitte der Agarosegele mit den Fragmenten der Einzel-PCRs. Die rot markierten Fragmente von IL-2R $\alpha\Delta$ A201-E210 (ca. 640 und 220 bp), IL-2R $\alpha\Delta$ S191-Q200 (ca. 610 und 250 bp), IL-2R $\alpha\Delta$ E187-T190 (etwa 600 und 270 bp) und IL-2R $\alpha\Delta$ E187-E210 (ca. 610 und 190 bp) wurden nach der Aufreinigung als *Templates* für die Fusions-PCRs verwendet. Als Marker wurde der HyperLadder I (Bioline, Cincinnati, USA) aufgetragen. **B:** Ausschnitte der Agarosegele mit den Fragmenten der Fusions-PCRs. Die rot markierten Fragmente aus IL-2R $\alpha\Delta$ A201-E210 (etwa 860 bp), IL-2R $\alpha\Delta$ S191-Q200 (ca. 860 bp), IL-2R $\alpha\Delta$ E187-T190 (ca. 870 bp) und IL-2R $\alpha\Delta$ E187-E210 (etwa 800) wurden nach der Aufreinigung wie in Abb. 18A beschrieben mit den pcDNA3.1-Rückgraten mittels Gibson-Assembly ligiert. Als Marker wurde der HyperLadder I (Bioline, Cincinnati, USA) aufgetragen.

Es sollte zunächst untersucht werden, ob die Deletionen im membrandistalen IL-2R $\alpha$ -*Stalk*-Bereich Einfluss auf die Oberflächenexpression des Rezeptors haben. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit den zuvor generierten Expressionsplasmiden für die membrandistalen IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Varianten und den IL-2R $\alpha$ -WT transfiziert und wie in Abschnitt 2.2.3.4 beschrieben zur Untersuchung der Rezeptor-Oberflächenexpression vorbereitet. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die mit einem Leerplasmid transfiziert wurden.

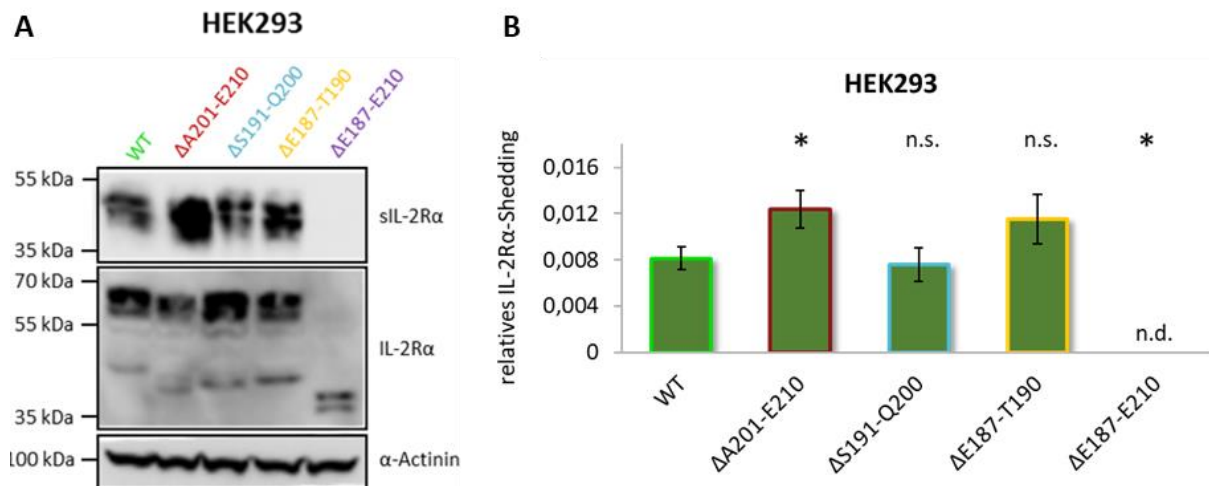


**Abb. 25: Deletionen im membrandistalen Rezeptor-*Stalk*-Bereich haben keinen Einfluss auf die IL-2R $\alpha$ -Oberflächenexpression.** HEK293-Zellen wurden transient mit IL-2R $\alpha$  oder IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Varianten transfiziert. Nach 48-stündiger Inkubation erfolgte die Oberflächenanalyse des IL-2R $\alpha$  und der Rezeptorvarianten mittels Durchflusszytometrie. **A:** Schematische Darstellung der Deletionen im membrandistalen *Stalk*-Bereich des IL-2R $\alpha$ . **B:** Oberflächenanalyse der IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Varianten. Als Negativkontrolle (grau) dienten HEK293-Zellen, die mit einem Leerplasmid transfiziert wurden. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten. **C:** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der membrandistalen IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Varianten. Das Diagramm zeigt die prozentuale mittlere Fluoreszenzintensität normiert auf die des WT. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den MFIs der IL-2R $\alpha$  $\Delta$ -Varianten und dem WT festgestellt werden, was mit „n.s.“ gekennzeichnet ist.

Anhand der durchflusszytometrischen Analyse in Abb. 25B ist erkennbar, dass alle untersuchten Varianten (schematisch dargestellt in Abb. 25A:  $\Delta$ A201-E210 in dunkelrot,  $\Delta$ S191-Q200 in türkis,  $\Delta$ E187-T190 in gelb und  $\Delta$ E187-E210 in lila) ähnlich zum WT (hellgrün)

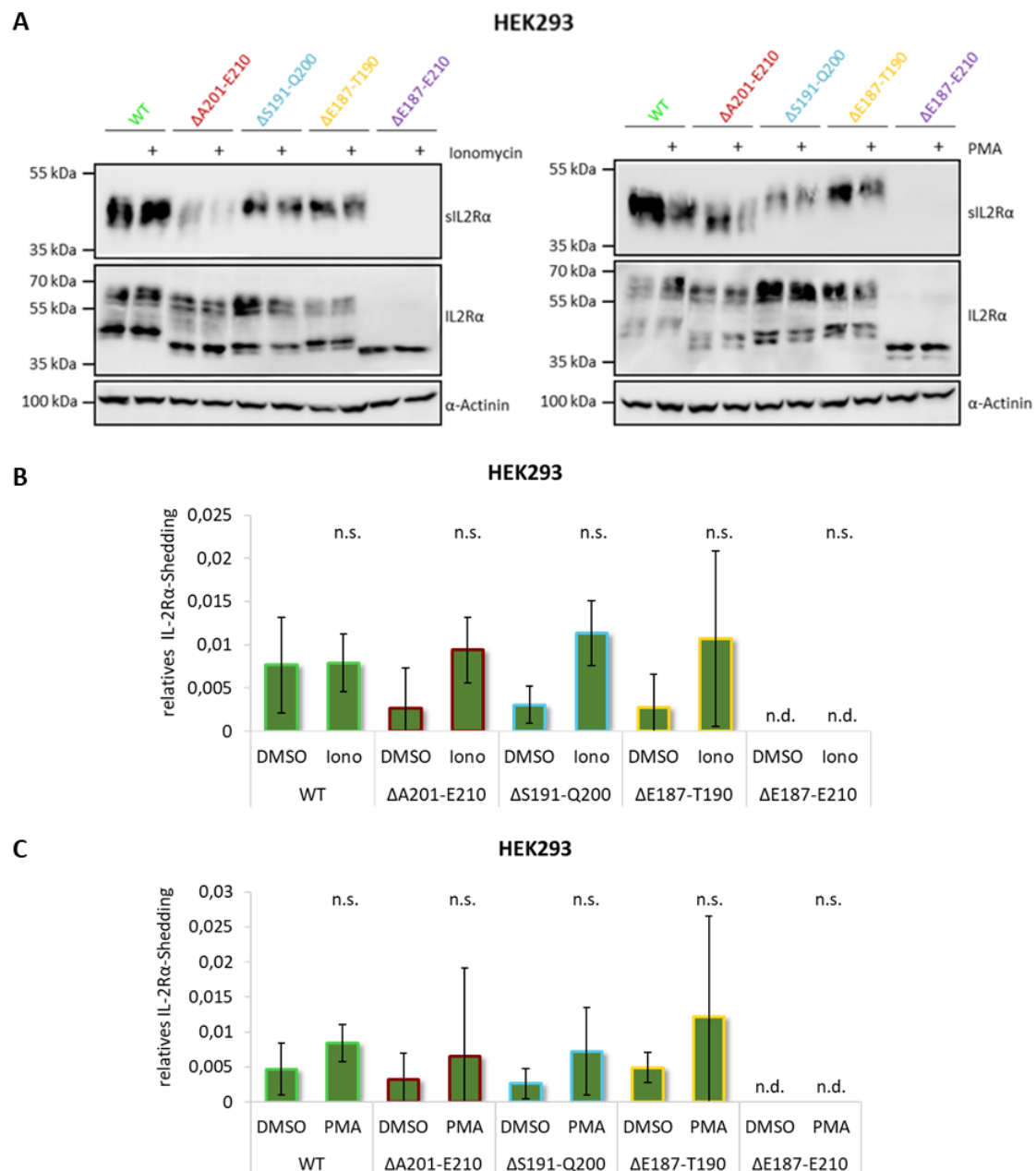
deutlich stärkere Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zur Negativkontrolle (grau) aufweisen, so dass hierbei von einer Expression aller untersuchten Rezeptor-Varianten auf der Zelloberfläche ausgegangen werden kann. Die Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) (Abb. 25C) zeigt zudem eine gleichermaßen intensive Fluoreszenz aller Rezeptor-Varianten im Vergleich zum WT, was einen Einfluss der membrandistalen Deletionen im *Stalk*-Bereich auf die Oberflächenexpression ausschließt.

Um schließlich potenzielle Schnittstellen von ADAM10 und ADAM17 im membrandistalen IL-2R $\alpha$ -*Stalk*-Bereich zu identifizieren, wurde das konstitutive Rezeptor-*Shedding* der membrandistalen  $\Delta$ -Varianten untersucht. Hierfür wurden erneut HEK293-Zellen transient mit den zu untersuchenden  $\Delta$ -Varianten transfiziert und 48 h nach Transfektion für weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Nach der Ernte der Zellen und Zellüberstände (s. Abschnitt 2.2.3.1) wurde das konstitutive *Shedding* mittels Western Blot und ELISA analysiert (Abb. 26). Die Western Blot-Analyse (Abb. 26A) zeigt deutlich, dass die Rezeptorvarianten  $\Delta$ A201-E210,  $\Delta$ S191-Q200 und  $\Delta$ E187-T190 bedingt durch die Deletionen geringfügig kleiner als der WT sind, dies jedoch das Rezeptor-*Shedding* nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei der Variante  $\Delta$ E187-E210 nicht nur mit etwa 35 kDa ein deutlich kleinerer Rezeptor verglichen mit dem WT, sondern zudem auch ein Einfluss auf das *Shedding*. Die Deletion der 24 membrandistalen AS führt dazu, dass kein löslicher IL-2R $\alpha$  entsteht, weder durch proteolytische Spaltung durch ADAM10 oder ADAM17 noch durch andere Mechanismen. Dies lässt darauf schließen, dass die Schnittstelle des IL-2R $\alpha$  innerhalb der 24 membrandistalen AS des *Stalk*-Bereichs liegen muss. Auch die quantitative Analyse in Abb. 26B bestärkt diese These, da bei der Variante  $\Delta$ E187-E210 kein *Shedding* detektiert werden konnte. Interessanterweise zeigt sich, dass die Variante  $\Delta$ A201-E210 im Vergleich zum WT signifikant mehr geschnitten wird, so dass hier bedingt durch die Deletion möglicherweise eine neue Schnittstelle entstanden ist, welche als Schnittstelle für ADAM10 oder ADAM17 fungiert. Die Varianten  $\Delta$ S191-Q200 und  $\Delta$ E187-T190 zeigen hingegen keinen Unterschied zum WT, so dass eine Lokalisation der Schnittstelle für ADAM10 und ADAM17 in diesen Bereichen ausgeschlossen werden kann.



**Abb. 26: Deletion der 24 membrandistalen AS in der IL-2Rα-Stalk-Region verhindert IL-2Rα-Shedding.** HEK293-Zellen wurden transient mit IL-2Rα oder den membrandistalen IL-2RαΔ-Varianten transfiziert. Die Analyse des konstitutiven *Shedding* der membrandistalen IL-2RαΔ-Varianten erfolgte mittels Western Blot (A) und ELISA (B). **A:** Western Blot-Analyse des konstitutiven *Shedding* der membrandistalen IL-2RαΔ-Varianten. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert und der lösliche Rezeptor im Überstand mithilfe der TCA-Fällung präzipitiert. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und per Western Blot analysiert. Das α-Actinin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten. Die Durchführung der Western Blot-Analyse erfolgte durch Doreen Medau (AG Garbers, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Magdeburg). **B:** ELISA zur Quantifizierung des konstitutiven *Shedding* der membrandistalen IL-2RαΔ-Varianten. Das Diagramm zeigt die relative *Shedding*-Rate des IL-2Rα und der untersuchten Δ-Varianten, die aus der Division des sIL-2Rα aus dem Überstand als Dividend und des IL-2Rα aus dem Lysat als Divisor berechnet wurde. Dargestellt sind die MW ± SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen IL-2RαΔ-Varianten und dem WT sind mit einem \* gekennzeichnet (\*:  $p < 0,05$ ), ausbleibende Signifikanzen sind mit „n.s.“ dargestellt. Nicht detektierbare Proben sind mit „n.d.“ gekennzeichnet.

Um auch hierbei Aufschluss darüber zu bekommen, ob die membrandistalen Deletionen das stimulierte *Shedding* beeinflusst, wurden erneut HEK293-Zellen mit den Expressionsplasmiden für die membrandistalen IL-2RαΔ-Varianten transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte für eine Stunde die Stimulation der Zellen mit Ionomycin zur ADAM10-Aktivierung oder für zwei Stunden mit PMA zur ADAM17-Aktivierung, bevor sie geerntet und für eine Western Blot-Analyse und ELISA zur Analyse des stimulierten *Shedding* (Abb. 27) vorbereitet wurden. Sowohl in den Western Blots (Abb. 27A) als auch in den ELISA-Diagrammen (Abb. 27B und C) ist kein Unterschied der einzelnen Δ-Varianten unter ADAM10- oder ADAM17-Aktivierung durch Ionomycin und PMA erkennbar. Die Deletionen im membrandistalen IL-2Rα-Stalk-Bereich scheinen somit keinen Einfluss auf das stimulierte *Shedding* mit Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 zu haben. Die Ergebnisse untermauern somit die These, dass die Schnittstelle für ADAM10 und ADAM17 nicht zwischen den AS A201 und E210, S191 und Q200 sowie E187 und T190 liegt.



**Abb. 27:** **ΔE187-E210** verhindert ADAM10- und ADAM17-stimuliertes IL-2Rα-Shedding. Mit den aufgeführten IL-2RαΔ-Varianten transfizierte HEK293-Zellen wurden für 1 h mit 1μM Ionomycin (A, links & B) oder 2 h mit 100 nM PMA (A, rechts & C) behandelt. Die Analyse des induzierten Shedding dieser IL-2RαΔ-Varianten erfolgte mittels Western Blot (A) und ELISA (B, C). **A:** Western Blot-Analyse des stimulierten Shedding der membrandistalen IL-2RαΔ-Varianten. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert und der lösliche Rezeptor im Überstand mithilfe der TCA-Fällung präzipitiert. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und per Western Blot analysiert. Das α-Actinin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist jeweils eines von vier unabhängigen Experimenten. Die Durchführung der Western Blot-Analyse erfolgte durch Doreen Medau (AG Garbers, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Magdeburg). **B & C:** ELISA zur Quantifizierung des induzierten Shedding der membrandistalen IL-2RαΔ-Varianten. Die Diagramme zeigen die relative Shedding-Rate des IL-2Rα-WT und der membrandistalen Δ-Varianten unter Behandlung mit Ionomycin (B) PMA (C). Die Shedding-Rate wurde aus der Division des sIL-2Rα aus dem Überstand als Dividend und des IL-2Rα aus dem Lysat als Divisor berechnet. Dargestellt sind die MW ± SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen stimulierten Proben und der jeweiligen Kontrolle festgestellt werden, was mit „n.s.“ dargestellt ist. Nicht detektierbare Proben sind mit „n.d.“ gekennzeichnet.

Dennoch ist deutlich, dass eine Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 mittels Ionomycin und PMA kein *Shedding* der Variante  $\Delta$ E187-E210 hervorrufen kann, so dass weder in der Western Blot-Analyse (Abb. 27A) noch im ELISA (Abb. 27B und C) löslicher Rezeptor im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden konnte. Dies verdeutlicht, dass bedingt durch die Deletion dieses Bereichs keine Schnittstelle für ADAM10 und ADAM17 vorhanden zu sein scheint und diese somit im deletierten Bereich zwischen den AS E187 und E210 liegen muss.

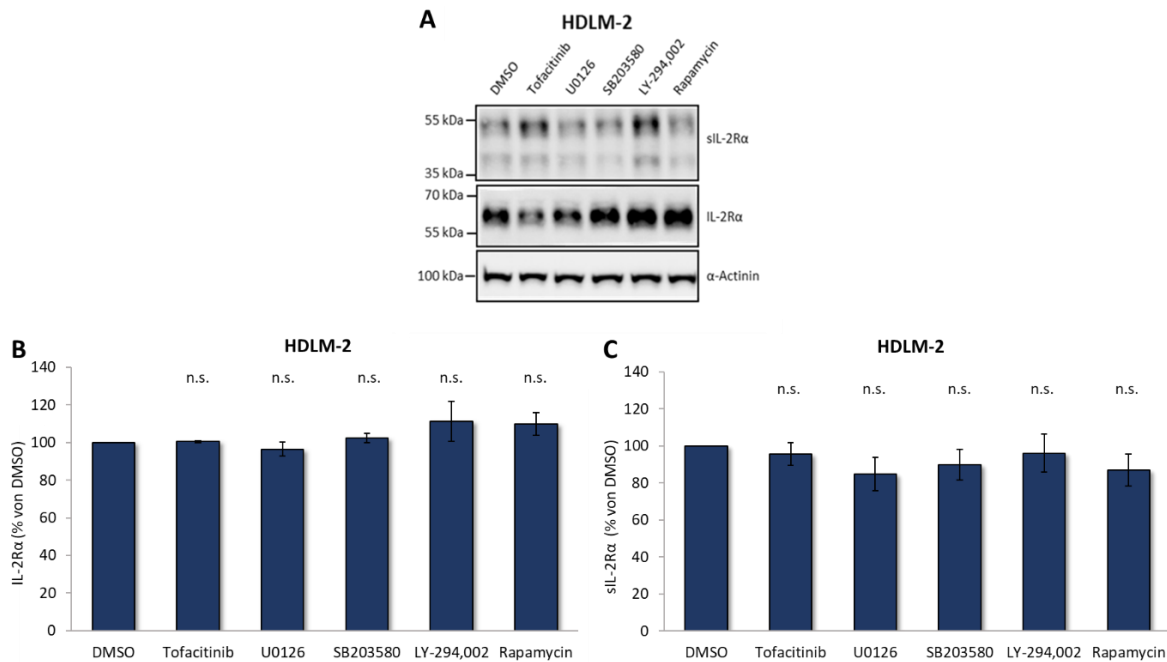
Die Ergebnisse zeigen, dass weder Deletionen von jeweils 10 AS im membranproximalen Bereich (s. Abschnitt 3.5) noch im membrandistalen Bereich einen Einfluss auf das IL-2R $\alpha$ -*Shedding* zeigten, wohingegen das Rezeptor-*Shedding* durch eine vollständige Deletion des *Stalk*-Bereichs sowie eine Deletion der membrandistalen 24 AS das Rezeptor-*Shedding* vollständig ausblieb. Obwohl Studien zeigen konnten, dass ADAM10 und ADAM17 ihre Substrate meist im membranproximalen Bereich schneiden (Scheller et al., 2011), deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass die Schnittstellen von ADAM10 und ADAM17 beim IL-2R $\alpha$  im membrandistalen Bereich liegen.

### **3.7. Blockierung von IL-2-Signalwegkomponenten hat keinen Einfluss auf das IL-2R $\alpha$ -*Shedding***

Durch Binden von IL-2 an den IL-2R werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die über den JAK/STAT5-, PI3K/Akt/mTOR- oder MAPK-Signalweg die Expression des IL-2R $\alpha$  oder des Transkriptionsfaktors FoxP3, aber auch die Zell-Proliferation und -Differenzierung regulieren (Benczik & Gaffen, 2004; Zorn et al., 2006; Busse et al., 2010; Liao et al., 2011a). IL-2 konnte als eines der Zytokine identifiziert werden, welches die Expression seines spezifischen Rezeptors über die Aktivierung von STAT5 und STAT3 sowie NF- $\kappa$ B selbst regulieren kann (Liao et al., 2013). Daher sollte untersucht werden, in wie weit der IL-2-Signalweg und die Inhibierung einzelner IL-2-Signalwegkomponenten die Expression und das *Shedding* des IL-2R $\alpha$  beeinflusst. Hierfür wurden HDLM-2-Zellen mit endogen exprimiertem IL-2R $\alpha$  verwendet und für 24 Stunden mit verschiedenen Signalweg-Inhibitoren behandelt. Verwendet wurden hierfür Tofacitinib zur Inhibierung von JAK1 und JAK3, U0126 als ERK-Inhibitor, SB203580 als MAPK-Inhibitor, LY-294,002 zur Blockierung von PI3K/Akt und Rapamycin zur mTOR-Inhibierung. Das konstitutive IL-2R $\alpha$ -*Shedding* wurde anschließend mittels Western Blot und ELISA analysiert wurde (Abb. 28).



Anhand der Western Blot-Analyse (Abb. 28A) geht hervor, dass die Inhibierungen von JAK1 und JAK3 durch Tofacitinib sowie ERK durch U0126 zu einer reduzierten Expression des IL-2R $\alpha$  im Zelllysate führt. Über einen positiven IL-2/IL-2R $\alpha$ -*feedback loop* kann die Expression des IL-2R $\alpha$  anhand des IL-2-Signalwegs reguliert und aufrechterhalten werden (Busse et al., 2010). Der JAK/STAT5-Signalweg ist dabei maßgeblich beteiligt und eine Inhibierung von JAK1 und JAK3 könnte somit eine reduzierte Expression hervorrufen.



**Abb. 28:** Inhibierung von IL-2-Signalwegkomponenten beeinflusst nicht das IL-2R $\alpha$ -Shedding in HDLM-2-Zellen. HDLM-2-Zellen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Signalweg-Inhibitoren (10  $\mu$ M Tofacitinib, 10  $\mu$ M U0126, 10  $\mu$ M SB203580, 4  $\mu$ M LY-294,002, 500 nM Rapamycin) oder DMSO als Kontrolle behandelt. Die Analyse des konstitutiven *Shedding* unter Behandlung der Inhibitoren erfolgte mittels Western Blot (A) und ELISA (B&C). **A:** Western Blot-Analyse des konstitutiven IL-2R $\alpha$ -Shedding in HDLM-2-Zellen unter Behandlung mit Signalweg-Inhibitoren. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert und der lösliche Rezeptor im Überstand mithilfe der TCA-Fällung präzipitiert. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und per Western Blot analysiert. Das  $\alpha$ -Actinin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten. **B&C:** ELISA zur Quantifizierung des IL-2R $\alpha$  in den Lysaten (B) und sIL-2R $\alpha$  in den Überständen (C) aus HDLM-2-Zellen unter der Behandlung mit Signalweg-Inhibitoren. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus jeweils drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten Proben und den jeweiligen DMSO-Kontrollen festgestellt werden, was mit „n.s.“ gekennzeichnet ist.

In der quantitativen Analyse in Abb. 28B kann die Beobachtung der reduzierten IL-2R $\alpha$ -Expression im Lysat jedoch nicht bestätigt werden. Interessanterweise scheint in der Western Blot-Analyse (Abb. 28A) die Menge an löslichem Rezeptor im Überstand bei Inhibierung von JAK1 und JAK3 verstärkt zu sein, was jedoch anhand der quantitativen Analyse in Abb. 28C nicht bestätigt werden kann. Eine Blockierung von JAK1 und JAK3 hat somit scheinbar keine Auswirkung auf die Aktivität von ADAM10 und ADAM17 und damit auf

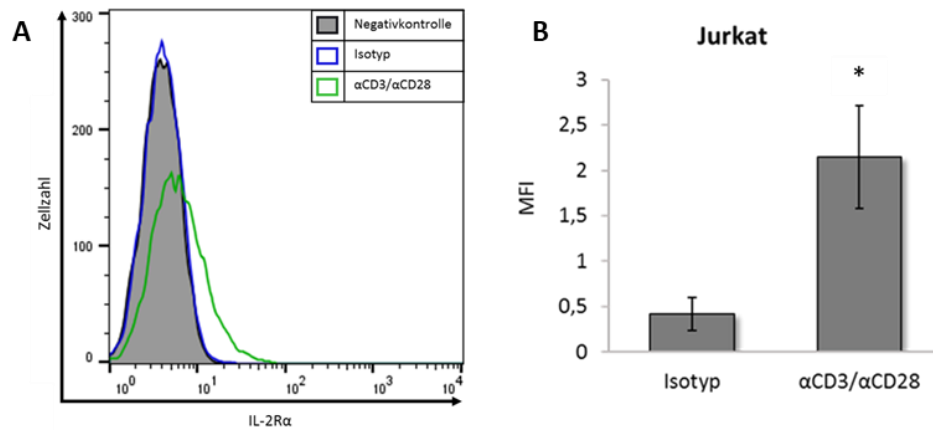
das *Shedding* des IL-2R $\alpha$ . Auch unter der Behandlung mit LY-294,002 zur Inhibierung von PI3K/Akt zeigt sich in der Western Blot-Analyse ein verstärktes *Shedding* (Abb. 28A), doch auch diese Beobachtungen können mittels quantitativer Analyse (Abb. 28C) nicht bestätigt werden. Hier zeigt sich, dass die Blockierung einzelner Signalwegkomponenten durch die verwendeten Inhibitoren weder die Expression des Rezeptors (Abb. 28B) noch die Menge an löslichem Rezeptor (Abb. 28C) beeinträchtigt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Blockierung einzelner Komponenten im IL-2-Signalweg weder die Expression des IL-2R $\alpha$  noch die Aktivität der verantwortlichen Proteasen und damit das *Shedding* des Rezeptors signifikant beeinflussen. Möglich könnte dies durch ein Ausweichen auf funktionale Signalwege bei Ausfällen einer Komponente im betroffenen Signalweg sein, um die Sicherstellung der Rezeptorexpression zu erhalten. Zudem kann eine Beteiligung anderer Mechanismen, die in HDLM-2-Zellen unabhängig von den IL-2-Signalwegen einen Einfluss auf die Expression und das *Shedding* des IL-2R $\alpha$  ausüben, nicht ausgeschlossen werden.

### **3.8. IL-2R $\alpha$ -*Shedding* in aktivierten T-Zellen ist ADAM10- und ADAM17-reguliert**

Der IL-2R $\alpha$  ist vor allem auf der Zelloberfläche von T<sub>reg</sub>-Zellen, in denen die Aktivierung von IL-2-Signalwegen einen essentiellen Faktor für die Zellfunktion darstellt, sowie auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach der Stimulation des T-Zell-Rezeptors exprimiert (Boyman & Sprent 2012; Spolski & Leonard, 2018). Berichten zufolge ruft die *in vitro*-Aktivierung eine verstärkte Expression des IL-2R $\alpha$  auf der Zelloberfläche von T-Zellen hervor (Ryffel et al., 1995; Shatrova et al., 2015). Um dies auch im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen und eine technische Grundlage für die nachfolgenden Experimente mit primären T-Zellen zu erarbeiten, wurden zunächst Jurkat-Zellen verwendet, eine humane T-Lymphozyten-Zelllinie. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben mittels  $\alpha$ CD3- und  $\alpha$ CD28-Antikörpern zur TCR-Aktivierung oder dem dazugehörigen Isotyp als Kontrolle behandelt und für 48 Stunden inkubiert. Die IL-2R $\alpha$ -Expression auf der Zelloberfläche wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 29). Im Histogramm in Abb. 29A ist erkennbar, dass aktivierte Zellen (dargestellt in grün) eine deutliche stärkere Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Isotyp (blau) und zur Negativkontrolle (grau) aufweisen, was eine eindeutig stärkere IL-2R $\alpha$ -Expression auf der Zelloberfläche nach der *in vitro*-Aktivierung darstellt und sich mit bereits

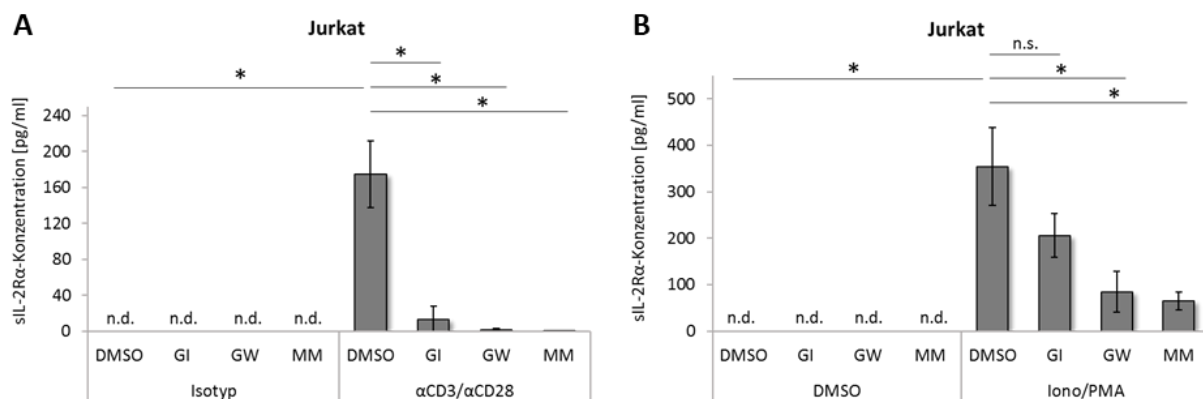
veröffentlichten Berichten (Ryffel et al., 1995; Shatrova et al., 2015) deckt. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität (Abb. 29B) aktivierter Zellen ist signifikant stärker als bei nicht-aktivierten Zellen, was auf eine deutlich erhöhte Oberflächenexpression des IL-2R $\alpha$  nach *in vitro*-Aktivierung der Zellen deutet.



**Abb. 29:** *In vitro*-Aktivierung von Jurkat-Zellen führt zu gesteigerter IL-2R $\alpha$ -Oberflächenexpression. Jurkat-Zellen wurden mittels  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 aktiviert bzw. mit entsprechender Isotyp-Kontrolle behandelt. Nach 48-stündiger Inkubation erfolgte die Oberflächenanalyse des IL-2R $\alpha$  mittels Durchflusszytometrie. **A:** Oberflächenanalyse des IL-2R $\alpha$  von aktivierten ( $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28, grün) und nicht-aktivierten (Isotyp, blau) Jurkat-Zellen. Als Negativ-Kontrolle (grau) wurden ungefärbte Jurkat-Zellen verwendet. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten. **B:** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von aktivierten und nicht-aktivierten Jurkat-Zellen. Das Diagramm zeigt die MW  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen aktivierter und nicht-aktivierter Probe sind mit einem \* gekennzeichnet (\*:  $p < 0,05$ ).

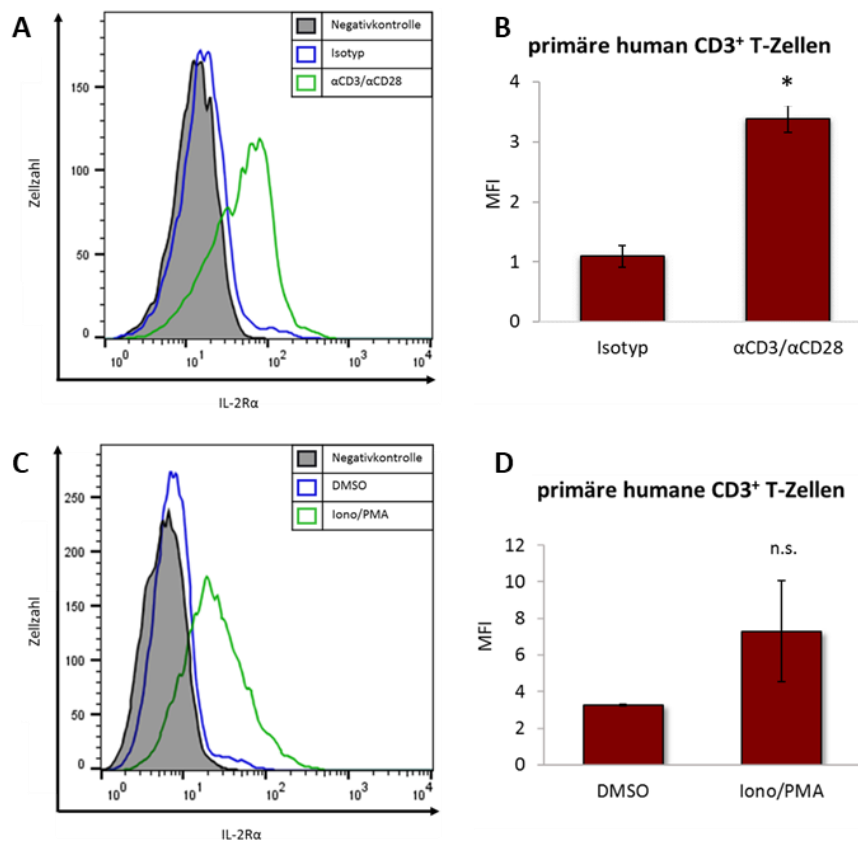
Frühere Berichte zeigen, dass die T-Zell-Aktivierung nicht nur eine erhöhte Expression des IL-2R $\alpha$  hervorruft (Rubin et al., 1985; Dik & Heron, 2020), sondern aktivierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zudem eine verstärkte Expression von ADAM10 und ADAM17 aufweisen (Briso et al., 2008). Um die Rolle von ADAM10 und ADAM17 in der Generierung des sIL-2R $\alpha$  bei T-Zell-Aktivierung zu untersuchen, wurden erneut Jurkat-Zellen wie in Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben *in vitro* aktiviert bzw. mit der Isotyp-Kontrolle behandelt oder mit Ionomycin und PMA oder DMSO als Kontrolle stimuliert. Ionomycin und PMA dienen dabei zur Stimulation von ADAM10 und ADAM17. Zusätzlich erfolgte eine Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Metalloprotease-Inhibitoren GI, GW und MM. Zellen, die mit DMSO behandelt wurden, dienten hierbei als Kontrolle. Mittels ELISA wurde die Menge an löslichem IL-2R $\alpha$  im Zellkulturüberstand untersucht (Abb. 30). Es zeigte sich, dass die *in vitro*-Aktivierung des TCR in Jurkat-Zellen (Abb. 30A) zu einer verstärkten sIL-2R $\alpha$ -Produktion führt, was sich mit Daten aus früheren Berichten deckt (Rubin et al., 1985). Die Behandlung mit den verschiedenen Metalloprotease-Inhibitoren reduzierte dabei das IL-2R $\alpha$ -Shedding

fast vollständig. Eine alleinige ADAM10-Blockierung zeigt zudem den gleichen Effekt wie eine Inhibierung aller Metalloproteasen, was ADAM10 damit auch als hauptverantwortliche Protease im IL-2R $\alpha$ -*Shedding* in aktivierten Jurkat-Zellen identifiziert. Interessanterweise ist nach der Stimulation der Zellen mit Ionomycin und PMA (Abb. 30B) eine sehr hohe Menge an löslichem IL-2R $\alpha$  detektierbar, was auf ein verstärktes *Shedding* bedingt durch die Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 durch Ionomycin und PMA schließen lässt. Die Behandlung mit den verschiedenen Protease-Inhibitoren zeigt dabei eine deutliche Verringerung der sIL-2R $\alpha$ -Produktion, wobei die GI-Behandlung keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle zeigt. Erklärbar wäre dies durch die Identifizierung von ADAM10 als die hier hauptverantwortliche Protease, die durch GI gehemmt ist, oder durch die kompensatorische Funktion von ADAM17, welche durch GI nicht blockiert wird.



**Abb. 30:** IL-2R $\alpha$ -*Shedding* wird in aktivierten Jurkat-Zellen durch Inhibierung von Metalloproteasen reduziert. Jurkat-Zellen wurden mittels  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 aktiviert bzw. mit entsprechender Isotyp-Kontrolle behandelt oder mit 1  $\mu$ M Ionomycin und 100 nM PMA bzw. DMSO als Kontrolle stimuliert. Nach 48-stündiger Inkubation und gleichzeitiger Behandlung mit GI, GW und MM bzw. DMSO als Kontrolle wurden die Zellen geerntet und die Menge an sIL-2R $\alpha$  im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Die Diagramme zeigen die Konzentration [in pg/ml] an sIL-2R $\alpha$  in den Überständen von aktivierten und nicht-aktivierten Zellen (A) sowie stimulierten und nicht-stimulierten Zellen (B) unter Einfluss der Behandlung mit Protease-Inhibitoren. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus fünf unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen Proben unter der Behandlung mit Protease-Inhibitoren und den jeweiligen DMSO-Kontrollen sind mit einem \* gekennzeichnet (\*:  $p < 0,05$ ), ausbleibende Signifikanzen sind mit „n.s.“ dargestellt. Nicht detektierbare Proben sind mit „n.d.“ gekennzeichnet.

Um die Beobachtungen nicht nur in einer T-Zelllinie zu untersuchen, wurde die Analyse des IL-2R $\alpha$ -*Shedding* auf primäre humane CD3<sup>+</sup> T-Zellen ausgeweitet. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben aus peripherem humanem Blut isoliert und anschließend mittels  $\alpha$ CD3 und  $\alpha$ CD28 *in vitro* aktiviert oder mit Ionomycin und PMA stimuliert (s. Abschnitt 2.2.2.6).

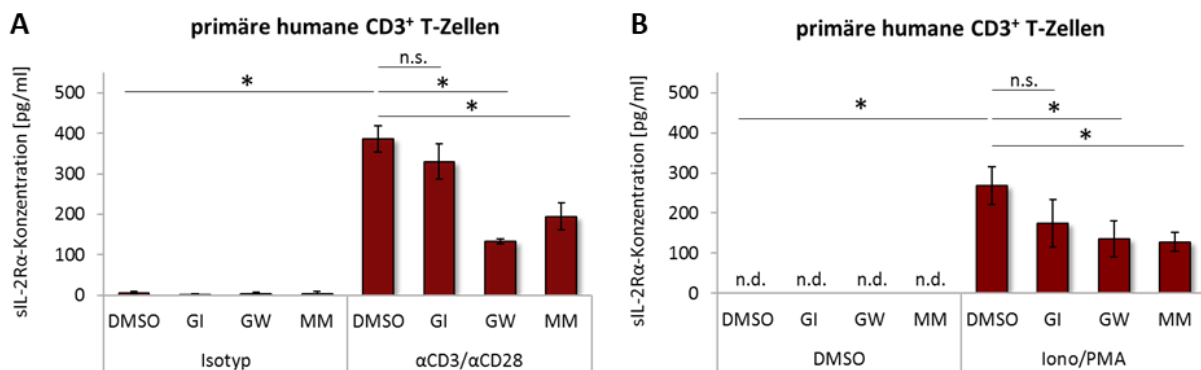


**Abb. 31:** *In vitro*-Aktivierung und Stimulation primärer humaner CD3<sup>+</sup> T-Zellen steigert die IL-2Rα-Oberflächenexpression. Aus Blut isolierte humane CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden mittels αCD3/αCD28 aktiviert bzw. mit entsprechender Isotyp-Kontrolle behandelt oder mit 1 μM Ionomycin und 100 nM PMA bzw. DMSO als Kontrolle stimuliert. Nach 48-stündiger Inkubation erfolgte die Oberflächenanalyse des IL-2Rα mittels Durchflusszytometrie. **A:** Oberflächenanalyse des IL-2Rα von aktivierten (αCD3/αCD28, grün) und nicht-aktivierten (Isotyp, blau) primären humanen CD3<sup>+</sup> T-Zellen. Als Negativkontrolle (grau) wurden ungefärbte Zellen verwendet. Dargestellt ist eines von vier unabhängigen Experimenten. **B:** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der aktivierten und nicht-aktivierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen. Das Diagramm zeigt die MW ± SD aus vier unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen aktivierter und nicht-aktivierter Probe sind mit einem \* gekennzeichnet (\*: p < 0,05). **C:** Oberflächenanalyse des IL-2Rα von stimulierten (Iono/PMA, grün) und nicht-stimulierten (DMSO, blau) primären humanen CD3<sup>+</sup> T-Zellen. Als Negativkontrolle (grau) wurden ungefärbte Zellen verwendet. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten. **D:** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der stimulierten und nicht-stimulierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen. Das Diagramm zeigt die MW ± SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen stimulierter und nicht-stimulierter Probe festgestellt werden, was mit „n.s.“ gekennzeichnet ist.

Die Analyse der IL-2Rα-Oberflächenexpression im Histogramm (Abb. 31) zeigt, dass sowohl die *in vitro*-Aktivierung (Abb. 31A, αCD3/αCD28 in grün, Isotyp-Kontrolle in blau, Negativkontrolle in grau) als auch die Stimulation mit Ionomycin und PMA (Abb. 31C, Iono/PMA in grün, DMSO-Kontrolle in blau, Negativkontrolle in grau) zu einer deutlichen stärkeren Fluoreszenzintensität führt und damit eine gesteigerte IL-2Rα-Expression auf der Zelloberfläche darstellt. Anhand der Quantifizierung der MFIs ist erkennbar, dass die T-Zell-Aktivierung (Abb. 31B) signifikant erhöhte Signale in der Fluoreszenzintensität hervorruft.

Auch die Stimulation der Zellen mit Ionomycin und PMA (Abb. 31D) ruft eine Tendenz zu erhöhten Signalen der Fluoreszenzintensität hervor, diese zeigt jedoch keine statistische Signifikanz.

Im nächsten Schritt erfolgte nach gleichem Protokoll wie bei den Jurkat-Zellen eine Behandlung der isolierten primären CD3<sup>+</sup> T-Zellen mit den verschiedenen Protease-Inhibitoren GI, GW und MM. Hierfür wurden die Zellen wie zuvor aktiviert und stimuliert (s. Abschnitt 2.2.2.6) und zeitgleich mit den Protease-Inhibitoren behandelt, bevor die Menge an sIL-2R $\alpha$  in den Zellkulturüberständen mittels ELISA gemessen wurde (Abb. 32). Erkennbar ist hierbei, dass sowohl die T-Zell-Rezeptor-Aktivierung (Abb. 32A) als auch die Stimulation mit Ionomycin und PMA (Abb. 32B) zu signifikant erhöhten Mengen an sIL-2R $\alpha$  führen.



**Abb. 32: ADAM10 und ADAM17 sind Hauptregulatoren des IL-2R $\alpha$ -Shedding in primären humanen CD3<sup>+</sup> T-Zellen.** Aus Blut isolierte humane CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden mittels  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 aktiviert bzw. mit entsprechender Isotyp-Kontrolle behandelt oder mit 1  $\mu$ M Ionomycin und 100 nM PMA bzw. DMSO als Kontrolle stimuliert. Nach 48-stündiger Inkubation und gleichzeitiger Behandlung mit 3  $\mu$ M GI, 3  $\mu$ M GW und 10  $\mu$ M MM bzw. DMSO als Kontrolle wurden die Zellen geerntet und die Menge an sIL-2R $\alpha$  im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Die Diagramme zeigen die Konzentration [in pg/ml] an sIL-2R $\alpha$  in den Überständen von aktivierten und nicht-aktivierten Zellen (A) sowie stimulierten und nicht-stimulierten Zellen (B) unter Einfluss der Behandlung mit Protease-Inhibitoren. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten, die von Dr. Juliane Lokau (AG Garbers, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Magdeburg) durchgeführt wurden. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen Proben unter der Behandlung mit Protease-Inhibitoren und den jeweiligen DMSO-Kontrollen sowie Unterschiede zwischen den  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 bzw. Iono/PMA-Proben und den Isotyp- bzw. DMSO-Kontrollen sind mit einem \* gekennzeichnet (\*:  $p < 0,05$ ), ausbleibende Signifikanzen sind mit „n.s.“ dargestellt. Nicht detektierbare Proben sind mit „n.d.“ gekennzeichnet.

Ähnlich zu den Beobachtungen in Jurkat-Zellen führt die Inhibierung der Metalloproteasen zu einem signifikant verringertem *Shedding*, wobei es in CD3<sup>+</sup> T-Zellen nicht vollständig inhibiert wird. Auffällig ist hierbei zudem, dass die alleinige Inhibierung von ADAM10 mithilfe von GI in CD3<sup>+</sup> T-Zellen keinen signifikanten Einfluss auf das IL-2R $\alpha$ -Shedding hat. Nur die

gemeinsame Blockierung von ADAM10 und ADAM17 durch GW oder die Breitband-Inhibierung von Metalloproteasen mittels MM zeigt signifikant reduzierende Effekte auf die Produktion des sIL-2R $\alpha$ .

Diese Ergebnisse zeigen, dass in aktivierten primären T-Zellen ADAM17 eine essentielle Protease im IL-2R $\alpha$ -*Shedding* ist. Die Beteiligung anderer Mechanismen in der Produktion des sIL-2R $\alpha$  in humanen T-Zellen kann hierbei jedoch nicht ausgeschlossen werden.

### 3.9. Der sIL-2R $\alpha$ inhibiert STAT5-Phosphorylierung in naiven T-Zellen

Obwohl der lösliche IL-2R $\alpha$  seit Mitte der 1980er Jahre untersucht wird (Rubin et al., 1985; Symons et al., 1988; Viviani et al., 1998) ist seine biologische Funktion bis heute nicht vollständig geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Funktion der sIL-2R $\alpha$  auf den IL-2-Signalweg in T-Zellen hat. Hierfür wurden humane CD3<sup>+</sup> T-Zellen wie im Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben aus humanem Blut isoliert und mittels  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 *in vitro* aktiviert bzw. mit der Isotyp-Kontrolle behandelt (s. Abschnitt 2.2.2.6), bevor eine Stimulation mit IL-2 und steigenden Konzentrationen rekombinanten sIL-2R $\alpha$  erfolgte. Wie in Abb. 33 (linke Seite) erkennbar ist, führt die IL-2-Stimulation naiver CD3<sup>+</sup> T-Zellen zu verstärkter STAT5-Phosphorylierung. Dieser Effekt ist jedoch deutlich reduziert, wenn IL-2 zeitgleich mit 1  $\mu$ g/ml sIL-2R $\alpha$  inkubiert wurde oder sogar vollständig inhibiert, wenn eine Inkubation mit 10  $\mu$ g/ml sIL-2R $\alpha$  erfolgte.



**Abb. 33:** Löslicher IL-2R $\alpha$  inhibiert IL-2-Signalweg in naiven humanen CD3<sup>+</sup> T-Zellen. Aus humanem Blut isolierte CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden für 48 Stunden mittels  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 aktiviert oder mit entsprechender Isotyp-Kontrolle behandelt und anschließend für 30 min in vorbereiteten Ansätzen mit 5 ng/ml IL-2 sowie steigenden Konzentrationen (0  $\mu$ g/ml, 0,1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml) rekombinanten sIL-2R $\alpha$  inkubiert. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert und 20  $\mu$ g des Proteinlysats mittels Western Blot auf STAT5 und pSTAT5 untersucht. Das GAPDH wurde als Ladekontrolle detektiert. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten.

In aktivierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen hingegen (Abb. 33, rechte Seite) zeigt die Stimulation mit IL-2 und sIL-2R $\alpha$  keinen Effekt. Der Grund hierfür könnte in der TCR-Aktivierung liegen, die nicht nur zur Sekretion von IL-2, sondern auch anderer STAT5-aktivierender Zytokine führt. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass der sIL-2R $\alpha$  antagonistische Effekte auf den IL-2-Signalwege in CD3<sup>+</sup> T-Zellen ausübt.

### **3.10. ADAM10 ist am IL-2R $\alpha$ -Shedding *in vivo* beteiligt**

Schließlich sollte untersucht werden, ob das ADAM10- oder ADAM17-regulierte IL-2R $\alpha$ -Shedding *in vivo* in der *steady-state* Produktion des sIL-2R $\alpha$  involviert ist. Hierfür wurden die Seren von Mäusen mit verschiedenen Defizienzen an Metalloproteasen oder Metalloprotease-Inhibitoren mittels ELISA auf die Menge an sIL-2R $\alpha$  untersucht (Abb. 34).

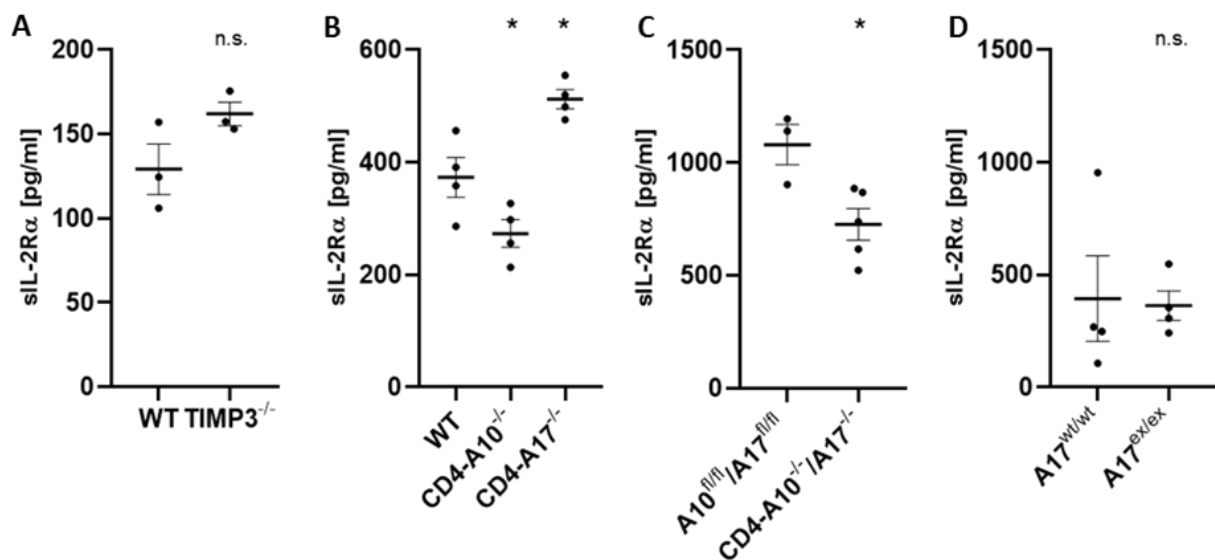
In Abb. 34A ist die gemessene Konzentration an löslichem IL-2R $\alpha$  im Serum von TIMP3<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen gezeigt. TIMP3 ist bekannt als ein physiologischer Inhibitor von ADAM10 und ADAM17, der aber auch eine Vielzahl anderer Metalloproteasen blockiert (Amour et al., 1998; Amour et al., 2000; Jackson et al., 2017). Die gemessenen sIL-2R $\alpha$ -Konzentrationen der beiden Testgruppen zeigen keine signifikanten Unterschiede, was darauf schließen lässt, dass die konstitutive sIL-2R $\alpha$ -Produktion in Mäusen nicht nur über TIMP3-sensitive Mechanismen reguliert wird.

Im nächsten Schritt sollte analysiert werden, in wie weit speziell ADAM10 und ADAM17 an der Regulierung des sIL-2R $\alpha$ -Levels im Serum von Mäusen beteiligt sind. Da T-Zellen als Hauptquelle des löslichen IL-2R $\alpha$  gelten, wurde das Serum von Mäusen untersucht, die entweder eine spezifische Defizienz für ADAM10 oder ADAM17 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufwiesen. Es zeigte sich, dass das Fehlen von ADAM10 die Serumkonzentration an sIL-2R $\alpha$  im Vergleich zu den Seren der WT-Tiere verringert (Abb. 34B) und ADAM10 somit als mitverantwortliche Protease im IL-2R $\alpha$ -Shedding *in vivo* identifiziert werden kann. Im Gegensatz dazu führt eine CD4<sup>+</sup> T-Zell-spezifische ADAM17-Defizienz zu einem erhöhten Level an sIL-2R $\alpha$  (Abb. 34B), so dass eine Beteiligung dieser Protease am konstitutiven IL-2R $\alpha$ -Shedding in Mäusen ausgeschlossen werden kann. Der Anstieg der Konzentration ist möglicherweise auf eine erhöhte kompensatorische Rolle von ADAM10 in ADAM17-Abwesenheit zurückzuführen. Anderen Studien zufolge konnte in B-Zellen bei ADAM10-Abwesenheit ein kompensatorischer Anstieg der ADAM17-Aktivität beobachtet werden (Folgosa et al., 2013). Diese Beobachtungen decken sich mit vorherigen Ergebnissen, die einen Anstieg des IL-2R $\alpha$ -



*Shedding* in HEK293 mit ADAM17-Defizienz zeigten (Abb. 13B), welcher auf eine kompensatorische Funktion von ADAM10 hindeutet. Die kompensatorische Funktion von ADAM10 in Abwesenheit von ADAM17 scheint somit unabhängig von Spezies und Zelltyp zu sein.

Um weiterführend die einzelnen Rollen von ADAM10 und ADAM17 im konstitutiven IL-2R $\alpha$ -*Shedding* genauer zu untersuchen, wurden die IL-2R $\alpha$ -Serumkonzentration von Mäusen gemessen, denen beide Proteasen auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen fehlten (Abb. 34C). Es zeigte sich, dass die Konzentration an sIL-2R $\alpha$  im Serum der CD4-A10<sup>-/-</sup>/A17<sup>-/-</sup>-Mäuse gegenüber den A10<sup>fl/fl</sup>/A17<sup>fl/fl</sup>-Mäusen verringert ist. Da dies bereits in CD4-A10<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet werden konnte (Abb. 34B), kann darauf geschlossen werden, dass ADAM7 nicht synergistisch wirkt, sondern nur in Abwesenheit von ADAM10 am IL-2R $\alpha$ -*Shedding* beteiligt ist. Da der beobachtete Anstieg an sIL-2R $\alpha$  bei einem ADAM17-Knockout zudem nicht mehr bei einem doppelten ADAM10/ADAM17-Knockout nachgewiesen werden konnte, wird die These bestärkt, dass der Anstieg auf eine erhöhte ADAM10-Aktivität zurückzuführen ist.



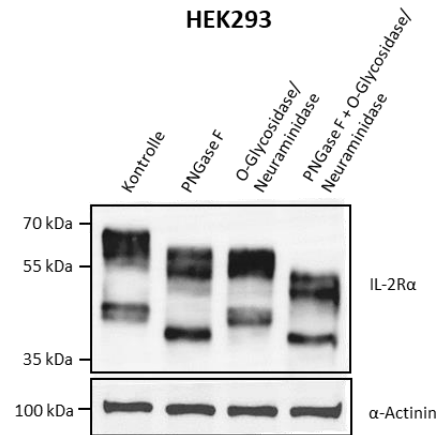
**Abb. 34:** **IL-2R $\alpha$ -*Shedding* in vivo ist ADAM10-reguliert.** Die Konzentration an sIL-2R $\alpha$  aus den Seren von jeweils drei Timp3<sup>-/-</sup> und WT-Mäusen (A), jeweils vier CD4-A10<sup>-/-</sup>, CD4-A17<sup>-/-</sup> und entsprechenden WT-Mäusen (B), fünf CD4-A10<sup>-/-</sup>/A17<sup>-/-</sup> und drei A10<sup>fl/fl</sup>/A17<sup>fl/fl</sup>-Mäusen (C) sowie jeweils drei A17<sup>ex/ex</sup> und A17<sup>wt/wt</sup>-Mäusen (D) wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD der analysierten Proben sowie die einzelnen Datenpunkte. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen sind mit einem \* gekennzeichnet (\*:  $p < 0,05$ ), ausbleibende Signifikanzen sind mit „n.s.“ dargestellt. Die Messungen und statistischen Analysen wurde von Dr. Juliane Lokau (AG Garbers, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Magdeburg) durchgeführt.

Um diese Beobachtungen zu vertiefen, wurde schließlich das Serum von hypomorphen ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Mäusen untersucht, die im Vergleich zu WT-Mäusen nur etwa 5 % der Menge an ADAM17 besitzen (Chalaris et al., 2010). Erkennbar ist hier, dass die ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Mäuse ein ähnliches Serumlevel an sIL-2R $\alpha$  aufweisen wie die ADAM17<sup>wt/wt</sup>-Mäuse (Abb. 34D), so dass die Ergebnisse bestätigen, dass ADAM17 bei ADAM10-Anwesenheit nicht am konstitutiven IL-2R $\alpha$ -*Shedding* in Mäusen beteiligt ist.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass ADAM10 die hauptverantwortliche Protease in der Regulation des sIL-2R $\alpha$ -Levels in Mäusen ist, wobei ein CD4-spezifischer ADAM10-Knockout nicht zum vollständigen Verlust von sIL-2R $\alpha$  führt, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht die einzige Quelle von konstitutiv zirkulierendem sIL-2R $\alpha$  sind oder noch eine andere Protease *in vivo* beteiligt ist.

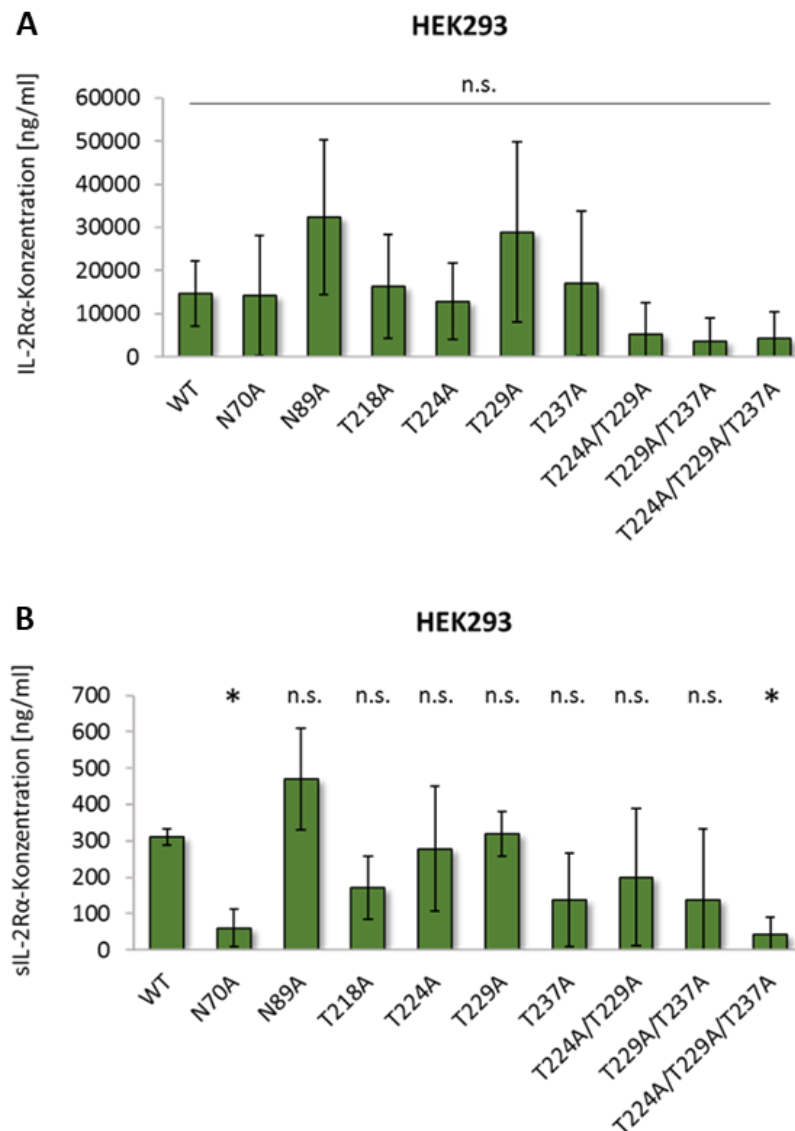
### **3.11. Rezeptor-Glykosylierungen beeinflussen bedingt das IL-2R $\alpha$ -*Shedding***

Früheren Berichten zufolge besitzt der IL-2R $\alpha$  sechs Glykosylierungsstellen mit kovalent an Asparagin oder Serin- bzw. Threoninketten gebundenen Glykanen (Miedel et al., 1988). Es sollte zunächst untersucht werden, ob die Glykosylierungsstellen besetzt sind und ob diese schließlich einen Einfluss auf das IL-2R $\alpha$ -Ektodomänen-*Shedding* haben. Hierfür wurden transient mit IL-2R $\alpha$  transfizierte HEK293-Zellen (s Abschnitt 2.2.2.4) nach Abschnitt 2.2.3.5 mit PNGase F zur Entfernung vorhandener N-Glykane oder mit O-Glycosidase und Neuraminidase zur Entfernung von O-Glykanen behandelt. Zur Analyse der Deglykosylierung wurden die Proben mittels Western Blot auf den IL-2R $\alpha$  untersucht (Abb. 35). Erkennbar ist hierbei, dass der Rezeptor nach der Behandlung mit PNGase F ein deutlich geringeres Molekulargewicht als die Kontrolle aufweist, was auf gebundene N-Glykane schließen lässt, welche durch die PNGase F abgespalten wurden. Auch die Behandlung mit O-Glycosidase und Neuraminidase führt zu einer verringerten Rezeptorgröße, so dass auch hierbei von gebundenen O-Glykanen ausgegangen wird, die durch die Behandlung entfernt wurden. Eine kombinierte Behandlung von PNGase F mit O-Glycosidase und Neuraminidase zeigt schließlich einen nochmals kleineren Rezeptor als die einzeln behandelten Zellen und die Kontrolle. Anhand dieser Ergebnisse kann bestätigt werden, dass der IL-2R $\alpha$  besetzte Glykanbindungsstellen hat und sowohl N- als auch O-Glykanen aufweist.



**Abb. 35: Deglykosylierung des IL-2R $\alpha$ .** Transient transfizierte HEK293-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert und 30  $\mu$ g des Proteinlysats mittels Glyco Denaturation Buffer denaturiert. Nach Zugabe der PNGase F zur Entfernung der N-Glykane und/oder der O-Glycosidase und Neuraminidase zur Abspaltung von O-Glykanen wurden die Proben über Nacht inkubiert. Es wurden 25  $\mu$ l der mit Laemmli-puffer aufgekochten Proben per Western Blot auf die verschiedenen deglykosylierten IL-2R $\alpha$ -Varianten untersucht. Das  $\alpha$ -Actinin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist eines von vier unabhängigen Experimenten.

Da festgestellt werden konnte, dass der IL-2R $\alpha$  über besetzte Glykanbindungsstellen verfügt, sollte der Einfluss dieser N- und O-Glykane auf das IL-2R $\alpha$ -Ektodomänen-*Shedding* untersucht werden. Hierfür wurden HEK293-Zellen wie in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben transient mit verschiedenen Expressionsplasmiden transfiziert, die für den IL-2R $\alpha$  mit verschiedenen Punktmutationen codieren. Die Plasmide für die IL-2R $\alpha$ -Glykanvarianten wurden zuvor von Amelie Hagedorn (AG Garbers, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Magdeburg) im Rahmen einer Masterarbeit kloniert (Hagedorn, 2021) und zur Verfügung gestellt. In diesen Rezeptorvarianten wurden die AS Asparagin (N) an den Stellen N70 und N89 bzw. Threonin (T) an den Stellen T218, T224, T229 und T237 durch Alanin (A) ersetzt. Das Alanin stellt im Gegensatz zu Asparagin und Threonin keine Bindungsstelle für Glykane dar, so dass am IL-2R $\alpha$  an den jeweiligen Stellen das Glykan fehlt und so untersucht werden kann, welche Rolle die einzelnen Glykane beim *Shedding* des IL-2R $\alpha$  spielen. Bei drei weiteren Varianten sind kombinierte Mutationen an den Stellen T224/T229 (T224A/T229A), T229/T237 (T229A/T237A) oder eine dreifache Mutation an den Stellen T224, T229 und T237 (T224A/T229A/T237A) enthalten (s. Abschnitt 2.1.11). Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion für weitere 24 Stunden mit serumfreiem Medium inkubiert, bevor sie geerntet und das konstitutive *Shedding* mittels ELISA analysiert wurde.



**Abb. 36:** **IL-2R $\alpha$ -Shedding wird durch Fehlen der N70-Glykosylierung und der T224/T229/T237-O-Glykane reduziert.** Mit den verschiedenen IL-2R $\alpha$ -Glykanvarianten transfizierte HEK293-Zellen wurden mit serumfreiem Medium versetzt und nach 24 h Inkubation geerntet. Die Menge an IL-2R $\alpha$  im Zelllysate sowie die Konzentration des sIL-2R $\alpha$  im Überstand wurden mittels ELISA quantifiziert. Die Diagramme zeigen die Konzentration in ng/ml des IL-2R $\alpha$  aus dem Lysat (A) und des sIL-2R $\alpha$  aus dem Überstand (B). Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen den IL-2R $\alpha$ -Glykanvarianten und dem WT sind mit einem \* gekennzeichnet (\*:  $p < 0,05$ ), ausbleibende Signifikanzen sind mit „n.s.“ dargestellt.

In Abb. 36A sind die Konzentrationen an IL-2R $\alpha$  aus den Zelllysaten dargestellt. Erkennbar ist hierbei, dass einige Varianten zwar Tendenzen zu einer verstärkten oder verringerten Expression im Lysat haben, sich jedoch im Mittel nicht signifikant zum WT unterscheiden.

Die Menge an sIL-2R $\alpha$  im Überstand (Abb. 36B) der jeweiligen Proben zeigt hingegen deutlich, dass die Variante N70A im Vergleich zum WT ein signifikant reduziertes *Shedding* aufweist. Dies lässt darauf schließen, dass das Glykan an der Position N70 das *Shedding* des

IL-2R $\alpha$  maßgeblich beeinflusst und die Abwesenheit dieses Glykans das Rezeptor-*Shedding* signifikant verringert. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Beobachtungen, die zudem bedingt durch das reduzierte *Shedding* eine verstärkte Expression dieser Rezeptorvariante auf der Zelloberfläche nachweisen konnten (Hagedorn, 2021).

Interessanterweise zeigt die kombinierte Mutation der drei O-Glykane an den Positionen T224, T229 und T237 ein signifikant reduziertes Rezeptor-*Shedding*, wohingegen bei den Mutationen der einzelnen Stellen kein Einfluss auf das *Shedding* nachgewiesen werden kann. Dies lässt darauf schließen, dass die Abwesenheit einzelner O-Glykane keine maßgebliche Rolle im Rezeptor-*Shedding* spielt, das Fehlen aller drei O-Glykane hingegen das *Shedding* des IL-2R $\alpha$  erkennbar reduziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass der IL-2R $\alpha$  gebundene Glykane aufweist, deren Einfluss auf das Rezeptor-*Shedding* untersucht werden sollte. Es konnte beobachtet werden, dass das Fehlen des Glykans an der Stelle N70 das *Shedding* reduziert ist, was auf eine entscheidende Funktion dieses N-Glykans im IL-2R $\alpha$ -*Shedding* hindeutet. Das Glykan an der Stelle N89 sowie die einzelnen O-Glykane scheinen im Gegensatz dazu keinen Einfluss zu haben, wohingegen die Abwesenheit aller drei O-Glykane das IL-2R $\alpha$ -*Shedding* signifikant beeinträchtigt. Für eindeutigere Ergebnisse zum Einfluss der Glykane im IL-2R $\alpha$ -*Shedding* sind jedoch noch weiterführende Experimente notwendig.

## 4. Diskussion

### 4.1. Der IL-2/IL-2R-Signalweg

Interleukin-2 (IL-2) stellt eines der am meisten untersuchten Zytokine dar und gilt als Hauptregulator des Immunsystems, welcher für eine Vielzahl an Funktionen verschiedener Immunzellen verantwortlich (Morgan et al., 1967; Siegel et al., 1987; Hunter, 2005; O'Shea et al., 2019; Leonard et al., 2019) und essentiell für die Funktion regulatorischer T-Zellen ist (Fontenot et al., 2005; Waldmann, 2006; Malek & Castro, 2010; Li & Rudensky, 2016). Die Wirkung von IL-2 wird über die Bindung an den spezifischen IL-2-Rezeptor induziert, der sich aus verschiedenen Kombinationen der Untereinheiten IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  und  $\gamma_c$  zusammensetzt (Kim et al., 2006; Lin & Leonard, 2000; Malek & Castro, 2010). Während der IL-2R $\alpha$  das essentielle Element zur effizienten Ligandenbindung ist (Lorenzen et al., 2006; Boyman & Sprent, 2012), sind IL-2R $\beta$  und  $\gamma_c$  die notwendigen Faktoren für die Aktivierung der intrazellulären Signalwege (Nakamura et al., 1994; Nelson et al., 1994). Kommt es zur Interaktion von IL-2 mit dem IL-2R-Komplex, werden intrazelluläre Signalwege wie JAK/STAT, MAPK und PI3K/Akt aktiviert, welche Zellproliferation, Differenzierung und Zellüberleben regulieren (Minami & Taniguchi, 1995; Gaffen, 2001; Waldmann, 2006; Malek, 2008; Leonard et al., 2019). Bereits 1985 konnte für die  $\alpha$ -Untereinheit des IL-2-Rezeptors eine lösliche Form identifiziert werden, deren Quelle hauptsächlich aktivierte T-Zellen sind (Rubin et al., 1985). Der genaue Mechanismus zur Generierung des löslichen IL-2R $\alpha$  und seine biologische Funktion konnten jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt werden, so dass das Ziel der Arbeit die Untersuchung des IL-2R $\alpha$ -Ektodomänen-*Shedding* und die Identifizierung der verantwortlichen Proteasen zur Generierung des sIL-2R $\alpha$  sowie die Untersuchung der biologischen Funktion des löslichen Rezeptors war.

Aufgrund fehlender Hinweise auf ein alternatives *Splicen* des *IL2RA*-Gens (Rubin et al., 1990; Damoiseaux, 2020) wird angenommen, dass der lösliche IL-2R $\alpha$  über Proteolyse des membranständigen IL-2R $\alpha$  generiert wird. Neben Enzymen wie Neutrophile Elastase, PR3, MMP-9 oder Der p 1, die in der Lage sind den IL-2R $\alpha$  zu schneiden (Schulz et al., 1998; Bank et al., 1999; Sheu et al., 2001; El Houda Agueznay et al., 2007; Yang et al., 2011), sind viele Proteasen der ADAM-Familie in der Lage, Zytokinrezeptoren zu spalten (Edwards et al., 2008; Scheller et al., 2011). Besonders ADAM10 und ADAM17 konnten als wichtige *Sheddasen* identifiziert werden, deren Vielzahl an Substraten entweder von einer der beiden

Proteasen oder sogar durch beide Proteasen gespalten werden können (Scheller et al., 2011; Wetzel et al., 2017). Während ADAM10 unter anderem für die Aktivierung des Notch-Signalweges verantwortlich und damit maßgeblich an der Embryonalentwicklung beteiligt ist (Hartmann et al., 2002; Weber & Saftig, 2012), gilt ADAM17 unter anderem als verantwortliche Protease für die Spaltung von EGFR-Liganden (Peschon et al., 1998; Zunke & Rose-John, 2017). Beiden Proteasen konnte jedoch eine weitere Rolle als kritische Faktoren in der Zytokin-Signaltransduktion und der Funktion von Immunzellen zugeordnet werden (Lambrecht et al., 2018). Bisher konnten beispielsweise der IL-1R2, IL-6R und M-CSFR (*Macrophage colony-stimulating factor receptor*) als Zytokinrezeptoren identifiziert werden, die Substrate von ADAM10 und ADAM17 sind (Reddy et al., 2000; Matthews et al., 2003; Rose-John et al., 2007; Uchikawa et al., 2015; Lorenzen et al., 2016), nun sollte untersucht werden, ob die beiden Proteasen auch in das *Shedding* des IL-2R $\alpha$  involviert sind.

#### **4.2. Identifizierung des IL-2R $\alpha$ als Substrat von ADAM10 und ADAM17**

Um zu untersuchen, ob das *Shedding* des IL-2R $\alpha$  durch ADAM-Proteasen, im Speziellen durch ADAM10 und ADAM17 ermöglicht wird, wurden zunächst Zelllinien mit heterologem oder endogenem IL-2R $\alpha$  untersucht. Die Behandlungen der Zellen mit verschiedenen Protease-Inhibitoren machten deutlich, dass vor allem Metalloproteasen, insbesondere ADAM10 und ADAM17, eine wichtige Rolle in der konstitutiven Produktion von löslichem IL-2R $\alpha$  spielen. Obwohl frühere Studien zeigten, dass die Serinproteasen Neutrophile Elastase und PR3 (Bank et al., 1999) sowie auch die Cysteinprotease Der p 1 (Schulz et al., 1998) in der Lage sind, den IL-2R $\alpha$  zu schneiden, zeigte eine Inhibierung von Serin- und Cysteinproteasen in den hier untersuchten kultivierten Zellen keinen Effekt, was möglicherweise auf eine fehlende Expression dieser Proteasen in den untersuchten Zellen zurückzuführen ist. Ob ein ähnlicher Effekt durch Cystein- oder Serinproteasen in humanen T-Zellen erkennbar ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer untersucht, eine zelltypspezifische *Shedding*-Aktivität der Proteasen kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Die Verwendung eines Breitband-Inhibitors für Metalloproteasen sollte Aufschluss darüber geben, ob Metalloproteasen im IL-2R $\alpha$ -*Shedding* involviert sind. Hierbei zeigte sich, dass die Produktion des sIL-2R $\alpha$  in Zellen unter der Inhibierung der Metalloproteasen reduziert ist, was auf eine Beteiligung einer oder mehrerer Metalloproteasen in der Proteolyse des IL-2R $\alpha$  schließen lässt. Bei der Präzisierung, ob dabei möglicherweise ADAM10 und/oder ADAM17

eine wichtige Rolle spielen, zeigte sich, dass eine ADAM10-Abwesenheit oder die alleinige ADAM10-Blockierung ähnliche Effekte wie die Breitband-Inhibierung von Metalloproteasen hervorruft, so dass ADAM10 als hauptsächlich verantwortliche *Sheddase* für die konstitutive Produktion von heterologem oder endogenem sIL-2R $\alpha$  identifiziert wurde.

Eine Stimulation von ADAM10 oder ADAM17 mittels Ionomycin oder PMA zeigte in den untersuchten Zelllinien einen Anstieg der sIL-2R $\alpha$ -Konzentration. Anhand der Aktivierung der beiden Proteasen ist jedoch erkennbar, dass ADAM10 im induzierten IL-2R $\alpha$ -*Shedding* zwar beteiligt ist, die wichtigere Protease hierbei jedoch ADAM17 zu sein scheint. Die Aktivierung dieser Protease führte in den untersuchten Zellen zu einer gesteigerten Produktion des sIL-2R $\alpha$ , während die Beteiligung von ADAM17 bei der konstitutiven sIL-2R $\alpha$ -Produktion deutlich geringer war. Diese Beobachtungen decken sich mit bereits veröffentlichten Daten, dass ADAM10 primär eine konstitutiv aktive Funktion hat, wohingegen ADAM17 erst nach Stimulation als aktive Protease fungiert (Hundhausen et al., 2003; Marezky et al., 2005; Schumacher et al. 2015). Zudem konnte beobachtet werden, dass ADAM17 in Abwesenheit von ADAM10 eine kompensatorische Funktion im Ionomycin-induzierten IL-2R $\alpha$ -*Shedding* übernimmt, von der bereits für andere Substrate berichtet werden konnte (Amour et al., 1998; Amour et al., 2000; Garbers et al., 2011), was die Theorie des ADAM17-regulierten stimulierten *Shedding* stützt. Auch bei ADAM10 ist ein kompensatorischer Effekt erkennbar, dieser ist jedoch deutlich geringer als die Kompensationsfähigkeit von ADAM17 in ADAM10-Abwesenheit.

Aktivierte T-Zellen sind die Hauptquelle des sIL-2R $\alpha$  *in vivo* (Rubin et al., 1985). Anhand von primären humanen T-Zellen, die *in vitro* mithilfe von  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 aktiviert wurden, zeigte sich, dass ADAM10 in primären T-Zellen zwar an der konstitutiven sIL-2R $\alpha$ -Produktion nach *in vitro*-Aktivierung beteiligt ist, die Wirkung von ADAM10 in primären T-Zellen im Vergleich zu Jurkat-Zellen jedoch schwächer zu sein scheint. Eine alleinige Inhibierung von ADAM10 zeigte hier im Gegensatz zu einer kombinierten ADAM10/ADAM17-Hemmung keine signifikante Wirkung auf die Menge an sIL-2R $\alpha$ , obwohl es Studien gibt, die über eine Hochregulierung von ADAM10 nach T-Zell-Aktivierung berichten (Briso et al., 2008). Bei Aktivierung von T-Zellen wird die Expression des IL-2R $\alpha$  verstärkt, so dass es möglich ist, dass die unabhängige Hochregulierung von ADAM10 und IL-2R $\alpha$  zu einer gesteigerten sIL-2R $\alpha$ -Produktion führen. Möglich ist auch, dass ADAM10 bei T-Zell-Aktivierung zusätzlich zur



verstärkten Expression auch aktiviert wird, hierzu gibt es jedoch bisher keine stützenden Daten.

Die Stimulation mit Ionomycin und PMA führte auch in T-Zellen zu einer verstärkten sIL-2R $\alpha$ -Produktion. Im Gegensatz zur konstitutiven Freisetzung des sIL-2R $\alpha$ , welche eher auf die ADAM10-Aktivität zurückzuführen ist, scheint die sIL-2R $\alpha$ -Produktion auch in aktivierten T-Zellen hauptsächlich von ADAM17 reguliert zu werden. Es gibt Berichte, die ADAM10- und ADAM17-Dysregulationen mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung bringen (Wetzel et al., 2017; Zunke & Rose-John, 2017), was die spekulative Theorie erlaubt, dass veränderte sIL-2R $\alpha$ -Level in die Krankheitsmechanismen involviert sein könnten. Die eingesetzte Kombination aus Ionomycin und PMA wird nicht nur zur Stimulation von ADAM10 und ADAM17 verwendet, sondern wirkt über die PMA-bedingte Bindung der PKC sowie den gesteigerten Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen und die dadurch zusätzlich verstärkte PKC-Aktivierung gleichzeitig als Aktivator für T-Zellen (Chatila et al., 1989; Röth et al., 2014), was über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und NFAT die Produktion von IL-2 fördert (Ai et al., 2013; Wang et al., 2013). Aufgrund des IL-2/IL-2R $\alpha$ -*feedback loop* wird durch die erhöhte IL-2-Freisetzung die Expression des IL-2R $\alpha$  gefördert (Busse et al., 2010). Vergleichend zur T-Zell-Rezeptor-Aktivierung mittels  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 verstärkt die Aktivierung mit Ionomycin und PMA die IL-2R $\alpha$ -Oberflächenexpression etwa dreimal so stark, wohingegen die Produktion des sIL-2R $\alpha$  durch die  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-Aktivierung die sIL-2R $\alpha$ -Freisetzung nach Ionomycin/PMA-Aktivierung um etwa 25% steigt. Die Stimulation mit Ionomycin und PMA steigert somit nicht nur die Aktivität von ADAM10 und ADAM17 und die damit verbundene sIL-2R $\alpha$ -Freisetzung, sondern scheint zusätzlich die Expression des IL-2R $\alpha$  auf der Zelloberfläche zu fördern. Die durch ADAM17 vermittelte Freisetzung bei T-Zell-Aktivierung konnte bisher auch für andere Substrate wie den IL-6R berichtet werden (Briso et al., 2008; Link et al., 2017), bei dem die Protease nicht an der konstitutiven Produktion des löslichen Rezeptors beteiligt ist, sondern erst bei Entzündungsreaktionen und der damit einhergehenden T-Zell-Aktivierung den IL-6R spaltet (Scheller et al., 2011; Yan et al., 2016). Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann angenommen werden, dass es bei der Produktion des löslichen IL-2R $\alpha$  eine ähnliche kontextabhängige Funktion von ADAM17 gibt.

### 4.3. Der IL-2R $\alpha$ -*Stalk*-Bereich ist ein essentieller Faktor für die Proteolyse

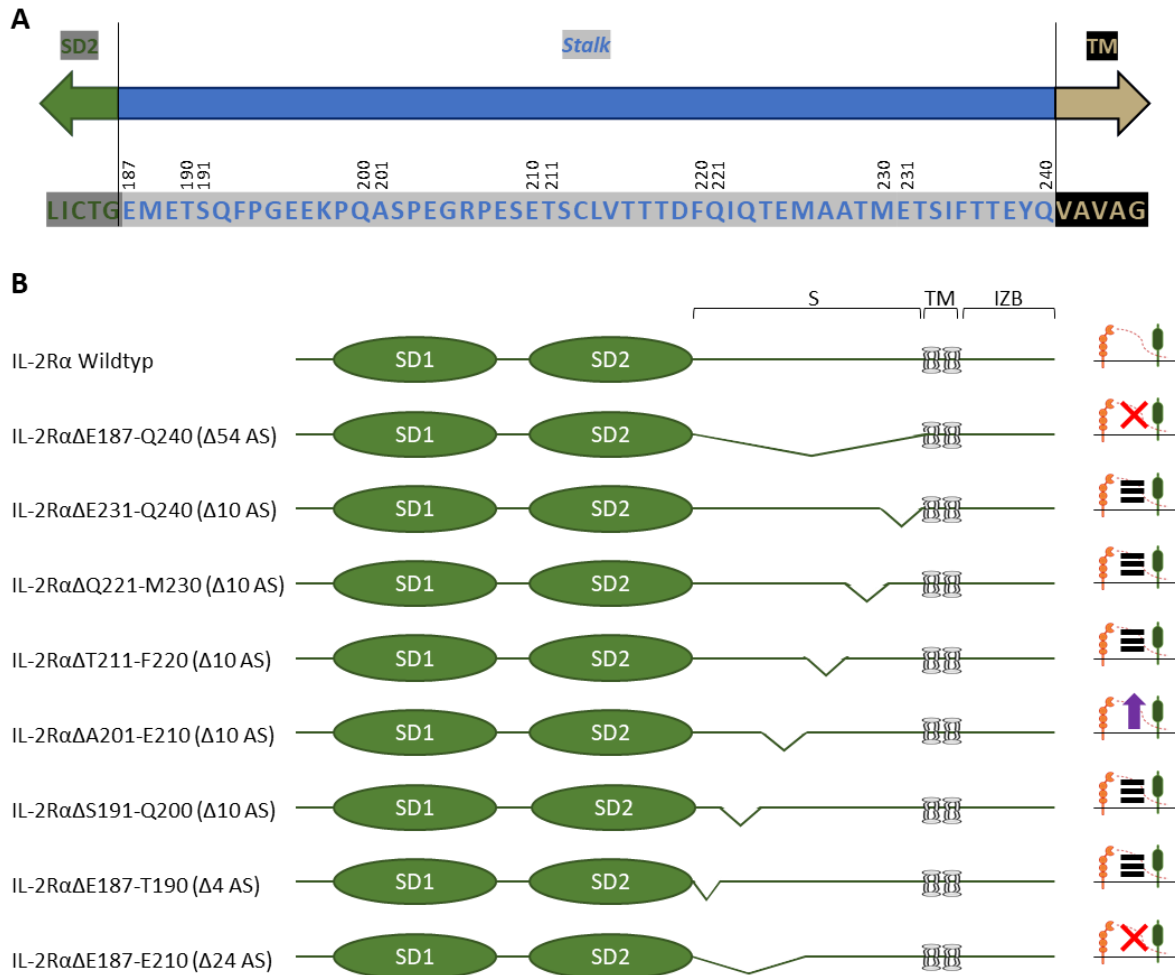
Ein wichtiger Aspekt der Proteolyse stellt die Schnittstelle dar, an der die Protease das Substrat spaltet. Trotz des breiten Wissens über das Substratspektrum von ADAM10 und ADAM17 ist wenig über die Spezifität der Schnittstellen beider Proteasen bekannt. Für den IL-2R $\alpha$  gibt es bisher keine Daten zu Schnittstellen, an denen Proteasen den Rezeptor spalten. Für andere Substrate von ADAM10 und ADAM17 wie den humanen IL-6R konnte erstmals berichtet werden, dass sich die Schnittstelle innerhalb der *Stalk*-Region zwischen Glutamin an der Position 357 (Q357) und Asparaginsäure an der Position 358 (D358) nahe der Plasmamembran befindet (Müllberg et al., 1994). Spätere Analysen lokalisierten die von ADAM17 genutzte Schnittstelle beim IL-6R hingegen zwischen Prolin (P355) und Valin (V356) (Goth et al., 2015; Riethmüller et al., 2017), was sich im Vergleich mit identifizierten Schnittstellen weiterer ADAM17-Substrate bei der MEROPS-Datenbank deckt (Rawlings et al., 2014). Anhand von *in vitro*-Aktivierung konnte auch für ADAM10 eine Schnittstelle zwischen P355 und V356 des IL-6R identifiziert werden, was für eine Nutzung der selben Schnittstelle durch ADAM10 und ADAM17 spricht (Riethmüller et al., 2017). Beim IL-11R zeigte sich, dass das Arginin an der Position 355 innerhalb des *Stalk*-Bereichs eine essentielle Rolle bei der ADAM10-regulierten Proteolyse des Rezeptors spielt (Lokau et al., 2017). Weiterführende LC-MC-basierte Untersuchungen ergaben zudem, dass beide ADAM-Proteasen N-terminal von Leucin schneiden, während ADAM10 eine zusätzliche Präferenz gegenüber aromatischen Aminosäuren sowie Arginin zeigt und ADAM17 eher Valin, Alanin oder Prolin präferiert (Tucher et al., 2014). Bei der Identifizierung von Tim-3 (*T Cell Immunoglobulin and Mucin Domain 3*) als Substrat von ADAM10 und ADAM17 wird vermutet, dass die Schnittstelle von ADAM17 innerhalb der *Stalk*-Region in einem Bereich zwischen Glutamin (Q181) und Alanin (A190) liegt (Möller-Hackbarth et al., 2013). Anhand des Wissens über die bisher identifizierten Schnittstellen von ADAM10 und ADAM17 bei anderen Substraten kann vermutet werden, dass die IL-2R $\alpha$ -Proteolyse ebenfalls vom *Stalk*-Bereich abhängig ist. Mithilfe von generierten IL-2R $\alpha$ -Varianten, bei denen der *Stalk*-Bereich oder Teile davon deletiert wurden, sollten mögliche Bereiche, in denen Schnittstellen liegen könnten, identifiziert werden. Es zeigte sich, dass eine vollständige Deletion des *Stalk*-Bereichs sowohl das konstitutive als auch das induzierte proteolytische *Shedding* des IL-2R $\alpha$  verhindert (Abb. 37). Verglichen mit dem IL-6R als bekanntes Substrat von ADAM10 und ADAM17 zeigten sich bei einem vollständig deletierten *Stalk*-Bereich ähnliche

Ergebnisse, wobei das Fehlen des IL-6R-*Stalk*-Bereichs zu einer abgeschwächten Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche führte (Baran et al., 2013). Beim IL-2R $\alpha$  hingegen wird die Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche nicht durch die Deletion beeinflusst, was zeigt, dass die Beobachtungen auf die fehlende proteolytische Verarbeitung zurückzuführen sind und nicht aus der Beeinträchtigung der Expression oder des Transports zur Zelloberfläche resultieren.

Um einzugrenzen, in welchem Bereich die Schnittstellen liegen, wurden IL-2R $\alpha$ -Varianten untersucht, die Deletionen einzelner Sequenzabschnitte in der Länge von jeweils 10 Aminosäuren im membranproximalen *Stalk*-Bereich enthalten. Anhand der Aminosäuresequenz des IL-2R $\alpha$ -*Stalk*-Bereichs kann abgelesen werden, wo die von ADAM10 und ADAM17 präferierten Aminosäuren wie Valin und Prolin, Glutamin und Alanin sowie die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin lokalisiert sind. Basierend auf den Daten bisheriger Schnittstellen von ADAM10 und ADAM17 bei anderen Substraten kann jedoch nur spekuliert werden, wo genau die Proteasen den IL-2R $\alpha$  schneiden. In der Sequenz des IL-2R $\alpha$ -*Stalk*-Bereichs sind zwar einzelne von ADAM10 und ADAM17 präferierte Aminosäuren, nicht jedoch wie bei anderen Substraten die bisher identifizierten nebeneinanderliegenden Prolin und Valin vorhanden. Die Analyse des konstitutiven und induzierten *Shedding* der IL-2R $\alpha$ -Varianten mit deletierten Sequenzen im membranproximalen *Stalk*-Bereich zeigte, dass die einzelnen Deletionen von 10 Aminosäuren keinen Einfluss auf das Rezeptor-*Shedding* haben. Diese Beobachtung lässt mehrere Möglichkeiten zu, einerseits liegt die verwendete Schnittstelle möglicherweise nicht im untersuchten membranproximalen, sondern stattdessen im membrandistalen Bereich oder aber es existieren mehrere Schnittstellen innerhalb des *Stalk*-Bereichs des IL-2R $\alpha$ . Andererseits wären neue Schnittstellen möglich, die durch die deletierten Sequenzabschnitte entstehen.

Anhand weiterer Rezeptor-Varianten mit entsprechenden Deletionen sollte die Theorie überprüft werden, ob die Schnittstelle von ADAM10 und ADAM17 im membrandistalen *Stalk*-Bereich des IL-2R $\alpha$  liegt. Hierbei zeigte sich, dass die Varianten mit Deletionen von maximal 10 Aminosäuren zu keiner Beeinträchtigung der sIL-2R $\alpha$ -Produktion führten. Im Gegensatz dazu verhinderte die Deletion der 24 membrandistalen Aminosäuren die ADAM10-/ADAM17-regulierte Rezeptor-Spaltung, was die Spekulation einer membrandistal

lokalisierten Schnittstelle im *Stalk*-Bereich bekräftigt. Fehlende Unterschiede zwischen den Varianten könnten auch hierbei auf mehrere Schnittstellen innerhalb des Bereiches zurückzuführen sein. Des Weiteren lässt das auffällig gesteigerte *Shedding* der  $\Delta A201$ -E210-Variante vermuten, dass aufgrund der Deletion eine neue Schnittstelle für ADAM10 und ADAM17 entstanden ist.



**Abb. 37:** Schematische Abbildung der generierten IL-2R $\alpha$ -Deletionsvarianten und die Auswirkung der Deletionen auf das *Shedding* der Varianten. **A:** Dargestellt ist der Ausschnitt der Aminosäuresequenz des humanen IL-2R $\alpha$  im Bereich von Leucin (L182) in der 2. Sushi-Domäne (SD2, grün) über die vollständige Sequenz des *Stalk*-Bereichs (blau) bis Glycin (G245) in der Transmembranregion (TM, beige). Aminosäuren des *Stalk*-Bereichs sind hellgrau hinterlegt, an den *Stalk*-Bereich angrenzende Aminosäuren der SD2 sind in dunkelgrau, Aminosäuren der TM-Region in schwarz markiert. Die Nummerierungen über der Sequenz kennzeichnen begrenzende Aminosäuren der einzelnen Deletionen. **B:** Schematische Übersicht der IL-2R $\alpha$ -Varianten mit den verschiedenen Deletionen im *Stalk*-Bereich. Die einzelnen Deletionen im *Stalk*-Bereich sind als Kerben dargestellt. Die Grafiken rechts der Varianten zeigt den Einfluss der Deletionen auf die Proteolyse des IL-2R $\alpha$ . Eine ausbleibende proteolytische Spaltung des Rezeptors ist mit einem roten Kreuz gekennzeichnet, ein verstärktes *Shedding* im Vergleich zur Wildtyp-Variante ist durch einen lila Pfeil dargestellt, drei schwarze Striche stellen eine unveränderte Proteolyse im Vergleich zum WT dar. Abgebildet sind die zwei Sushi-Domänen (SD1, SD2, grün), der *Stalk*-Bereich (S), die Transmembran-Region (TM) und der Intrazellulärbereich (IZB), die Grafiken rechts zeigen die Protease (orange) und den IL-2R $\alpha$  (grün). Die Abbildung wurde verändert nach Baran et al. (2013).

Anhand der Ergebnisse wird angenommen, dass die Schnittstelle für die proteolytische Spaltung des IL-2R $\alpha$  im membrandistalen Bereich lokalisiert ist. Die exakte Lokalisation der Schnittstelle konnte hierbei jedoch nicht bestimmt werden. Nicht beachtet wurde, dass möglicherweise auch beim IL-2R $\alpha$  für die proteolytische Spaltung eine bestimmte Mindestanzahl an AS im *Stalk*-Bereich vorhanden sein muss, wie es bisher für den IL-6R festgestellt werden konnte (Baran et al., 2013). Weiterführende Untersuchungen wie beispielsweise eine massenspektrometrische Analyse zur genaueren Identifizierung der Schnittstelle könnten hierzu Aufschluss geben. Interessanterweise ist erkennbar, dass die Varianten mit kürzeren Deletionsbereichen in der *Stalk*-Region genau wie die Variante mit dem vollständig deletierten *Stalk*-Bereich auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die *Stalk*-Region des IL-2R $\alpha$  nicht ausschlaggebend für den Transport des Rezeptors zur Plasmamembran oder dessen Expression auf der Zelloberfläche ist, jedoch einen essentiellen Faktor für die proteolytische Abspaltung darstellt.

#### **4.4. Inhibierungen von Komponenten der JAK/STAT-, MAPK- und PI3K/Akt-Signalwege haben keinen Einfluss auf die IL-2R $\alpha$ -Proteolyse**

Die Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 und deren *Shedding*-Aktivität kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert, welche über Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) die PKC aktiviert. Eine direkte Stimulation der PKC und der *Shedding*-Aktivität kann durch PMA erfolgen (Horiuchi et al., 2007), während der Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen, welcher chemisch durch Ionophore wie Ionomycin ausgelöst werden kann, dabei zusätzlich die Aktivität der PKC verstärkt (Chatila et al., 1989). Ein anderer Weg der Proteaseaktivierung verläuft über die Zellaktivierung (Black et al., 1997; Huovila et al., 2005), bei der vor allem die Beteiligung von Signalwegen wie MAPK und ERK eine entscheidende Rolle spielen (Soond et al., 2005; Huovila et al., 2005). Während Studien von Killock & Ivetić (2010) zeigen, dass die Aktivierung der MAPK und der PKC in Lymphozyten und Monozyten die *Shedding*-Aktivität von ADAM10 verstärkt, konnte durch Wang et al. (2011) nachgewiesen werden, dass die Stimulation der ERK- und MAPK-Signalwege in Neutrophilen die Aktivität von ADAM17 induziert. In Neutrophilen zeigte sich zudem, dass nicht nur die Aktivierung der Zellen, sondern auch die Apoptose zur Aktivierung von ADAM17 führte (Walcheck et al., 2006; Chalaris et al., 2007; Wang et al., 2010), wobei hier die Fas-Signalkaskade eine

entscheidendere Rolle spielt (Wang et al., 2011). Die Inhibierung verschiedener Signalwege sollte Aufschluss darüber geben, ob die betreffenden Signalwege an der Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 involviert und damit wichtige Faktoren in der Proteolyse des IL-2R $\alpha$  sind. Untersucht wurden hierzu die IL-2R $\alpha$ -Expression und die sIL-2R $\alpha$ -Produktion in HDLM-2-Zellen mit endogen exprimiertem IL-2R $\alpha$  unter der Blockierung von JAK1/JAK3, ERK, MAPK, PI3K/Akt oder mTOR. Anhand der durchgeführten Experimente zeigte sich, dass weder die IL-2R $\alpha$ -Expression noch das IL-2R $\alpha$ -*Shedding* durch eine Blockierung der untersuchten Signalwegkomponenten beeinträchtigt werden. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die konstitutive Proteaseaktivität, wahrscheinlich vor allem ADAM10, nicht durch die Blockierung der untersuchten Signalwege beeinträchtigt wird. Möglich wäre hierbei, dass bei Ausfällen einer Komponente im betroffenen Signalweg auf funktionale Signalwege ausgewichen wird, um die Sicherstellung der IL-2R $\alpha$ -Expression und der sIL-2R $\alpha$ -Produktion kompensatorisch zu erhalten. Zudem kann eine Beteiligung anderer Mechanismen, die in HDLM-2-Zellen unabhängig der IL-2-Signalwege einen Einfluss auf die Expression und das *Shedding* des IL-2R $\alpha$  ausüben, nicht ausgeschlossen werden.

#### **4.5. Einfluss von Rezeptorglykosylierungen auf das IL-2R $\alpha$ -*Shedding***

Proteinglykosylierungen sind häufig vorkommende posttranslationale Modifikationen während der Proteinbiosynthese (Lu et al., 2012), die die Stabilität und Expression von Rezeptoren auf der Zelloberfläche regulieren (Brockhausen et al., 2009). Während N-Glykane kovalent an Asparagin gebunden sind und hauptsächlich für die Sicherstellung einer korrekten Proteinfaltung verantwortlich sind (Parodi et al., 2017), sind O-Glykosylierungen an Serin- bzw. Threoninketten gebunden. Es gibt bereits Studien, die den N- und O-Glykanen einen Einfluss auf die proteolytische Spaltung nachweisen (van Veen et al., 2004) und N-Glykane bereits als essentielle Faktoren beim ADAM-vermittelten *Shedding* des humanen GM-CSFR (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor*) (Ding et al., 1995) oder des EGFR (Sliker & Lane, 1985) identifiziert werden konnten, während O-Glykosylierungen die ADAM17-regulierte Proteolyse des IL-6R verringern (Goth et al., 2015; Riethmüller et al., 2017). Beim IL-2R $\alpha$  gibt es sechs vorhergesagte Glykosylierungsstellen, zwei N-Glykane und vier O-Glykane (Miedel et al., 1988), deren Funktionen im IL-2R $\alpha$ -*Shedding* jedoch nicht eindeutig bekannt sind. Anhand der durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass das Glykan an der Position N70 eine entscheidende Funktion im konstitutiven IL-2R $\alpha$ -*Shedding*

übernimmt, da ein Fehlen dieses N-Glykans die proteolytische Spaltung des Rezeptors signifikant reduziert. Basierend auf dem Wissen, dass N-Glykane bei ADAM-Substraten wichtige Faktoren in proteolytischen *Shedding* darstellen, könnte die Abwesenheit des Glykans im IL-2R $\alpha$  möglicherweise die Erkennung des Rezeptors durch die Protease verhindern. Die Theorie der essentiellen Rolle des N70-Glykans im IL-2R $\alpha$ -*Shedding* wird durch die verstärkte Rezeptorexpression der IL-2R $\alpha$ -N70A-Variante auf der Zelloberfläche bestärkt (Hagedorn, 2021), welche sich bedingt durch die verminderte Spaltung des Rezeptors zeigt. Die Abwesenheit einzelner O-Glykane zeigt hingegen keinen signifikanten Einfluss auf das IL-2R $\alpha$ -*Shedding*, wohingegen das Fehlen der drei O-Glykane an den Positionen T224, T229 und T237 zu einer signifikanten Beeinträchtigung des Rezeptor-*Shedding* führt. Hierzu kann spekuliert werden, dass wenigstens zwei vorhandene O-Glykane für die Erkennung des Substrats durch die ADAM-Proteasen notwendig sind. Dabei scheint es nicht von Bedeutung zu sein, welches der O-Glykane vorhanden ist, was sich anhand des *Shedding* der IL-2R $\alpha$ -Varianten mit einem oder zwei fehlenden O-Glykanen vermuten lässt. Interessanterweise zeigt sich, dass zwar alle IL-2R $\alpha$ -Varianten mit fehlenden N- oder O-Glykanen an einzelnen Positionen auf der Zelloberfläche exprimiert sind, diese jedoch auffällige Unterschiede in der Intensität aufweisen (Hagedorn, 2021). Erkennbar ist hierbei, dass die N70-Variante als einzige der untersuchten Varianten eine um rund 20 % stärkere Oberflächenexpression als der WT-Rezeptor aufweist, wohingegen die Expression der N89-Variante um rund 20 % reduziert ist, bei den O-Glykanvarianten liegt die Rezeptorexpression sogar nur bei maximal 45 % im Vergleich zum WT-Rezeptor (Hagedorn, 2021). Ob die hier beobachteten Veränderungen in der sIL-2R $\alpha$ -Produktion ausschließlich auf die Abwesenheit der untersuchten Glykane zurückzuführen sind oder möglicherweise aus der verminderten Expression auf der Zelloberfläche aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen resultieren, kann anhand der Beobachtungen nicht eindeutig gesagt werden. Für abschließende Aussagen zum Einfluss der Glykane auf das IL-2R $\alpha$ -*Shedding* müssten weiterführende Experimente durchgeführt werden.

#### **4.6. Der lösliche IL-2R $\alpha$ wirkt antagonistisch auf den IL-2-Signalweg**

Die biologische Funktion des sIL-2R $\alpha$  konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden, es gibt jedoch verschiedene Theorien, die dem sIL-2R $\alpha$  einerseits agonistische (Rubin et al., 1986; Rubinstein et al., 2006; Maier et al., 2009; Lindqvist et al., 2010; Russell et al., 2012),

andererseits antagonistische Funktionen (Yang et al., 2011) zusprechen. In einer weiteren Theorie wird beschrieben, dass die Bindung des IL-2 an den sIL-2R $\alpha$  das Zytokin vor Degradation schützt und damit dessen Halbwertszeit verlängert wird (Kobayashi et al., 1999; Vanmaris & Rijkers, 2017). Die Wirkung des sIL-2R $\alpha$  auf den IL-2-Signalweg sollte mithilfe von primären T-Zellen untersucht werden, welche im aktivierten Zustand den hochaffinen trimeren IL-2-Rezeptor aufweisen (Robb et al., 1981), wohingegen ruhende, nicht-aktivierte T-Zellen lediglich den dimeren IL-2R $\beta/\gamma_c$ , nicht aber den IL-2R $\alpha$  auf der Zelloberfläche exprimieren (Zhang et al., 1998). Ausgenommen sind hierbei T<sub>reg</sub>-Zellen, da diese eine hohe konstitutive IL-2R $\alpha$ -Expression aufweisen (Kim et al., 2006; Liao et al., 2011a; Boyman & Sprent, 2012). Anhand der durchgeführten Untersuchungen an aktivierten und nicht-aktivierten primären humanen T-Zellen zeigte sich, dass der sIL-2R $\alpha$  in T-Zellen antagonistische Eigenschaften auf die IL-2-Signalübertragung aufweist. Der Großteil des verfügbaren IL-2 wurde durch den vorhandenen Überschuss an sIL-2R $\alpha$  gebunden, was schließlich die Interaktion des IL-2 mit den Rezeptoren auf der Zielzelle und somit die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT5 verhinderte. Zu beachten ist, dass die verwendeten sIL-2R $\alpha$ -Konzentrationen die Menge an löslichem IL-2R $\alpha$  übersteigt, die bisher in Serumproben gemessen wurden. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass es bei auftretender Infektion oder Entzündung eine enorme T-Zell-Aktivierung und eine voraussichtlich gesteigerte sIL-2R $\alpha$ -Produktion am Infektionsort gibt, wodurch es wahrscheinlich ist, dass die lokale sIL-2R $\alpha$ -Konzentration die Serumkonzentration übersteigt. Übereinstimmend zu den beobachteten Ergebnissen konnte bereits über eine antagonistische Funktion des sIL-2R $\alpha$  berichtet werden, dabei blockierte rekombinanter sIL-2R $\alpha$  freies IL-2 und reduzierte die Proliferation von T-Zellen (Lindqvist et al., 2010). Die sIL-2R $\alpha$ -Produktion könnte ein negativer *feedback*-Mechanismus sein, welcher durch die Verringerung an verfügbarem IL-2 das Gleichgewicht zwischen Immunaktivierung und Immuntoleranz aufrechterhalten soll (Damoiseaux, 2020). Weitere Untersuchungen zur Wirkung des sIL-2R $\alpha$  auf die IL-2-spezifische Signaltransduktion in T-Zellen ergaben, dass der sIL-2R $\alpha$  dabei die IL-2-induzierte STAT5-Phosphorylierung in konventionellen und auch regulatorischen T-Zellen reduziert, wobei hier überraschenderweise eine Verstärkung der Zellproliferation und der Expansion naiver CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen beobachtet wurde (Maier et al., 2009). Obwohl es zahlreiche Hinweise auf antagonistische Funktionen des sIL-2R $\alpha$  gibt, konnten dem sIL-2R $\alpha$  jedoch anhand anderer Studien auch agonistische Eigenschaften



nachgewiesen werden, die konträr zu bisherigen Studien auf der Beobachtung einer verstärkten IL-2-regulierten STAT5-Phosphorylierung in CD4<sup>+</sup> T-Zellen basieren (Yang et al., 2011). Möglich ist, dass die Wirkung des sIL-2R $\alpha$  zelltypspezifisch ist oder in Abhängigkeit des zellulären Kontextes und der Menge an exprimiertem membranständigen IL-2R $\alpha$  variiert. Die Rolle des sIL-2R $\alpha$  könnte sich in verschiedenen Erkrankungen unterscheiden, was die vielfältigen Funktionen des IL-2 auf unterschiedliche Immunzelltypen darstellt (Damoiseaux, 2020). Es scheint jedoch offensichtlich zu sein, dass der sIL-2R $\alpha$  den IL-2-Signalweg beeinflusst und dadurch ein Ungleichgewicht zwischen Immunreaktion und Selbsttoleranz verursacht (Damoiseaux, 2020). Zur genaueren Analyse der biologischen Funktion des sIL-2R $\alpha$  wird weitere Forschung notwendig sein, um die funktionellen Auswirkungen modulierter sIL-2R $\alpha$ -Level zu verstehen und die Manipulation der sIL-2R $\alpha$ -Konzentration potenziell für die klinische Praxis nutzen zu können.

#### **4.7. ADAM10 ist die signifikante *Sheddase* im konstitutiven IL-2R $\alpha$ -*Shedding* in Mäusen**

Die Maus wird schon seit langer Zeit als eines der häufigsten Labortiere in der modernen Forschung eingesetzt und stellt das dominierende *in vivo* Säugetiermodell für biomedizinische Untersuchungen dar (Masopust et al., 2017). Inzwischen gilt das Mausmodell als eines der wichtigsten Mittel der immunologischen Forschung, auch bedingt durch die Tatsache, dass der Mensch über 90 % der Gene im Erbgut besitzt, die den murinen Genen ähneln und sich viele Erkrankungen bei Menschen und Mäusen auf die gleiche Ursache zurückführen lassen (De Jong & Maina, 2010). Genetisch veränderte Mäuse sind auch in der Forschung zum Rezeptor-*Shedding* fester Bestandteil der Untersuchungen (Müllberg et al., 2000; Garbers et al., 2011; Rowlands et al., 2011; Miller et al., 2017). Die Analysen von Mausseren aus Tieren mit spezifischen Defizienzen für ADAM10 und/oder ADAM17 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Tieren mit einer TIMP3-Defizienz sowie hypomorphen ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Mäusen mit etwa 5 % der Menge an ADAM17 zeigten, dass vor allem ADAM10 eine wichtige Rolle in der konstitutiven sIL-2R $\alpha$ -Produktion in Mäusen spielt. In TIMP3-defizienten Mäusen war zunächst kein Unterschied in der sIL-2R $\alpha$  Konzentration im Vergleich zu den WT-Tieren erkennbar, was darauf schließen lässt, dass die konstitutive Produktion des löslichen IL-2R $\alpha$  nicht ausschließlich durch TIMP3-sensitive Mechanismen reguliert wird. Im Serum von Tieren, die eine Defizienz an ADAM10 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen

aufweisen, konnte hingegen eine deutlich verringerte sIL-2R $\alpha$ -Konzentration im Vergleich zu WT-Mäusen gemessen werden, was zeigt, dass ADAM10 eine essentielle Rolle im IL-2R $\alpha$ -*Shedding in vivo* übernimmt. Mäuse mit einer Defizienz an ADAM17 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen wiesen im Gegensatz dazu eine erhöhte IL-2R $\alpha$ -Serumkonzentration auf. Aufgrund der ausbleibenden Verringerung der sIL-2R $\alpha$ -Produktion in diesen Tieren kann somit ausgeschlossen werden, dass ADAM17 in das konstitutive IL-2R $\alpha$ -*Shedding* in Mäusen unter Normalbedingungen beteiligt ist. Der beobachtete Anstieg der sIL-2R $\alpha$ -Konzentration lässt sich wahrscheinlich auf eine kompensatorische Hochregulierung von ADAM10 in Abwesenheit von ADAM17 zurückführen. In B-Zellen konnte ein solcher kompensatorischer Anstieg der ADAM10-Aktivität in ADAM17-Abwesenheit bereits beobachtet werden (Folgora et al., 2013) und der ebenfalls in dieser Arbeit beobachtete Anstieg der konstitutiven sIL-2R $\alpha$ -Produktion in HEK293-Zellen mit einer ADAM17-Defizienz lassen darauf schließen, dass diese kompensatorische Funktion nicht auf die Spezies oder den Zelltyp spezifiziert ist. Bei Tieren, die eine Defizienz für ADAM10 und ADAM17 aufweisen, zeigte sich im Vergleich zu den WT-Tieren bedingt durch den Mangel beider Proteasen ebenfalls eine reduzierte der sIL-2R $\alpha$ -Konzentration, welche jedoch vergleichbar mit der reduzierten sIL-2R $\alpha$ -Menge in ADAM10-defizienten Mäusen war. Diese Beobachtungen machen deutlich, dass ADAM17 keine synergistische Aktivität aufweist, sondern nur in ADAM10-Abwesenheit in das IL-2R $\alpha$ -*Shedding* involviert ist. Auch die Tatsache, dass in Zellen mit einem ADAM10/ADAM17-Doppel-*Knockout* ein Anstieg der sIL-2R $\alpha$ -Konzentration ausblieb, welcher zuvor in Zellen mit einem alleinigen ADAM17-*Knockout* beobachtet werden konnte, bestärkt die Theorie der kompensatorisch hochregulierten ADAM10-Aktivität bei ADAM17-Abwesenheit. Übereinstimmend dazu konnten hier in den Seren von hypomorphen ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Mäusen, die im Vergleich zu WT-Mäusen nur noch etwa 5 % der ADAM17-Menge besitzen (Chalaris et al., 2010), ähnliche sIL-2R $\alpha$ -Konzentration wie bei den vergleichbaren WT-Mäusen gemessen werden, was ebenfalls verdeutlicht, dass ADAM17 bei ADAM10-Anwesenheit nicht an der konstitutiven sIL-2R $\alpha$ -Produktion in Mäusen beteiligt ist. Anhand der Menge an sIL-2R $\alpha$ , die in den Seren noch deutlich erkennbar vorhanden sind, kann jedoch eine Beteiligung anderer Proteasen neben ADAM10 und ADAM17 nicht ausgeschlossen werden. Eine direkte Vorhersage, ob ADAM10 auch beim Menschen ein essentieller Regulator des IL-2R $\alpha$ -*Shedding* ist, kann bisher jedoch nicht sicher getroffen werden. Da die *in vitro*-Experimente zur Analyse der Rolle von ADAM10 im konstitutiven IL-2R $\alpha$ -*Shedding* in humanen Zellen

durchgeführt wurden, kann jedoch spekuliert werden, dass ADAM10 auch beim Menschen an der Regulation des sIL-2R $\alpha$ -Levels beteiligt ist. Gestützt wird diese Theorie anhand von Daten, die bei Erkrankungen mit einer erhöhten ADAM10-Expression wie Dermatitis oder Immunthrombozytopenie (Maretzky et al., 2008; Qiao et al., 2018) auch eine erhöhte Serumkonzentration an sIL-2R $\alpha$  nachwiesen (Furue et al., 1994; Erduran et al., 1998). Die Identifizierung von ADAM10 als *Sheddase*, die einerseits die Menge an löslichem IL-2R $\alpha$ , andererseits aber auch die IL-2R $\alpha$ -Menge an der Zelloberfläche regulieren und dadurch die IL-2-Sensitivität der Zelle steuern kann, ermöglicht eine Modulation der ADAM10-Aktivität, die der Manipulation der IL-2R $\alpha$ - und sIL-2R $\alpha$ -Level dienen kann. Um jedoch sichere Aussagen darüber treffen zu können, ob die konstitutive ADAM10-Aktivität beim Menschen *in vivo* hauptverantwortlich für das IL-2R $\alpha$ -*Shedding* ist, bedarf es weiterer Forschung.

#### **4.8. Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit konnten wichtige Aspekte der Proteolyse der  $\alpha$ -Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors (IL-2R $\alpha$ ) und der Entstehung des löslichen IL-2R $\alpha$  (sIL-2R $\alpha$ ) identifiziert werden. Es zeigte sich, dass der IL-2R $\alpha$  als neues Substrat in die Liste von Metalloproteasen und insbesondere ADAM10 und ADAM17 aufgenommen werden kann. ADAM10 ist dabei eine wichtige *Sheddase* in der konstitutiven sIL-2R $\alpha$ -Produktion, wohingegen ADAM17 die hauptregulatorische Protease im induzierten *Shedding* in aktivierten T-Zellen ist und eine kompensatorische Funktion in ADAM10-Abwesenheit einnimmt. Da verschiedene Studien Serin- und Cysteinproteasen als Proteasen identifizierten, die in der Lage sind, den IL-2R $\alpha$  zu schneiden, wären Untersuchungen sinnvoll, die der Überprüfung dieser Theorien sowie der Analyse möglicher funktioneller Unterschiede oder Gemeinsamkeiten und Auswirkungen dieser verschiedenen Proteasen im IL-2R $\alpha$ -*Shedding* dienen. Der Einsatz von Mäusen mit Defizienzen anderer Proteasen als ADAM10 oder ADAM17 wäre hierbei ein interessanter Ansatz.

Ein wichtiger Aspekt der Proteolyse ist die Schnittstelle, an welcher die Proteasen den Rezeptor schneiden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Schnittstelle von ADAM10 und ADAM17 innerhalb der Rezeptor-*Stalk*-Region liegen muss. Anhand des Wissens über die ADAM10- und ADAM17-Schnittstellen bei anderen Substraten konnte spekuliert werden, dass auch die Schnittstelle beim IL-2R $\alpha$  im membranproximalen *Stalk*-Bereich liegen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch darauf schließen, dass die

Schnittstelle mit hoher Wahrscheinlichkeit im membrandistalen *Stalk*-Bereich lokalisiert ist. Weiterführende massenspektrometrische Untersuchungen könnten hierbei die eine existierende oder möglicherweise sogar mehrere existierende Schnittstellen identifizieren.

Es gibt verschiedene Theorien zur biologischen Funktion des sIL-2R $\alpha$ , welche sowohl agonistische als auch antagonistische Eigenschaften des löslichen Rezeptors beschreiben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der sIL-2R $\alpha$  antagonistisch auf die IL-2-Signalübertragung wirkt. Da jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Funktion des löslichen Rezeptors in Abhängigkeit des zellulären Kontextes variieren kann, wären weitere Untersuchungen in verschiedenen zellulären Kontexten sinnvoll, um eine Modulation der sIL-2R $\alpha$ -Level und die Auswirkungen manipulierter sIL-2R $\alpha$ -Konzentrationen besser verstehen und für die klinische Praxis nutzen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Interleukin-2 (IL-2) vermittelt seine vielfältigen Funktionen in der Regulation verschiedener Immunzellen über die Bindung seines spezifischen Rezeptors und der Induktion intrazellulärer Signalkaskaden. Es ist bekannt, dass eine lösliche Variante des IL-2R $\alpha$  (sIL-2R $\alpha$ ) existiert, jedoch sind weder deren biologische Rolle noch der Mechanismus der Entstehung vollständig verstanden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Metalloproteasen, im Speziellen ADAM10 und ADAM17, in der Lage sind, den IL-2R $\alpha$  zu spalten und löslichen IL-2R $\alpha$  zu produzieren. Während ADAM10 als verantwortliche Protease für das konstitutive *Shedding* von endogenem und heterologem IL-2R $\alpha$  sowie für die Regulation der konstitutiven sIL-2R $\alpha$ -Produktion *in vivo* identifiziert werden konnte, scheint ADAM17 die wichtigere Protease im induzierten *Shedding* von aktivierten T-Zellen zu sein. Die Aktivierung der Proteasen und deren *Shedding*-Aktivität kann über verschiedene Mechanismen erfolgen, die unter anderem verschiedene Signalwege involvieren. In dieser Arbeit zeigte sich jedoch, dass die Blockierung einzelner Komponenten ausgewählter Signalwege weder die IL-2R $\alpha$ -Expression noch das IL-2R $\alpha$ -*Shedding* beeinträchtigt, was möglicherweise auf ein kompensatorisches Ausweichen auf funktionale Signalwege oder auf Faktoren unabhängig der untersuchten Signalwege zurückzuführen ist. Des Weiteren konnte die Schnittstelle, an welcher der Rezeptor durch die Proteasen gespalten wird, im membrandistalen Bereich des *Stalk*-Bereiches, lokalisiert werden. Die Existenz mehrerer Schnittstellen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Von den vorhandenen Rezeptorglykolysierungen scheint nur das N70-Glykan eine Rolle im IL-2R $\alpha$ -*Shedding* zu spielen, die Funktion der restlichen Glykane des IL-2R $\alpha$  ist noch unklar. Ein weiterer wichtiger Befund dieser Arbeit ist, dass der sIL-2R $\alpha$  antagonistisch auf die IL-2-Signalübertragung in T-Zellen wirkt, indem er verfügbares IL-2 bindet und dadurch eine Interaktion mit den Rezeptoren auf der Zelloberfläche und die damit verbundene Signalweiterleitung verhindert. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sich die Funktion des löslichen Rezeptors abhängig vom zellulären Kontext unterscheidet. Die Ergebnisse zur Funktion des sIL-2R $\alpha$  und die Analyse des Mechanismus zur Generierung des löslichen Rezeptors ermöglichen Eingriffe in die Balance zwischen membranständigem und löslichem IL-2R $\alpha$ , was neue Möglichkeiten für IL-2-abhängige Therapien in der Zukunft eröffnet.

## 6. Summary

Interleukin-2 (IL-2) mediates its pleiotropic functions in regulating various immune cells by binding its specific receptor and inducing intracellular signaling cascades. A soluble variant of IL-2R $\alpha$  (sIL-2R $\alpha$ ) is known to exist, but neither its biological role nor the mechanism of generation are completely understood. Here it could be demonstrated that metalloproteases, in particular ADAM10 and ADAM17, are able to cleave the IL-2R $\alpha$  and produce soluble IL-2R $\alpha$ . ADAM10 could be identified as responsible protease for constitutive shedding of endogenous and heterologous IL-2R $\alpha$  and for regulation of constitutive sIL-2R $\alpha$  production *in vivo*, while ADAM17 seems to be the more important protease for induced IL-2R $\alpha$ -shedding in activated T cells. Activation of ADAM10 and ADAM17 and their shedding activity can be provoked by different mechanisms involving the contribution of different signaling pathways. However, here it could be showed that the inhibition of different components of selected signaling pathways has no effects neither on IL-2R $\alpha$  expression nor on IL-2R $\alpha$  shedding, which may be due to a compensatory use of functional signaling pathways or to factors independent of the selected signaling pathways. Moreover it could be shown that the cleavage site at which the IL-2R $\alpha$  is cleaved by ADAM10 and ADAM17 is localized in the membrane-distal part of the IL-2R $\alpha$  stalk region, but it can not be ruled, that exist multiple cleavage sites at IL-2R $\alpha$  stalk region. The IL-2R $\alpha$  has six glycans of which the N70 glycan seems to play an important role in IL-2R $\alpha$  shedding, the function of the remaining glycans of IL-2R $\alpha$  is still unclear. Another important result of this study is the identified function of the sIL-2R $\alpha$ . Here it could be shown that the sIL-2R $\alpha$  has an antagonistic function on IL-2-signaling in T cells by binding available IL-2 and thus preventing the interaction with membrane-bound receptors and associated signalings. However, it can be assumed that the function of the sIL-2R $\alpha$  differs with the cellular context. The results on the function of the sIL-2R $\alpha$  and the analysis of the mechanism for the generation of the soluble receptor enable interventions in the balance between membrane-bound and soluble IL-2R $\alpha$ , which inaugurates new possibilities for IL-2-dependent therapies in the future.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Trotta, E., R. Simeonov, D., Marson, A., & Bluestone, J. A. (2018).** Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Science immunology*, 3(25), eaat1482.
- Abel, S., Hundhausen, C., Mentlein, R., Schulte, A., Berkhout, T. A., Broadway, N., ... & Ludwig, A. (2004).** The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *The Journal of Immunology*, 172(10), 6362-6372.
- Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L., & Chen, H. (2013).** Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *International journal of environmental research and public health*, 10(9), 3834-3842.
- Amour, A., Slocombe, P. M., Webster, A., Butler, M., Knight, C. G., Smith, B. J., ... & Murphy, G. (1998).** TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS letters*, 435(1), 39-44.
- Amour, A., Knight, C. G., Webster, A., Slocombe, P. M., Stephens, P. E., Knäuper, V., ... & Murphy, G. (2000).** The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS letters*, 473(3), 275-279.
- Arenas-Ramirez, N., Woytschak, J., & Boyman, O. (2015).** Interleukin-2: biology, design and application. *Trends in immunology*, 36(12), 763-777.
- Arima, N., Kamio, M., Imada, K., Hori, T., Hattori, T., Tsudo, M., ... & Uchiyama, T. (1992).** Pseudo-high affinity interleukin 2 (IL-2) receptor lacks the third component that is essential for functional IL-2 binding and signaling. *The Journal of experimental medicine*, 176(5), 1265-1272.
- Ballard, D. W., Böhlein, E., Lowenthal, J. W., Wano, Y., Franza, B. R., & Greene, W. C. (1988).** HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the  $\kappa$ B element in the IL-2 receptor  $\alpha$  gene. *Science*, 241(4873), 1652-1655.
- Ballesteros-Tato, A., León, B., Graf, B. A., Moquin, A., Adams, P. S., Lund, F. E., & Randall, T. D. (2012).** Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity*, 36(5), 847-856.
- Bandsma, R. H., van Goor, H., Yourshaw, M., Horlings, R. K., Jonkman, M. F., Schölvinck, E. H., ... & Martín, M. G. (2015).** Loss of ADAM17 is associated with severe multiorgan dysfunction. *Human pathology*, 46(6), 923-928.
- Bank, U., Reinhold, D., Schneemilch, C., Kunz, D., Synowitz, H. J., & Ansorge, S. (1999).** Selective proteolytic cleavage of IL-2 receptor and IL-6 receptor ligand binding chains by neutrophil-derived serine proteases at foci of inflammation. *Journal of interferon & cytokine research*, 19(11), 1277-1287.
- Baran, P., Nitz, R., Grötzinger, J., Scheller, J., & Garbers, C. (2013).** Minimal interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 288(21), 14756-14768.
- Bazan, J. F. (1990).** Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(18), 6934-6938.

- Beadling, C., Ng, J., Babbage, J. W., & Cantrell, D. A. (1996).** Interleukin-2 activation of STAT5 requires the convergent action of tyrosine kinases and a serine/threonine kinase pathway distinct from the Raf1/ERK2 MAP kinase pathway. *The EMBO Journal*, *15*(8), 1902-1913.
- Becherer, J. D., & Blobel, C. P. (2003).** Biochemical properties and functions of membrane-anchored metalloprotease-disintegrin proteins (ADAMs).
- Belldegrun, A. S., Klatte, T., Shuch, B., LaRochelle, J. C., Miller, D. C., Said, J. W., ... & Pantuck, A. J. (2008).** Cancer-specific survival outcomes among patients treated during the cytokine era of kidney cancer (1989-2005) A benchmark for emerging targeted cancer therapies. *Cancer*, *113*(9), 2457-2463.
- Benczik, M., & Gaffen, S. L. (2004).** The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunological investigations*, *33*(2), 109-142.
- Bien, E., & Balcerska, A. (2008).** Serum soluble interleukin 2 receptor  $\alpha$  in human cancer of adults and children: a review. *Biomarkers*, *13*(1), 1-26.
- Black, R. A., Doedens, J. R., Mahimkar, R., ... & Paxton, R. (2003).** Substrate specificity and inducibility of TACE (tumour necrosis factor  $\alpha$ -converting enzyme) revisited: the Ala-Val preference, and induced intrinsic activity. In *Biochemical Society Symposia* (Vol. 70, pp. 39-52).
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., ... & Cerretti, D. P. (1997).** A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature*, *385*(6618), 729-733.
- Black, R. A., & White, J. M. (1998).** ADAMs: focus on the protease domain. *Current opinion in cell biology*, *10*(5), 654-659.
- Blaydon, D. C., Biancheri, P., Di, W. L., Plagnol, V., Cabral, R. M., Brooke, M. A., ... & Kelsell, D. P. (2011).** Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. *New England Journal of Medicine*, *365*(16), 1502-1508.
- Böhnlein, E., Lowenthal, J. W., Siekevitz, M., Ballard, D. W., Franza, B. R., & Greene, W. C. (1988).** The same inducible nuclear proteins regulates mitogen activation of both the interleukin-2 receptor-alpha gene and type 1 HIV. *Cell*, *53*(5), 827-836.
- Bosco, M. C., Espinoza-Delgado, I., Schwabe, M., Gusella, G. L., Longo, D. L., Sugamura, K., & Varesio, L. (1994).** Regulation by interleukin-2 (IL-2) and interferon gamma of IL-2 receptor gamma chain gene expression in human monocytes.
- Boussiotis, V. A., Barber, D. L., Nakarai, T., Freeman, G. J., Gribben, J. G., Bernstein, G. M., ... & Nadler, L. M. (1994).** Prevention of T cell anergy by signaling through the  $\gamma$ c chain of the IL-2 receptor. *Science*, *266*(5187), 1039-1042.
- Boyman, O., Kovar, M., Rubinstein, M. P., Surh, C. D., & Sprent, J. (2006).** Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science*, *311*(5769), 1924-1927.
- Boyman, O., & Sprent, J. (2012).** The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, *12*(3), 180-190.



- Briso, E. M., Dienz, O., & Rincon, M. (2008).** Cutting edge: soluble IL-6R is produced by IL-6R ectodomain shedding in activated CD4 T cells. *The Journal of Immunology*, *180*(11), 7102-7106.
- Brockhausen, I., Schachter, H., & Stanley, P. (2009).** O-GalNAc glycans. *Essentials of Glycobiology. 2nd edition.*
- Buchbinder, E. I., Dutcher, J. P., Daniels, G. A., Curti, B. D., Patel, S. P., Holtan, S. G., ... & McDermott, D. F. (2019).** Therapy with high-dose Interleukin-2 (HD IL-2) in metastatic melanoma and renal cell carcinoma following PD1 or PDL1 inhibition. *Journal for immunotherapy of cancer*, *7*(1), 1-7.
- Busse, D., de la Rosa, M., Hobiger, K., Thurley, K., Flossdorf, M., Scheffold, A., & Höfer, T. (2010).** Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(7), 3058-3063.
- Cabrera, R., Ararat, M., Eksioğlu, E. A., Cao, M., Xu, Y., Wasserfall, C., ... & Nelson, D. R. (2010).** Influence of serum and soluble CD25 (sCD25) on regulatory and effector T-cell function in hepatocellular carcinoma. *Scandinavian journal of immunology*, *72*(4), 293-301.
- Caruso, C., Candore, G., Cigna, D., Colucci, A. T., & Modica, M. A. (1993).** Biological significance of soluble IL-2 receptor. *Mediators of inflammation*, *2*(1), 3-21.
- Chaimowitz, N. S., Martin, R. K., Cichy, J., Gibb, D. R., Patil, P., Kang, D. J., ... & Conrad, D. H. (2011).** A disintegrin and metalloproteinase 10 regulates antibody production and maintenance of lymphoid architecture. *The Journal of Immunology*, *187*(10), 5114-5122.
- Chalaris, A., Adam, N., Sina, C., Rosenstiel, P., Lehmann-Koch, J., Schirmacher, P., ... & Rose-John, S. (2010).** Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(8), 1617-1624.
- Chalaris, A., Garbers, C., Rabe, B., Rose-John, S., & Scheller, J. (2011).** The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *European journal of cell biology*, *90*(6-7), 484-494.
- Chalaris, A., Rabe, B., Paliga, K., Lange, H., Laskay, T., Fielding, C. A., ... & Scheller, J. (2007).** Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *110*(6), 1748-1755.
- Chatila, T. A. L. A. L., Silverman, L., Miller, R., & Geha, R. (1989).** Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *Journal of immunology*, *143*(4), 1283-1289.
- Chi, H. (2012).** Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nature reviews immunology*, *12*(5), 325-338.
- Cosman, D., Pat Cerretti, D., Larsen, A., Park, L., March, C., Dower, S., ... & Urdal, D. (1984).** Cloning, sequence and expression of human interleukin-2 receptor. *Nature*, *312*(5996), 768-771.

- Cote-Sierra, J., Foucras, G., Guo, L., Chiodetti, L., Young, H. A., Hu-Li, J., ... & Paul, W. E. (2004).** Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(11), 3880-3885.
- Damoiseaux, J. (2020).** The IL-2–IL-2 receptor pathway in health and disease: The role of the soluble IL-2 receptor. *Clinical Immunology*, 218, 108515.
- Dang, M., Dubbin, K., D'Aiello, A., Hartmann, M., Lodish, H., & Herrlich, A. (2011).** Epidermal growth factor (EGF) ligand release by substrate-specific  $\alpha$  disintegrin and metalloproteases (ADAMs) involves different protein kinase C (PKC) isoenzymes depending on the stimulus. *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 17704-17713.
- Darnell, J. E. (1997).** STATs and gene regulation. *Science*, 277(5332), 1630-1635.
- Depper, J. M., Leonard, W. J., Krönke, M., Noguchi, P. D., Cunningham, R. E., Waldmann, T. A., & Greene, W. C. (1984).** Regulation of interleukin 2 receptor expression: effects of phorbol diester, phospholipase C, and reexposure to lectin or antigen. *The Journal of Immunology*, 133(6), 3054-3061.
- Depper, J. M., Leonard, W. J., Drogula, C., Krönke, M., Waldmann, T. A., & Greene, W. C. (1985).** Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(12), 4230-4234.
- De Jong, M., & Maina, T. (2010).** Of mice and humans: Are they the same?—Implications in cancer translational research. *Journal of Nuclear Medicine*, 51(4), 501-504.
- De Rie, M. A., Zonneveld, I. M., Witkamp, L., Van Lier, R. A., Out, T. A., & Bos, J. D. (1996).** Soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) is a marker of disease activity in psoriasis: a comparison of sIL-2R, sCD27, sCD4, sCD8 and sICAM-1. *Acta dermato-venereologica*, 76(5), 357-360.
- Díaz-Rodríguez, E., Montero, J. C., Esparís-Ogando, A., Yuste, L., & Pandiella, A. (2002).** Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor  $\alpha$ -converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Molecular biology of the cell*, 13(6), 2031-2044.
- Dik, W. A., & Heron, M. (2020).** Clinical significance of soluble interleukin-2 receptor measurement in immune-mediated diseases. *Neth J Med*, 78(5), 220-231.
- Ding, D. X. H., Vera, J. C., Heaney, M. L., & Golde, D. W. (1995).** N-Glycosylation of the Human Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor Receptor  $\alpha$  Subunit Is Essential for Ligand Binding and Signal Transduction (\*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(41), 24580-24584.
- Dreymueller, D., Uhlig, S., & Ludwig, A. (2015).** ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 308(4), L325-L343.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., ... & Rosenberg, S. A. (2002).** Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*, 298(5594), 850-854.

- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., ... & Rosenberg, S. A. (2005).** Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(10), 2346.
- Duffy, M. J., McKiernan, E., O'Donovan, N., & McGowan, P. M. (2009).** The role of ADAMs in disease pathophysiology. *Clinica Chimica Acta*, 403(1-2), 31-36.
- Dukovich, M., Wano, Y., Katz, P., Cullen, B. R., Kehrl, J. H., & Greene, W. C. (1987).** A second human interleukin-2 binding protein that may be a component of high-affinity interleukin-2 receptors. *Nature*, 327(6122), 518-522.
- Düsterhöft, S., Höbel, K., Oldefest, M., Lokau, J., Waetzig, G. H., Chalaris, A., ... & Grötzinger, J. (2014).** A disintegrin and metalloprotease 17 dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 289(23), 16336-16348.
- Düsterhöft, S., Michalek, M., Kordowski, F., Oldefest, M., Sommer, A., Röseler, J., ... & Lorenzen, I. (2015).** Extracellular juxtamembrane segment of ADAM17 interacts with membranes and is essential for its shedding activity. *Biochemistry*, 54(38), 5791-5801.
- Edwards, D. R., Handsley, M. M., & Pennington, C. J. (2008).** The ADAM metalloproteinases. *Molecular aspects of medicine*, 29(5), 258-289.
- Eicher, D. M., & Waldmann, T. A. (1998).** IL-2R $\alpha$  on one cell can present IL-2 to IL-2R $\beta$ / $\gamma$ c on another cell to augment IL-2 signaling. *The Journal of Immunology*, 161(10), 5430-5437.
- El Houda Agueznay, N., Badoual, C., Hans, S., Gey, A., Vingert, B., Peyrard, S., ... & Tartour, E. (2007).** Soluble interleukin-2 receptor and metalloproteinase-9 expression in head and neck cancer: prognostic value and analysis of their relationships. *Clinical & Experimental Immunology*, 150(1), 114-123.
- Endres, K., Anders, A., Kojro, E., Gilbert, S., Fahrenholz, F., & Postina, R. (2003).** Tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *European journal of biochemistry*, 270(11), 2386-2393.
- Erduran, E., Aslan, Y., Aliyazicioğlu, Y., Mocan, H., & Gedik, Y. (1998).** Plasma soluble interleukin-2 receptor levels in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *American journal of hematology*, 57(2), 119-123.
- Filipovich, A. H. (2008).** Hemophagocytic lymphohistiocytosis and other hemophagocytic disorders. *Immunology and allergy clinics of North America*, 28(2), 293-313.
- Fluckiger, A. C., Garrone, P., Durand, I., Galizzi, J. P., & Banchereau, J. (1993).** Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 178(5), 1473-1481.
- Folgosa, L., Zellner, H. B., El Shikh, M. E., & Conrad, D. H. (2013).** Disturbed follicular architecture in B cell A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 10 knockouts is mediated by compensatory increases in ADAM17 and TNF- $\alpha$  shedding. *The Journal of Immunology*, 191(12), 5951-5958.

- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2005).** A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature immunology*, 6(11), 1142-1151.
- Franke, T. F., Kaplan, D. R., & Cantley, L. C. (1997).** PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, 88(4), 435-437.
- Friedmann, M. C., Migone, T. S., Russell, S. M., & Leonard, W. J. (1996).** Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(5), 2077-2082.
- Froussard, P., Jankovic, D. L., Chastagner, P., & Theze, J. (1991).** Induction of mouse p55 interleukin-2 receptor gene expression by IL-2 and IL-4 and characterization of its transcription initiation sites. *Molecular immunology*, 28(1-2), 87-93.
- Fujii, H., Nakagawa, Y., Schindler, U., Kawahara, A., Mori, H., Gouilleux, F., ... & Miyazaki, T. (1995).** Activation of Stat5 by interleukin 2 requires a carboxyl-terminal region of the interleukin 2 receptor beta chain but is not essential for the proliferative signal transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12), 5482-5486.
- Furue, M., Sugiyama, H., Tsukamoto, K., Ohtake, N., & Tamaki, K. (1994).** Serum soluble IL-2 receptor (sIL-2R) and eosinophil cationic protein (ECP) levels in atopic dermatitis. *Journal of dermatological science*, 7(2), 89-95.
- Gaffen, S. L. (2001).** Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine*, 14(2), 63-77.
- Gaffen, S. L., Lai, S. Y., Xu, W., Gouilleux, F., Groner, B., Goldsmith, M. A., & Greene, W. C. (1995).** Signaling through the interleukin 2 receptor beta chain activates a STAT-5-like DNA-binding activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(16), 7192-7196.
- Gaffen, S. L., Wang, S., & Koshland, M. E. (1996).** Expression of the immunoglobulin J chain in a murine B lymphoma is driven by autocrine production of interleukin 2. *Cytokine*, 8(7), 513-524.
- Gallo, P., Piccinno, M. G., Tavalato, B., & Sidén, Å. (1991).** A longitudinal study on IL-2, sIL-2R, IL-4 and IFN- $\gamma$  in multiple sclerosis CSF and serum. *Journal of the neurological sciences*, 101(2), 227-232.
- Garbers, C. (2011).** Der Interleukin-6 Rezeptor: Spezies-spezifische Unterschiede der proteolytischen Freisetzung durch die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 zwischen Maus und Mensch (Doctoral dissertation, Christian-Albrechts Universität Kiel).
- Garbers, C., Jänner, N., Chalaris, A., Moss, M. L., Floss, D. M., Meyer, D., ... & Scheller, J. (2011).** Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *Journal of Biological Chemistry*, 286(17), 14804-14811.
- Gearing, A. J. H., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J. D. A. H., Davidson, A. H., ... & Woolley, K. (1994).** Processing of tumour necrosis factor- $\alpha$  precursor by metalloproteinases. *Nature*, 370(6490), 555-557.

- Gibb, D. R., El Shikh, M., Kang, D. J., Rowe, W. J., El Sayed, R., Cichy, J., ... & Conrad, D. H. (2010).** ADAM10 is essential for Notch2-dependent marginal zone B cell development and CD23 cleavage in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 207(3), 623-635.
- Gibb, D. R., Saleem, S. J., Chaimowitz, N. S., Mathews, J., & Conrad, D. H. (2011).** The emergence of ADAM10 as a regulator of lymphocyte development and autoimmunity. *Molecular immunology*, 48(11), 1319-1327.
- Godfrey, V. L., Wilkinson, J. E., & Russell, L. B. (1991).** X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *The American journal of pathology*, 138(6), 1379.
- Goldsmith, M. A., Lai, S. Y., Xu, W., Amaral, M. C., Kuczek, E. S., Parent, L. J., ... & Greene, W. C. (1995).** Growth Signal Transduction by the Human Interleukin-2 Receptor Requires Cytoplasmic Tyrosines of the  $\beta$  Chain and Non-tyrosine Residues of the  $\gamma$  Chain. *Journal of Biological Chemistry*, 270(37), 21729-21737.
- Goth, C. K., Halim, A., Khetarpal, S. A., Rader, D. J., Clausen, H., & Schjoldager, K. T. B. (2015).** A systematic study of modulation of ADAM-mediated ectodomain shedding by site-specific O-glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(47), 14623-14628.
- Gotoh, Y., Okamoto, Y., Uemura, O., Mori, N., Tanaka, S., Ando, T., & Nishida, M. (1999).** Determination of age-related changes in human soluble interleukin 2 receptor in body fluids of normal subjects as a control value against disease states. *Clinica chimica acta*, 289(1-2), 89-97.
- Gough, P. J., Garton, K. J., Wille, P. T., Rychlewski, M., Dempsey, P. J., & Raines, E. W. (2004).** A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16. *The Journal of Immunology*, 172(6), 3678-3685.
- Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., ... & Ricciardi-Castagnoli, P. (2001).** Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nature immunology*, 2(9), 882-888.
- Green, D. R., Droin, N., & Pinkoski, M. (2003).** Activation-induced cell death in T cells. *Immunological reviews*, 193(1), 70-81.
- Grötzinger, J. (2002).** Molecular mechanisms of cytokine receptor activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1592(3), 215-223.
- Gruss, H. J., Brach, M. A., Drexler, H. G., Bonifer, R., Mertelsmann, R. H., & Herrmann, F. (1992).** Expression of cytokine genes, cytokine receptor genes, and transcription factors in cultured Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Cancer research*, 52(12), 3353-3360.
- Hagedorn, A. (2021).** Einfluss der Glykosylierungen auf die Proteolyse des Interleukin-2-Alpha-Rezeptors. (Masterarbeit, Otto von Guericke Universität Magdeburg).
- Han, J. W., Joo, D. J., Kim, J. H., Rha, M. S., Koh, J. Y., Park, H. J., ... & Park, S. H. (2020).** Early reduction of regulatory T cells is associated with acute rejection in liver transplantation under tacrolimus-based immunosuppression with basiliximab induction. *American Journal of Transplantation*, 20(8), 2058-2069.

- Hartmann, D., De Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., ... & Saftig, P. (2002).** The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for  $\alpha$ -secretase activity in fibroblasts. *Human molecular genetics*, 11(21), 2615-2624.
- Hashim, M., Alsebaey, A., Ragab, A., Soliman, H. E., & Waked, I. (2020).** Efficacy and safety of basiliximab as initial immunosuppression in liver transplantation: a single center study. *Annals of Hepatology*, 19(5), 541-545.
- Hershko, A. Y., Suzuki, R., Charles, N., Alvarez-Errico, D., Sargent, J. L., Laurence, A., & Rivera, J. (2011).** Mast cell interleukin-2 production contributes to suppression of chronic allergic dermatitis. *Immunity*, 35(4), 562-571.
- Hikita, A., Tanaka, N., Yamane, S., Ikeda, Y., Furukawa, H., Tohma, S., ... & Fukui, N. (2009).** Involvement of a disintegrin and metalloproteinase 10 and 17 in shedding of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Biochemistry and cell biology*, 87(4), 581-593.
- Holter, W. C. L. D. W. T., Goldman, C. K., Casabo, L., Nelson, D. L., Greene, W. C., & Waldmann, T. A. (1987).** Expression of functional IL 2 receptors by lipopolysaccharide and interferon-gamma stimulated human monocytes. *The Journal of Immunology*, 138(9), 2917-2922.
- Hooper, N. M., Karran, E. H., & Turner, A. J. (1997).** Membrane protein secretases. *Biochemical Journal*, 321(2), 265-279.
- Horiuchi, K., Le Gall, S., Schulte, M., Yamaguchi, T., Reiss, K., Murphy, G., ... & Blobel, C. P. (2007).** Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Molecular biology of the cell*, 18(1), 176-188.
- Huovila, A. P. J., Turner, A. J., Pelto-Huikko, M., Kärkkäinen, I., & Ortiz, R. M. (2005).** Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends in biochemical sciences*, 30(7), 413-422.
- Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T. A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., ... & Ludwig, A. (2003).** The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*, 102(4), 1186-1195.
- Hundhausen, C., Schulte, A., Schulz, B., Andrzejewski, M. G., Schwarz, N., von Hundelshausen, P., ... & Ludwig, A. (2007).** Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. *The Journal of Immunology*, 178(12), 8064-8072.
- Hunter, C. A. (2005).** New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nature Reviews Immunology*, 5(7), 521-531.
- Jackson, H. W., Defamie, V., Waterhouse, P., & Khokha, R. (2017).** TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 17(1), 38-53.
- Jacques, Y., Le Mauff, B., Boeffard, F., Godard, A., & Soullillou, J. P. (1987).** A soluble interleukin 2 receptor produced by a normal alloreactive human T cell clone binds interleukin 2 with low affinity. *The Journal of Immunology*, 139(7), 2308-2316.

- Johnston, J. A., Kawamura, M., Kirken, R. A., Chen, Y. Q., Blake, T. B., Shibuya, K., ... & O'Shea, J. J. (1994). Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. *Nature*, 370(6485), 151-153.
- Johnston, R. J., Choi, Y. S., Diamond, J. A., Yang, J. A., & Crotty, S. (2012). STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine*, 209(2), 243-250.
- Jones, S. A., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N., & Fuller, G. M. (2001). The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *The FASEB Journal*, 15(1), 43-58.
- Jones, J. C., Rustagi, S., & Dempsey, P. J. (2016). ADAM proteases and gastrointestinal function. *Annual review of physiology*, 78, 243.
- Kashima, N., Nishi-Takaoka, C., Fujita, T., Taki, S., Yamada, G., Hamuro, J., & Taniguchi, T. (1985). Unique structure of murine interleukin-2 as deduced from cloned cDNAs. *Nature*, 313(6001), 402-404.
- Kefaloyianni, E. (2022). Soluble forms of cytokine and growth factor receptors: mechanisms of generation and modes of action in the regulation of local and systemic inflammation. *FEBS letters*, 596(5), 589-606.
- Kelly, E., Won, A., Refaeli, Y., & Van Parijs, L. (2002). IL-2 and related cytokines can promote T cell survival by activating AKT. *The Journal of Immunology*, 168(2), 597-603.
- Killock, D. J., & Ivetić, A. (2010). The cytoplasmic domains of TNF $\alpha$ -converting enzyme (TACE/ADAM17) and L-selectin are regulated differently by p38 MAPK and PKC to promote ectodomain shedding. *Biochemical Journal*, 428(2), 293-304.
- Kim, H. P., Imbert, J., & Leonard, W. J. (2006). Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine & growth factor reviews*, 17(5), 349-366.
- Kirschke, S., Ogunsulire, I., Selvakumar, B., Schumacher, N., Sezin, T., Rose-John, S., ... & Lokau, J. (2022). The metalloprotease ADAM10 generates soluble interleukin-2 receptor alpha (sIL-2R $\alpha$ /sCD25) in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 101910.
- Klatzmann, D., & Abbas, A. K. (2015). The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*, 15(5), 283-294.
- Kniep, E. M., Strelow, I., & Lohmann-Matthes, M. L. (1992). The monocyte interleukin-2 receptor light chain: production of cell-associated and soluble interleukin-2 receptor by monocytes. *Immunology*, 75(2), 299.
- Kobayashi, H., Tagaya, Y., Han, E. S., Kim, I. S., Le, N., Paik, C. H., ... & Carrasquillo, J. A. (1999). Use of an antibody against the soluble interleukin 2 receptor  $\alpha$  subunit can modulate the stability and biodistribution of interleukin-2. *Cytokine*, 11(12), 1065-1075.
- Koreth, J., Matsuoka, K. I., Kim, H. T., McDonough, S. M., Bindra, B., Alyea III, E. P., ... & Soiffer, R. J. (2011). Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *New England Journal of Medicine*, 365(22), 2055-2066.
- Kumrah, R., Vignesh, P., Patra, P., Singh, A., Anjani, G., Saini, P., ... & Rawat, A. (2020). Genetics of severe combined immunodeficiency. *Genes & Diseases*, 7(1), 52-61.

- Lai, K. N., Leung, J. C., & Lai, F. M. (1991). Soluble interleukin 2 receptor release, interleukin 2 production, and interleukin 2 receptor expression in activated T-lymphocytes in vitro. *Pathology*, 23(3), 224-228.
- Lambrecht, B. N., Vanderkerken, M., & Hammad, H. (2018). The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nature Reviews Immunology*, 18(12), 745-758.
- Laurence, A., Tato, C. M., Davidson, T. S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., ... & O'shea, J. J. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, 26(3), 371-381.
- Lenardo, M. J. (1991). Interleukin-2 programs mouse  $\alpha\beta$  T lymphocytes for apoptosis. *Nature*, 353(6347), 858-861.
- Lenardo, M., Chan, F. K. M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J., & Zheng, L. (1999). Mature T lymphocyte apoptosis—immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annual review of immunology*, 17(1), 221-253.
- Leonard, J. D., Lin, F., & Milla, M. E. (2005). Chaperone-like properties of the prodomain of TNF $\alpha$ -converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch. *Biochemical Journal*, 387(3), 797-805.
- Leonard, W. J. (2001). Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nature Reviews Immunology*, 1(3), 200-208.
- Leonard, W. J., Depper, J. M., Crabtree, G. R., Rudikoff, S., Pumphrey, J., Robb, R. J., ... & Greene, W. C. (1984). Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor. *Nature*, 311(5987), 626-631.
- Leonard, W. J., Krönke, M., Peffer, N. J., Depper, J. M., & Greene, W. C. (1985). Interleukin 2 receptor gene expression in normal human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(18), 6281-6285.
- Leonard, W. J., Lin, J. X., & O'Shea, J. J. (2019). The  $\gamma c$  family of cytokines: basic biology to therapeutic ramifications. *Immunity*, 50(4), 832-850.
- Leonard, W. J., & O'Shea, J. J. (1998). Jaks and STATs: biological implications. *Annual review of immunology*, 16, 293.
- Li, M. O., & Rudensky, A. Y. (2016). T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nature Reviews Immunology*, 16(4), 220-233.
- Liao, W., Schones, D. E., Oh, J., Cui, Y., Cui, K., Roh, T. Y., ... & Leonard, W. J. (2008). Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor  $\alpha$ -chain expression. *Nature immunology*, 9(11), 1288-1296.
- Liao, W., Lin, J. X., & Leonard, W. J. (2011a). IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Current opinion in immunology*, 23(5), 598-604.
- Liao, W., Lin, J. X., Wang, L., Li, P., & Leonard, W. J. (2011b). Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nature immunology*, 12(6), 551-559.
- Liao, W., Lin, J. X., & Leonard, W. J. (2013). Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*, 38(1), 13-25.



- Liao, W., Spolski, R., Li, P., Du, N., West, E. E., Ren, M., ... & Leonard, W. J. (2014).** Opposing actions of IL-2 and IL-21 on Th9 differentiation correlate with their differential regulation of BCL6 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(9), 3508-3513.
- Lin, J. X., & Leonard, W. J. (2000).** The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene*, *19*(21), 2566-2576.
- Lin, J. X., & Leonard, W. J. (2018).** The common cytokine receptor  $\gamma$  chain family of cytokines. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *10*(9), a028449.
- Lin, J. X., Li, P., Liu, D., Jin, H. T., He, J., Rasheed, M. A. U., ... & Leonard, W. J. (2012).** Critical Role of STAT5 transcription factor tetramerization for cytokine responses and normal immune function. *Immunity*, *36*(4), 586-599.
- Lindqvist, C. A., Christiansson, L. H., Simonsson, B., Enblad, G., Olsson-Strömberg, U., & Loskog, A. S. (2010).** T regulatory cells control T-cell proliferation partly by the release of soluble CD25 in patients with B-cell malignancies. *Immunology*, *131*(3), 371-376.
- Link, M. A., Lücke, K., Schmid, J., Schumacher, V., Eden, T., Rose-John, S., & Mittrücker, H. W. (2017).** The role of ADAM17 in the T-cell response against bacterial pathogens. *PLoS one*, *12*(9), e0184320.
- Littman, D. R., & Rudensky, A. Y. (2010).** Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*, *140*(6), 845-858.
- Lokau, J., Agthe, M., Flynn, C. M., & Garbers, C. (2017).** Proteolytic control of Interleukin-11 and Interleukin-6 biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1864*(11), 2105-2117.
- Lokau, J., & Garbers, C. (2020).** Biological functions and therapeutic opportunities of soluble cytokine receptors. *Cytokine & growth factor reviews*, *55*, 94-108.
- Lokau, J., Nitz, R., Agthe, M., Monhasery, N., Aparicio-Siegmund, S., Schumacher, N., ... & Garbers, C. (2016).** Proteolytic cleavage governs interleukin-11 trans-signaling. *Cell reports*, *14*(7), 1761-1773.
- Lorenzen, I., Dingley, A. J., Jacques, Y., & Grötzinger, J. (2006).** The structure of the interleukin-15 $\alpha$  receptor and its implications for ligand binding. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(10), 6642-6647.
- Lorenzen, I., Lokau, J., Korpys, Y., Oldefest, M., Flynn, C. M., Künzel, U., ... & Düsterhöft, S. (2016).** Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation. *Scientific reports*, *6*(1), 1-15.
- Loughnan, M. S., Takatsu, K., Harada, N., & Nossal, G. J. (1987).** T-cell-replacing factor (interleukin 5) induces expression of interleukin 2 receptors on murine splenic B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(15), 5399-5403.
- Lowenthal, J. W., & Greene, W. C. (1987).** Contrasting interleukin 2 binding properties of the alpha (p55) and beta (p70) protein subunits of the human high-affinity interleukin 2 receptor. *The Journal of experimental medicine*, *166*(4), 1156-1161.
- Lu, D., Yang, C., & Liu, Z. (2012).** How hydrophobicity and the glycosylation site of glycans affect protein folding and stability: a molecular dynamics simulation. *The Journal of Physical Chemistry B*, *116*(1), 390-400.

- Lucey, D. R., Clerici, M., & Shearer, G. M. (1996).** Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clinical microbiology reviews*, 9(4), 532-562.
- Lutterotti, A., & Martin, R. (2008).** Getting specific: monoclonal antibodies in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, 7(6), 538-547.
- Maier, L. M., Anderson, D. E., Severson, C. A., Baecher-Allan, C., Healy, B., Liu, D. V., ... & Hafler, D. A. (2009).** Soluble IL-2RA levels in multiple sclerosis subjects and the effect of soluble IL-2RA on immune responses. *The Journal of Immunology*, 182(3), 1541-1547.
- Malek, T. R. (2008).** The biology of interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.*, 26, 453-479.
- Malek, T. R., & Castro, I. (2010).** Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity*, 33(2), 153-165.
- Manoussakis, M. N., Stavropoulos, E. D., Germanidis, G. S., Papasteriades, C. A., Garalea, K. L., Dontas, A. S., & Moutsopoulos, H. M. (1990).** Soluble Interleukin-2 Receptors and Auto Antibodies in the Serum of Healthy Elderly Individuals. *Autoimmunity*, 7(2-3), 129-137.
- Maretzky, T., Evers, A., Le Gall, S., Alabi, R. O., Speck, N., Reiss, K., & Blobel, C. P. (2015).** The cytoplasmic domain of a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) regulates its constitutive activity but is dispensable for stimulated ADAM10-dependent shedding. *Journal of Biological Chemistry*, 290(12), 7416-7425.
- Maretzky, T., Scholz, F., Köten, B., Proksch, E., Saftig, P., & Reiss, K. (2008).** ADAM10-mediated E-cadherin release is regulated by proinflammatory cytokines and modulates keratinocyte cohesion in eczematous dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(7), 1737-1746.
- Maretzky, T., Schulte, M., Ludwig, A., Rose-John, S., Blobel, C., Hartmann, D., ... & Reiss, K. (2005).** L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/ $\gamma$ -secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Molecular and cellular biology*, 25(20), 9040-9053.
- Masopust, D., Sivula, C. P., & Jameson, S. C. (2017).** Of mice, dirty mice, and men: using mice to understand human immunology. *The Journal of Immunology*, 199(2), 383-388.
- Matthews, V., Schuster, B., Schütze, S., Bussmeyer, I., Ludwig, A., Hundhausen, C., ... & Rose-John, S. (2003).** Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *Journal of biological chemistry*, 278(40), 38829-38839.
- McDermott, D. F., & Atkins, M. B. (2006).** Interleukin-2 therapy of metastatic renal cell carcinoma—predictors of response. In *Seminars in oncology* (Vol. 33, No. 5, pp. 583-587). WB Saunders.
- Medrano, R. F., Hunger, A., Mendonça, S. A., Barbuto, J. A. M., & Strauss, B. E. (2017).** Immunomodulatory and antitumor effects of type I interferons and their application in cancer therapy. *Oncotarget*, 8(41), 71249.

- Miedel, M. C., Hulmes, J. D., Weber, D. V., Bailon, P., & Pan, Y. C. E. (1988).** Structural analysis of recombinant soluble human interleukin-2 receptor primary structure, assignment of disulfide bonds and core IL-2 binding structure. *Biochemical and biophysical research communications*, 154(1), 372-379.
- Miller, M. A., Sullivan, R. J., & Lauffenburger, D. A. (2017).** Molecular Pathways: Receptor Ectodomain Shedding in Treatment, Resistance, and Monitoring of Cancer Receptor Shedding in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(3), 623-629.
- Minami, Y., Nakagawa, Y., Kawahara, A., Miyazaki, T., Sada, K., Yamamura, H., & Taniguchi, T. (1995).** Protein tyrosine kinase Syk is associated with and activated by the IL-2 receptor: possible link with the c-myc induction pathway. *Immunity*, 2(1), 89-100.
- Minami, Y., & Taniguchi, T. (1995).** IL-2 signaling: recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the components of the IL-2 receptor. *Current opinion in cell biology*, 7(2), 156-162.
- Mingari, M. C., Gerosa, F., Carra, G., Accolla, R. S., Moretta, A., Zubler, R. H., ... & Moretta, L. (1984).** Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. *Nature*, 312(5995), 641-643.
- Mitchell, D. M., Ravkov, E. V., & Williams, M. A. (2010).** Distinct roles for IL-2 and IL-15 in the differentiation and survival of CD8<sup>+</sup> effector and memory T cells. *The Journal of Immunology*, 184(12), 6719-6730.
- Miyazaki, T., Kawahara, A., Fujii, H., Nakagawa, Y., Minami, Y., Liu, Z. J., ... & Taniguchi, T. (1994).** Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science*, 266(5187), 1045-1047.
- Mohammed, F. F., Smookler, D. S., Taylor, S. E., Fingleton, B., Kassiri, Z., Sanchez, O. H., ... & Khokha, R. (2004).** Abnormal TNF activity in Timp3<sup>-/-</sup> mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. *Nature genetics*, 36(9), 969-977.
- Möller-Hackbarth, K., Dewitz, C., Schweigert, O., Trad, A., Garbers, C., Rose-John, S., & Scheller, J. (2013).** A disintegrin and metalloprotease (ADAM) 10 and ADAM17 are major sheddases of T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (Tim-3). *Journal of Biological Chemistry*, 288(48), 34529-34544.
- Moraes-Vasconcelos, D., Costa-Carvalho, B. T., Torgerson, T. R., & Ochs, H. D. (2008).** Primary immune deficiency disorders presenting as autoimmune diseases: IPEX and APECED. *Journal of clinical immunology*, 28(1), 11-19.
- Morgan, D. A., Ruscetti, F. W., & Gallo, R. (1976).** Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*, 193(4257), 1007-1008.
- Morris, J. C., & Waldmann, T. A. (2000).** Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment. *Annals of the rheumatic diseases*, 59(1), 109-114.
- Mortier, E., Bernard, J., Plet, A., & Jacques, Y. (2004).** Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor  $\alpha$ -chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. *The Journal of Immunology*, 173(3), 1681-1688.
- Mottershead, M., & Neuberger, J. (2007).** Daclizumab. *Expert opinion on biological therapy*, 7(10), 1583-1596.

- Moss, M. L., Bomar, M., Liu, Q., Sage, H., Dempsey, P., Lenhart, P. M., ... & Zhou, P. (2007).** The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *Journal of Biological Chemistry*, 282(49), 35712-35721.
- Müllberg, J., Althoff, K., Jostock, T., & Rose-John, S. (2000).** The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *European cytokine network*, 11(1), 27-38.
- Müllberg, J., Oberthür, W., Lottspeich, F., Mehl, E., Dittrich, E., Graeve, L., ... & Rose-John, S. (1994).** The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *The Journal of Immunology*, 152(10), 4958-4968.
- Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Günther, M., Graeve, L., Buse, G., ... & Rose-John, S. (1993).** The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *European journal of immunology*, 23(2), 473-480.
- Mullooly, M., McGowan, P. M., Crown, J., & Duffy, M. J. (2016).** The ADAMs family of proteases as targets for the treatment of cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 17(8), 870-880.
- Murakami, J., Arita, K., Wada, A., Mihara, H., Origasa, H., Kigawa, M., ... & Sato, T. (2019).** Serum soluble interleukin-2 receptor levels for screening for malignant lymphomas and differential diagnosis from other conditions. *Molecular and Clinical Oncology*, 11(5), 474-482.
- Nair, M. P., Nampoory, M. R. N., Johny, K. V., Costandi, J. N., Abdulhalim, M., El-Reshaid, W., ... & Al-Mousawi, M. (2001).** Induction immunosuppression with interleukin-2 receptor antibodies (basiliximab and daclizumab) in renal transplant recipients. In *Transplantation proceedings*, 33(5), 2767-2769.
- Nakamura, Y., Russell, S. M., Mess, S. A., Friedmann, M., Erdos, M., Francois, C., ... & Leonard, W. J. (1994).** Heterodimerization of the IL-2 receptor  $\beta$ - and  $\gamma$ -chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature*, 369(6478), 330-333.
- Nelson, B. H. (2004).** IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *The Journal of Immunology*, 172(7), 3983-3988.
- Nelson, B. H., Lord, J. D., & Greenberg, P. D. (1994).** Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor  $\beta$  and  $\gamma$  chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature*, 369(6478), 333-336.
- Nelson, B. H., Lord, J. D., & Greenberg, P. D. (1996).** A membrane-proximal region of the interleukin-2 receptor gamma c chain sufficient for Jak kinase activation and induction of proliferation in T cells. *Molecular and cellular biology*, 16(1), 309-317.
- Nelson, B. H., & Willerford, D. M. (1998).** Biology of the interleukin-2 receptor. *Advances in immunology*, 70, 1-81.
- Nelson, D. L., Rubin, L. A., Kurman, C. C., Fritz, M. E., & Boutin, B. (1986).** An analysis of the cellular requirements for the production of soluble interleukin-2 receptors in vitro. *Journal of clinical immunology*, 6(2), 114-120.
- Nikaido, T., Shimizu, A., Ishida, N., Sabe, H., Teshigawara, K., Maeda, M., ... & Honjo, T. (1984).** Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor. *Nature*, 311(5987), 631-635.

- Nurieva, R. I., Podd, A., Chen, Y., Alekseev, A. M., Yu, M., Qi, X., ... & Wang, D. (2012).** STAT5 protein negatively regulates T follicular helper (Tfh) cell generation and function. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 11234-11239.
- Oestreich, K. J., Mohn, S. E., & Weinmann, A. S. (2012).** Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH 1 cells to regulate flexibility with a T FH-like gene profile. *Nature immunology*, 13(4), 405-411.
- Orlando, S., Sironi, M., Bianchi, G., Drummond, A. H., Boraschi, D., Yabes, D., & Mantovani, A. (1997).** Role of metalloproteases in the release of the IL-1 type II decoy receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 272(50), 31764-31769.
- O'Shea, J. J., Gadina, M., & Siegel, R. M. (2019).** Cytokines and cytokine receptors. In *Clinical immunology*. Elsevier, 127-155.
- Paliard, X., de Waal Malefijt, R., Yssel, H., Blanchard, D., Chretien, I., Abrams, J., ... & Spits, H. (1988).** Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *The Journal of Immunology*, 141(3), 849-855.
- Parker, B. S., Rautela, J., & Hertzog, P. J. (2016).** Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(3), 131-144.
- Parodi, A., Cummings, R. D., & Aebi, M. (2017).** Glycans in glycoprotein quality control. *Essentials of Glycobiology [Internet]*. 3rd edition.
- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., ... & Black, R. A. (1998).** An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, 282(5392), 1281-1284.
- Pesu, M., Candotti, F., Husa, M., Hofmann, S. R., Notarangelo, L. D., & O'Shea, J. J. (2005).** Jak3, severe combined immunodeficiency, and a new class of immunosuppressive drugs. *Immunological reviews*, 203(1), 127-142.
- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., & Rizzuto, R. (2008).** Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*, 27(50), 6407-6418.
- Plaetinck, G., Combe, M. C., Corthesy, P., Sperisen, P., Kanamori, H., Honjo, T., & Nabholz, M. (1990).** Control of IL-2 receptor-alpha expression by IL-1, tumor necrosis factor, and IL-2. Complex regulation via elements in the 5'flanking region. *The Journal of Immunology*, 145(10), 3340-3347.
- Powell, J. D., Pollizzi, K. N., Heikamp, E. B., & Horton, M. R. (2012).** Regulation of immune responses by mTOR. *Annual review of immunology*, 30, 39.
- Qiao, J., Luo, Q., Liu, N., Wei, G., Wu, X., Lu, J., ... & Xu, K. (2018).** Increased ADAM10 expression in patients with immune thrombocytopenia. *International immunopharmacology*, 55, 63-68.
- Ravichandran, K. S., Igras, V., Shoelson, S. E., Fesik, S. W., & Burakoff, S. J. (1996).** Evidence for a role for the phosphotyrosine-binding domain of Shc in interleukin 2 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(11), 5275-5280.
- Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2014).** MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research*, 42(1), 503-509.

- Reddy, P., Slack, J. L., Davis, R., Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Blanton, R. A., ... & Black, R. A. (2000).** Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19), 14608-14614.
- Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C. A., Tschopp, J., & Abbas, A. K. (1998).** Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity*, 8(5), 615-623.
- Reiss, K., Ludwig, A., & Saftig, P. (2006).** Breaking up the tie: disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion. *Pharmacology & therapeutics*, 111(3), 985-1006.
- Rickert, M., Wang, X., Boulanger, M. J., Goriatcheva, N., & Garcia, K. C. (2005).** The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor. *Science*, 308(5727), 1477-1480.
- Riethmüller, S., Ehlers, J. C., Lokau, J., Düsterhöft, S., Knittler, K., Dombrowsky, G., ... & Garbers, C. (2016).** Cleavage site localization differentially controls interleukin-6 receptor proteolysis by ADAM10 and ADAM17. *Scientific reports*, 6(1), 1-14.
- Riethmüller, S., Somasundaram, P., Ehlers, J. C., Hung, C. W., Flynn, C. M., Lokau, J., ... & Garbers, C. (2017).** Proteolytic origin of the soluble human IL-6R in vivo and a decisive role of N-glycosylation. *PLoS biology*, 15(1), e2000080.
- Robb, R. J., Munck, A., & Smith, K. A. (1981).** T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance. *The Journal of experimental medicine*, 154(5), 1455-1474.
- Robb, R. J., & Kutny, R. M. (1987).** Structure-function relationships for the IL 2-receptor system. IV. Analysis of the sequence and ligand-binding properties of soluble Tac protein. *The Journal of Immunology*, 139(3), 855-862.
- Rooke, J., Pan, D., Xu, T., & Rubin, G. M. (1996).** KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in Drosophila neurogenesis. *Science*, 273(5279), 1227-1231.
- Rose-John, S., Waetzig, G. H., Scheller, J., Grötzinger, J., & Seeger, D. (2007).** The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert opinion on therapeutic targets*, 11(5), 613-624.
- Rosenberg, S. A. (2014).** IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *The Journal of Immunology*, 192(12), 5451-5458.
- Rosenzweig, M., Lorenzon, R., Cacoub, P., Pham, H. P., Pitoiset, F., El Soufi, K., ... & Klatzmann, D. (2019).** Immunological and clinical effects of low-dose interleukin-2 across 11 autoimmune diseases in a single, open clinical trial. *Annals of the rheumatic diseases*, 78(2), 209-217.
- Ross, S. H., Rollings, C., Anderson, K. E., Hawkins, P. T., Stephens, L. R., & Cantrell, D. A. (2016).** Phosphoproteomic analyses of interleukin 2 signaling reveal integrated JAK kinase-dependent and-independent networks in CD8+ T cells. *Immunity*, 45(3), 685-700.
- Ross, S. H., Rollings, C., Anderson, K. E., Hawkins, P. T., Stephens, L. R., & Cantrell, D. A. (2016).** Phosphoproteomic analyses of interleukin 2 signaling reveal integrated JAK kinase-dependent and-independent networks in CD8+ T cells. *Immunity*, 45(3), 685-700.

- Röth, D., Krammer, P. H., & Gülow, K. (2014). Dynamin related protein 1-dependent mitochondrial fission regulates oxidative signalling in T cells. *FEBS letters*, *588*(9), 1749-1754.
- Rowlands, D. J., Islam, M. N., Das, S. R., Huertas, A., Quadri, S. K., Horiuchi, K., ... & Bhattacharya, J. (2011). Activation of TNFR1 ectodomain shedding by mitochondrial Ca<sup>2+</sup> determines the severity of inflammation in mouse lung microvessels. *The Journal of clinical investigation*, *121*(5), 1986-1999.
- Rubin, L. A., Galli, F., Greene, W. C., Nelson, D. L., & Jay, G. (1990). The molecular basis for the generation of the human soluble interleukin 2 receptor. *Cytokine*, *2*(5), 330-336.
- Rubin, L. A., Jay, G., & Nelson, D. L. (1986). The released interleukin 2 receptor binds interleukin 2 efficiently. *The Journal of Immunology*, *137*(12), 3841-3844.
- Rubin, L. A., Kurman, C. C., Fritz, M. E., Biddison, W. E., Boutin, B., Yarchoan, R., & Nelson, D. L. (1985). Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. *The Journal of Immunology*, *135*(5), 3172-3177.
- Rubin, L. A., & Nelson, D. L. (1990). The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application. *Annals of internal medicine*, *113*(8), 619-627.
- Rubinstein, M. P., Kovar, M., Purton, J. F., Cho, J. H., Boyman, O., Surh, C. D., & Sprent, J. (2006). Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R $\alpha$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(24), 9166-9171.
- Russell, S. M., Johnston, J. A., Noguchi, M., Kawamura, M., Bacon, C. M., Friedmann, M., ... & Leonard, W. J. (1994). Interaction of IL-2R $\beta$  and  $\gamma$ c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. *Science*, *266*(5187), 1042-1045.
- Russell, S. E., Moore, A. C., Fallon, P. G., & Walsh, P. T. (2012). Soluble IL-2R $\alpha$  (sCD25) exacerbates autoimmunity and enhances the development of Th17 responses in mice. *PloS one*, *7*(10), e47748.
- Ryffel, B., Willcocks, J. L., Brooks, N., & Woerly, G. (1995). Interleukin-2 receptor (CD25) upregulation on human T-lymphocytes: sensitivity to immunosuppressants is defined by the mode of T-lymphocyte activation. *Immunopharmacology*, *30*(3), 199-207.
- Saadoun, D., Rosenzweig, M., Joly, F., Six, A., Carrat, F., Thibault, V., ... & Klatzmann, D. (2011). Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *New England Journal of Medicine*, *365*(22), 2067-2077.
- Sack, U., Burkhardt, U., Borte, M., Schädlich, H., Berg, K., & Emmrich, F. (1998). Age-dependent levels of select immunological mediators in sera of healthy children. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, *5*(1), 28-32.
- Saftig, P., & Lichtenthaler, S. F. (2015). The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain. *Progress in neurobiology*, *135*, 1-20.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H. M., Higashiyama, S., Peschon, J., ... & Blobel, C. P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *The Journal of cell biology*, *164*(5), 769-779.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, *133*(5), 775-787.
- Sakaguchi, S., Powrie, F., & Ransohoff, R. M. (2012). Re-establishing immunological self-tolerance in autoimmune disease. *Nature medicine*, *18*(1), 54-58.

- Sammel, M., Peters, F., Lokau, J., Scharfenberg, F., Werny, L., Linder, S., ... & Becker-Pauly, C. (2019).** Differences in Shedding of the Interleukin-11 Receptor by the Proteases ADAM9, ADAM10, ADAM17, Meprin  $\alpha$ , Meprin  $\beta$  and MT1-MMP. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3677.
- Samuel, C. E. (2001).** Antiviral actions of interferons. *Clinical microbiology reviews*, 14(4), 778-809.
- Schäfer, B., Gschwind, A., & Ullrich, A. (2004).** Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene*, 23(4), 991-999
- Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C., & Rose-John, S. (2011).** ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends in immunology*, 32(8), 380-387.
- Schulz, O., Sewell, H. F., & Shakib, F. (1998).** Proteolytic cleavage of CD25, the  $\alpha$  subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *The Journal of experimental medicine*, 187(2), 271-275.
- Schumacher, N., Meyer, D., Mauermann, A., von der Heyde, J., Wolf, J., Schwarz, J., ... & Rabe, B. (2015).** Shedding of endogenous interleukin-6 receptor (IL-6R) is governed by a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) proteases while a full-length IL-6R isoform localizes to circulating microvesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 290(43), 26059-26071.
- Schwartz, D. M., Bonelli, M., Gadina, M., & O'shea, J. J. (2016).** Type I/II cytokines, JAKs, and new strategies for treating autoimmune diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(1), 25-36.
- Seals, D. F., & Courtneidge, S. A. (2003).** The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & development*, 17(1), 7-30.
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., & Sakaguchi, S. (2005).** Homeostatic maintenance of natural Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *The Journal of experimental medicine*, 201(5), 723-735.
- Sharabi, A., Tsokos, M. G., Ding, Y., Malek, T. R., Klatzmann, D., & Tsokos, G. C. (2018).** Regulatory T cells in the treatment of disease. *Nature reviews Drug discovery*, 17(11), 823-844.
- Sharon, M., Klausner, R. D., Cullen, B. R., Chizzonite, R., & Leonard, W. J. (1986).** Novel interleukin-2 receptor subunit detected by cross-linking under high-affinity conditions. *Science*, 234(4778), 859-863.
- Shatrova, A. N., Mityushova, E. V., Aksenov, N. A., & Marakhova, I. I. (2015).** CD25 expression on the surface of Jurkat cells. *Cell and Tissue Biology*, 9(5), 364-370.
- Sheu, B. C., Hsu, S. M., Ho, H. N., Lien, H. C., Huang, S. C., & Lin, R. H. (2001).** A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer research*, 61(1), 237-242.
- Shevach, E. M. (2009).** Mechanisms of foxp3<sup>+</sup> T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 30(5), 636-645.
- Shevach, E. M., & Thornton, A. M. (2014).** tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunological reviews*, 259(1), 88-102.



- Siegel, J. P., Sharon, M., Smith, P. L., & Leonard, W. J. (1987).** The IL-2 receptor  $\beta$  chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science*, 238(4823), 75-78.
- Sim, G. C., & Radvanyi, L. (2014).** The IL-2 cytokine family in cancer immunotherapy. *Cytokine & growth factor reviews*, 25(4), 377-390.
- Slieker, L. J., & Lane, M. D. (1985).** Post-translational processing of the epidermal growth factor receptor. Glycosylation-dependent acquisition of ligand-binding capacity. *Journal of Biological Chemistry*, 260(2), 687-690.
- Soond, S. M., Everson, B., Riches, D. W., & Murphy, G. (2005).** ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF $\alpha$ -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *Journal of cell science*, 118(11), 2371-2380.
- Spolski, R., Li, P., & Leonard, W. J. (2018).** Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *Nature Reviews Immunology*, 18(10), 648-659.
- Stauber, D. J., Debler, E. W., Horton, P. A., Smith, K. A., & Wilson, I. A. (2006).** Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8), 2788-2793.
- Stöcker, W., Grams, F., Reinemer, P., Bode, W., Baumann, U., Gomis-Rüth, F. X., & McKay, D. B. (1995).** The metzincins-Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a super family of zinc-peptidases. *Protein science*, 4(5), 823-840.
- Symons, J. A., Wood, N. C., Di Giovine, F. S., & Duff, G. W. (1988).** Soluble IL-2 receptor in rheumatoid arthritis. Correlation with disease activity, IL-1 and IL-2 inhibition. *The Journal of Immunology*, 141(8), 2612-2618.
- Tahvildari, M., & Dana, R. (2019).** Low-dose IL-2 therapy in transplantation, autoimmunity, and inflammatory diseases. *The Journal of Immunology*, 203(11), 2749-2755.
- Takeshita, T., Asao, H., Ohtani, K., Ishii, N., Kumaki, S., Tanaka, N., ... & Sugamura, K. (1992).** Cloning of the  $\gamma$  chain of the human IL-2 receptor. *Science*, 257(5068), 379-382.
- Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R., & Hamuro, J. (1983).** Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature*, 302(5906), 305-310.
- Taniguchi, T., & Minami, Y. (1993).** The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell*, 73(1), 5-8.
- Taniguchi, T., Miyazaki, T., Minami, Y., Kawahara, A., Fujii, H., Nakagawa, Y., ... & Liu, Z. J. (1995).** IL-2 signaling involves recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the IL-2 receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 766, 235-244.
- Teshigawara, K., Wang, H. M., Kato, K., & Smith, K. A. (1987).** Interleukin 2 high-affinity receptor expression requires two distinct binding proteins. *The Journal of experimental medicine*, 165(1), 223-238.
- Thomson, A. W., & Lotze, M. T. (2003).** *The Cytokine Handbook, Two-Volume Set*. Elsevier.

- Tsuda, M., Kozak, R. W., Goldman, C. K., & Waldmann, T. A. (1986).** Demonstration of a non-Tac peptide that binds interleukin 2: a potential participant in a multichain interleukin 2 receptor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(24), 9694-9698.
- Tsujino, S., Miyazaki, T., Kawahara, A., Maeda, M., Taniguchi, T., & Fujii, H. (1999).** Critical role of the membrane-proximal, proline-rich motif of the interleukin-2 receptor  $\gamma$  chain in the Jak3-independent signal transduction. *Genes to Cells*, 4(6), 363-373.
- Tucher, J., Linke, D., Koudelka, T., Cassidy, L., Tredup, C., Wichert, R., ... & Tholey, A. (2014).** LC-MS Based Cleavage Site Profiling of the Proteases ADAM10 and ADAM17 Using Proteome-Derived Peptide Libraries. *Journal of proteome research*, 13(4), 2205-2214.
- Uchikawa, S., Yoda, M., Tohmonda, T., Kanaji, A., Matsumoto, M., Toyama, Y., & Horiuchi, K. (2015).** ADAM17 regulates IL-1 signaling by selectively releasing IL-1 receptor type 2 from the cell surface. *Cytokine*, 71(2), 238-245.
- Vanmaris, R. M., & Rijkers, G. T. (2017).** Biological role of the soluble interleukin-2 receptor in sarcoidosis. *Sarcoidosis, Vasculitis, and Diffuse Lung Diseases*, 34(2), 122.
- van Veen, H. A., Geerts, M. E., Van Berkel, P. H., & Nuijens, J. H. (2004).** The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis. *European Journal of Biochemistry*, 271(4), 678-684.
- Viviani, S., Camerini, E., Bonfante, V., Santoro, A., Balzarotti, M., Fornier, M., ... & Bonadonna, G. (1998).** Soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) in Hodgkin's disease: outcome and clinical implications. *British journal of cancer*, 77(6), 992-997.
- von Bergwelt-Baildon, M. S., Popov, A., Saric, T., Chemnitz, J., Classen, S., Stoffel, M. S., ... & Schultze, J. L. (2006).** CD25 and indoleamine 2, 3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. *Blood*, 108(1), 228-237.
- von Spee-Mayer, C., Siegert, E., Abdirama, D., Rose, A., Klaus, A., Alexander, T., ... & Humrich, J. Y. (2016).** Low-dose interleukin-2 selectively corrects regulatory T cell defects in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases*, 75(7), 1407-1415.
- Walcheck, B., Herrera, A. H., Hill, C. S., Mattila, P. E., Whitney, A. R., & DeLeo, F. R. (2006).** ADAM17 activity during human neutrophil activation and apoptosis. *European journal of immunology*, 36(4), 968-976.
- Waldmann, T. A. (2002).** The IL-2/IL-15 receptor systems: targets for immunotherapy. *Journal of clinical immunology*, 22(2), 51-56.
- Waldmann, T. A. (2006).** The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nature Reviews Immunology*, 6(8), 595-601.
- Wang, H. M., & Smith, K. A. (1987).** The interleukin 2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure. *The Journal of experimental medicine*, 166(4), 1055-1069.
- Yui, M. A., Sharp, L. L., Havran, W. L., & Rothenberg, E. V. (2004). Preferential activation of an IL-2 regulatory sequence transgene in TCR $\gamma\delta$  and NKT cells: subset-specific differences in IL-2 regulation. *The Journal of Immunology*, 172(8), 4691-4699.

- Wang, S., Wen, F., Wiley, G. B., Kinter, M. T., & Gaffney, P. M. (2013).** An enhancer element harboring variants associated with systemic lupus erythematosus engages the TNFAIP3 promoter to influence A20 expression. *PLoS genetics*, *9*(9), e1003750.
- Wang, X., Lupardus, P., LaPorte, S. L., & Garcia, K. C. (2009).** Structural biology of shared cytokine receptors. *Annual review of immunology*, *27*, 29.
- Wang, Y., Robertson, J. D., & Walcheck, B. (2011).** Different signaling pathways stimulate a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17) in neutrophils during apoptosis and activation. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(45), 38980-38988.
- Wang, Y., Zhang, A. C., Ni, Z., Herrera, A., & Walcheck, B. (2010).** ADAM17 activity and other mechanisms of soluble L-selectin production during death receptor-induced leukocyte apoptosis. *The Journal of Immunology*, *184*(8), 4447-4454.
- Weber, S., & Saftig, P. (2012).** Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development*, *139*(20), 3693-3709.
- Wetzel, S., Seipold, L., & Saftig, P. (2017).** The metalloproteinase ADAM10: A useful therapeutic target?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1864*(11), 2071-2081.
- Witkowska, A. M. (2005).** On the role of sIL-2R measurements in rheumatoid arthritis and cancers. *Mediators of inflammation*, *2005*(3), 121-130.
- Witthuhn, B. A., Silvennoinen, O., Miura, O., Lai, K. S., Cwik, C., Liu, E. T., & Ihle, J. N. (1994).** Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature*, *370*(6485), 153-157.
- Wuest, S. C., Edwan, J. H., Martin, J. F., Han, S., Perry, J. S., Cartagena, C. M., ... & Bielekova, B. (2011).** A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy. *Nature medicine*, *17*(5), 604-609.
- Xu, P., & Derynck, R. (2010).** Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Molecular cell*, *37*(4), 551-566
- Yan, I., Schwarz, J., Lücke, K., Schumacher, N., Schumacher, V., Schmidt, S., ... & Chalaris, A. (2016).** ADAM17 controls IL-6 signaling by cleavage of the murine IL-6R $\alpha$  from the cell surface of leukocytes during inflammatory responses. *Journal of leukocyte biology*, *99*(5), 749-760.
- Yang, J. C., Sherry, R. M., Steinberg, S. M., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., ... & Rosenberg, S. A. (2003).** Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *21*(16), 3127.
- Yang, Z. Z., Grote, D. M., Ziesmer, S. C., Manske, M. K., Witzig, T. E., Novak, A. J., & Ansell, S. M. (2011).** Soluble IL-2R $\alpha$  facilitates IL-2-mediated immune responses and predicts reduced survival in follicular B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *118*(10), 2809-2820.
- Yui, M. A., Sharp, L. L., Havran, W. L., & Rothenberg, E. V. (2004).** Preferential activation of an IL-2 regulatory sequence transgene in TCR $\gamma\delta$  and NKT cells: subset-specific differences in IL-2 regulation. *The Journal of Immunology*, *172*(8), 4691-4699.

- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., & Sprent, J. (1998).** Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8<sup>+</sup> T cells in vivo by IL-15. *Immunity*, 8(5), 591-599.
- Zheng, L., Trageser, C. L., Willerford, D. M., & Lenardo, M. J. (1998).** T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte death. *The Journal of Immunology*, 160(2), 763-769.
- Zorn, E., Nelson, E. A., Mohseni, M., Porcheray, F., Kim, H., Litsa, D., ... & Ritz, J. (2006).** IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood*, 108(5), 1571-1579.
- Zunke, F., & Rose-John, S. (2017).** The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1864(11), 2059-2070.

## 8. Anhang

### 8.1. pcDNA3.1-myc-hIL-2R $\alpha$

```

                                NheI
851 GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC

901 TCGAGATGGA TTCATACCTG CTGATGTGGG GACTGCTCAC GTTCATCATG
    M D S Y L L M W G L L T F I M      Frame 3

951 GTGCCTGGCT GCCAGGCAGA ACAAAAACCTC ATCTCAGAAG AGGATCTGGA
    V P G C Q A E Q K L I S E E D L E      Frame 3

1001 GCTCTGTGAC GATGACCCGC CAGAGATCCC ACACGCCACA TTCAAAGCCA
    L C D D D P P E I P H A T F K A M      Frame 3

1051 TGGCCTACAA GGAAGGAACC ATGTTGAACT GTGAATGCAA GAGAGGTTTC
    A Y K E G T M L N C E C K R G F      Frame 3

1101 CGCAGAATAA AAAGCGGGTC ACTCTATATG CTCTGTACAG GAAACTCTAG
    R R I K S G S L Y M L C T G N S S      Frame 3

1151 CCACTCGTCC TGGGACAACC AATGTCAATG CACAAGCTCT GCCACTCGGA
    H S S W D N Q C Q C T S S A T R N      Frame 3

1201 ACACAACGAA ACAAGTGACA CCTCAACCTG AAGAACAGAA AGAAAGGAAA
    T T K Q V T P Q P E E Q K E R K      Frame 3

1251 ACCACAGAAA TGCAAAGTCC AATGCAGCCA GTGGACCAAG CGAGCCTTCC
    T T E M Q S P M Q P V D Q A S L P      Frame 3

1301 AGGTCACTGC AGGGAACCTC CACCATGGGA AAATGAAGCC ACAGAGAGAA
    G H C R E P P P W E N E A T E R I      Frame 3

1351 TTTATCATTT CGTGGTGGGG CAGATGGTTT ATTATCAGTG CGTCCAGGGA
    Y H F V V G Q M V Y Y Q C V Q G      Frame 3

1401 TACAGGGCTC TACACAGAGG TCCTGCTGAG AGCGTCTGCA AAATGACCCA
    Y R A L H R G P A E S V C K M T H      Frame 3

1451 CGGGAAGACA AGGTGGACCC AGCCCCAGCT CATATGCACA GGTGAAATGG
    G K T R W T Q P Q L I C T G E M E      Frame 3

1501 AGACCAGTCA GTTTCAGGT GAAGAGAAGC CTCAGGCAAG CCCCGAAGGC
    T S Q F P G E E K P Q A S P E G      Frame 3

1551 CGTCCTGAGA GTGAGACTTC CTGCCTCGTC ACAACAACAG ATTTTCAAAT
    R P E S E T S C L V T T T D F Q I      Frame 3

1601 ACAGACAGAA ATGGCTGCAA CCATGGAGAC GTCCATATTT ACAACAGAGT
    Q T E M A A T M E T S I F T T E Y      Frame 3

1651 ACCAGGTAGC AGTGGCCGGC TGTGTTTTCC TGCTGATCAG CGTCCTCCTC
    Q V A V A G C V F L L I S V L L      Frame 3

1701 CTGAGTGGGC TCACCTGGCA GCGGAGACAG AGGAAGAGTA GAAGAACAAT
    L S G L T W Q R R Q R K S R R T I      Frame 3

1751 CTAGGCGGCC GCTCGAGTCT AGAGGGCCCG TTAAACCCG CTGATCAGCC
    * NotI      Frame 3

```











### 8.3. Publikationen

**Kirschke, S.**, Ogunsulire, I., Selvakumar, B., Schumacher, N., Sezin, T., Rose-John, S., Scheffold, A., Garbers, C., & Lokau, J. (2022). The metalloprotease ADAM10 generates soluble interleukin-2 receptor alpha (sIL-2R $\alpha$ /sCD25) in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 298(6).

Lokau, J., Kespohl, B., **Kirschke, S.**, & Garbers, C. (2022). The role of proteolysis in interleukin-11 signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1869(1), 119135.

## 8.4. Ehrenerklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; verwendete fremde und eigene Quellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

- Ergebnisse erfunden oder widersprüchlich Ergebnisse verschwiegen,
- statistische Verfahren absichtlich missbraucht, um Daten in ungerechtfertigter Weise zu interpretieren,
- fremde Ergebnisse oder Veröffentlichungen plagiiert,
- fremde Forschungsergebnisse verzerrt wiedergegeben.

Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Urheberrecht Unterlassungs- und Schadensersatzansprüche des Urhebers sowie eine strafrechtliche Ahndung durch die Strafverfolgungsbehörden begründen kann.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Arbeit ggf. mit Mitteln der elektronischen Datenverarbeitung auf Plagiate überprüft werden kann.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

---

Ort, Datum

Unterschrift