

# **Molekulare Grundlagen der proteolytischen Freisetzung von TNF-alpha und Fas Ligand durch ADAM-Proteasen**

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

**vorgelegt von**

**Marc Schulte**

**Kiel**

**2007**



INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	1
1.1	Metalloproteasen und Ektodomänen- <i>Shedding</i>	1
1.2	Die Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen	3
1.3	Die Domänen-Struktur der ADAM-Proteasen	5
1.4	Knock-out Studien zur Untersuchung der Funktion der ADAM-Proteasen	7
1.5	Regulation des Ektodomänen- <i>Shedding</i>	8
1.6	ADAM10 und ADAM17	10
1.7	Der Fas Ligand	12
1.7.1	Die proteolytische Prozessierung des Fas Liganden	16
<b>2</b>	<b>WISSENSCHAFTLICHE FRAGESTELLUNG</b>	18
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	19
3.1	Material	19
3.1.1	Geräte	19
3.1.2	Verbrauchsmaterial	20
3.1.3	Chemikalien	20
3.1.4	Inhibitoren	22
3.1.5	Verwendete Kits	22
3.1.6	Vektoren	22
3.1.7	Zelllinien	23
3.1.8	Antikörper	24
3.1.9	Oligonukleotide	25
3.1.10	Medien und Lösungen	28
3.2	Methoden	29
3.2.1	Zellkultur	29
3.2.1.1	Gewinnung und Kultivierung von primären T-Zellen	29
3.2.1.2	Passagieren von adhärenten Zellen	29
3.2.1.3	Einfrieren von Zellen	30
3.2.1.4	Auftauen von Zellen	30
3.2.1.5	Ernten von eukaryotischen Zellen	30
3.2.1.6	Herstellung von Zelllysaten	30

3.2.1.7	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen .....	31
3.2.1.8	siRNA .....	31
3.2.2	Biochemische Methoden.....	33
3.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	33
3.2.2.2	SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
3.2.2.3	Immunoblot (Westernblot).....	33
3.2.2.4	<i>Strippen</i> von Westernblots.....	34
3.2.2.5	Fas Ligand <i>in vitro</i> Spaltungsversuch.....	35
3.2.2.6	Alkalische Phosphatase-Assay.....	35
3.2.3	Molekularbiologische Methoden .....	36
3.2.3.1	DNA-Gehaltsbestimmung.....	36
3.2.3.2	Agarosegelektrophorese .....	36
3.2.3.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	37
3.2.3.4	Herstellung elektrokompetenter Zellen.....	37
3.2.3.5	Transformation durch Elektroporation.....	37
3.2.3.6	Plasmidamplifikation und –aufreinigung .....	38
3.2.3.7	Einführung von Punktmutanten durch zweifach rekombinante PCR.....	38
3.2.3.8	Erzeugung von Proteinfusionen und chimären Proteinen durch rekombinante PCR.....	39
3.2.4	Immunologische Methoden .....	40
3.2.4.1	Durchflusszytometrie.....	40
3.2.4.2	Immunfärbung für die Durchflusszytometrie.....	40
3.2.4.3	AnnexinV- Färbung .....	40
3.2.4.4	Zellzahlbestimmung.....	41
3.2.4.5	Indirekte Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen .....	41
3.2.4.6	Chrom <sup>51</sup> –Freisetzung-Versuche.....	42
3.2.4.7	ELISA .....	43
3.2.4.8	Messung des Aktivierungs-induzierten Zelltods.....	44
4	ERGEBNISSE .....	45
4.1	Analysen zum Fas Ligand- <i>Shedding</i> .....	45
4.1.1	Verifizierung und Testung der verwendeten Antikörper .....	46
4.1.2	Prozessierung des humanen Fas Ligand in humanen und murinen Zellen..	48
4.1.3	Untersuchungen zur Identifizierung der Fas Ligand prozessierenden Protease .....	51
4.1.3.1	Pharmakologische und biochemische Hinweise auf eine Rolle von ADAM10 im Fas Ligand- <i>Shedding</i> .....	51
4.1.3.2	Genetische Identifizierung von ADAM10 als prinzipielle FasL- <i>Sheddase</i> .....	56

4.1.3.3 Fas Ligand wird auch in endogen FasL-exprimierenden Zellen durch ADAM10 proteolytisch prozessiert .....	58
4.1.4 Funktionelle Relevanz des ADAM10-vermittelten Fas Ligand- <i>Shedding</i> .....	65
4.1.4.1 Regulation der apoptotischen Aktivität von Fas Ligand-exprimierenden KFL-Tumorzellen durch ADAM10.....	65
4.1.4.2 ADAM10 vermitteltes FasL- <i>Shedding</i> beeinflusst den Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) von T-Zellen.....	67
4.1.4.3 ADAM10 setzt apoptotisch aktiven hFasL frei .....	68
4.1.5 Regulatorische Aspekte des Fas Ligand- <i>Shedding</i> durch ADAM10 .....	70
4.1.5.1 Wird der Fas Ligand bei Inhibition des <i>Shedding</i> endozytiert?.....	70
4.1.5.2 Ist die Fas Ligand-Prozessierung abhängig von der Fas-Rezeptorbindung ?...	72
4.1.5.3 Untersuchung der Stimulierbarkeit des Fas Ligand- <i>Shedding</i> .....	76
4.2 Chimärenanalysen zum humanen Fas Ligand- und humanem TNF- $\alpha$ - <i>Shedding</i> ...	81
4.2.1 Herstellung und Charakterisierung der ADAM10/ADAM17-Chimären	81
4.2.2 Chimärenanalysen zum Fas Ligand- <i>Shedding</i> .....	85
4.2.3 Chimärenanalysen zum humanen TNF- $\alpha$ - <i>Shedding</i> .....	89
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>94</b>
5.1 Charakterisierung des <i>Shedding</i> des humanen Fas Liganden.....	94
5.1.1 Prozessierung potentieller Spaltungsmutanten des humanen Fas Liganden in verschiedenen Zelltypen .....	95
5.1.2 Identifizierung von ADAM10 als Fas Ligand spaltende Protease.....	96
5.1.3 ADAM10 vermittelt die Freisetzung von löslichem Fas Ligand in T-Zellen .....	98
5.2 Physiologische Relevanz des ADAM10-vermittelten Fas Ligand <i>Shedding</i> .....	101
5.3 Regulatorische Aspekte des Fas Ligand- <i>Shedding</i> .....	103
5.3.1 Untersuchung zur Endozytose des humanen Fas Liganden.....	103
5.3.2 Besteht ein Zusammenhang zwischen Rezeptorbindung und Fas Ligand- <i>Shedding</i> ? .....	105
5.3.3 Ist das Fas Ligand- <i>Shedding</i> an intrazelluläre Signalwege gekoppelt? .	106
5.4 Untersuchungen zur Substratspezifität und Regulation von ADAM10 und ADAM17 .....	108
5.4.1 Chimärenstudien zur Regulation der Fas Ligand-Proteolyse .....	109
5.4.2 Die mögliche Rolle der zytoplasmatischen Domäne von ADAM10 im Fas Ligand- <i>Shedding</i> .....	110

5.4.3	Die mögliche Rolle der ADAM10-Transmembrandomäne im Fas Ligand- <i>Shedding</i> .....	112
5.4.4	Chimärenstudien zur Regulation der TNF-Proteolyse durch ADAM17	115
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>122</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>140</b>
9.1	Danksagung .....	140
9.2	Curriculum vitae .....	141
9.3	Erklärung .....	143

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
AICD	activation –induced cell death (Aktivierungs-induzierter Zelltod)
Apf-1	apoptotic protease-activating factor-1
AF	Alexa Fluor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BamH	Bacillus amyloliquefaciens H
bp	Basenpaare
BP	Band Pass Filter
BSA	Bovines Serumalbumin
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
cDNA	complementary DNA
CMV	Cytomegalie Virus
Cvt	Cytoplasm-to-Vacuole-Targeting
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DABCO	Diazobicyclooctan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleicacid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence (Western Blot Detektionssystem)
EcoR	Escherichia coli (Stamm R)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated protein with death domain
FasL	Fas Ligand
Fas	Fas Rezeptor
FasFc	Ektodomäne des Fas Rezeptors mit C-termial fusioniertem Fc-Teil von IgG
FKS	Fötales Kälberserum
gld	generalised lymphoproliferative disease
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	human (aus dem Menschen stammend)
HIV	Human Immundeficiency Virus
HRP	Meerrettichperoxidase (Horse Radish Peroxidase)
Ig	Immunglobulin
K	kuzbanian
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
ko	knock-out
LB	Luria Broth
LFasL	löslicher Fas Ligand
m	murin (aus der Maus stammend)

## Abkürzungsverzeichnis

---

M	molar, Mol/Liter
MCS	Multiple Cloning Site
MEF	murine embryonale Fibroblasten
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
MW	Molecular Weight
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
PACSin	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons (Proteinkinase C- und Caseinkinase-Substrat in Neuronen)
pAK	polyklonaler Antikörper
PBMNZ	periphere mononukleäre Blutzellen
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	Pyrococcus furiosus
PHA	Phytohämagglutinin
PHA-Blasten	Phytohämagglutinin-aktivierte T-Zell-Blasten
PI	Phosphatidylinosit
PRD	prolinereiche Domäne
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	ribonucleic acid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SPP	signal peptide peptidase
SPPL2a	signal peptide peptidase like 2a
Std	Stunden
SV	Simian Virus
T	TACE
TACE	<i>Tumor necrosis factor alpha converting enzyme</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Taq	Thermus aquaticus
TBS	trisgepufferte Kochsalzlösung
TBST	trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
Temed	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Wt	Wildtyp
Xho	Xanthomonas holcicola
ZVAD-fmk	Z-Valin-Alanin-D,L-Aspartat-Fluormethylketon

# 1 Einleitung

## 1.1 Metalloproteasen und Ektodomänen-*Shedding*

Proteasen, oder auch Peptidasen, katalysieren die hydrolytische Spaltung von Peptidketten (Proteolyse). Sie sind für alle Organismen lebensnotwendig und werden z.B. zur Aktivierung von anderen Proteinen, zur Prozessierung von Antigenen (unter anderem lysosomale Proteasen) oder zum Abbau von nicht mehr benötigten Proteinen (Proteasom-Proteasen) benötigt.

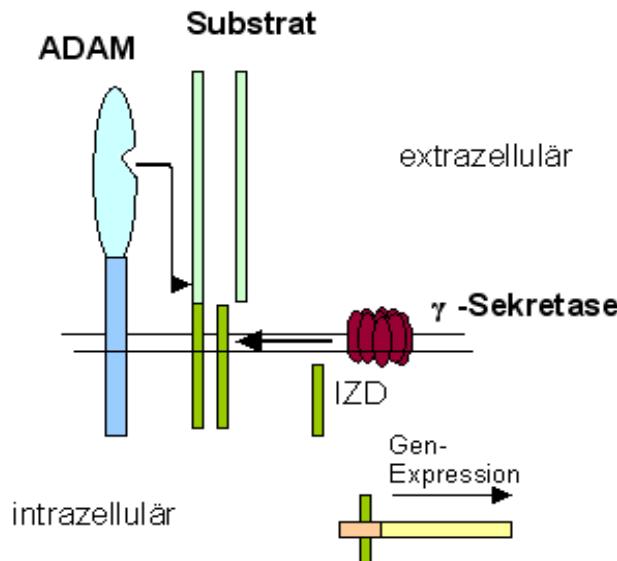
Den Mitgliedern der Protease-Familie der Metzinkine können neben der Untergruppe der Serralysine, der Astazine und der Matrix-Metalloproteasen (MMPs, Matrizine) die Adamalysin-Proteasen zugeordnet werden. Die letzte Gruppe umfasst die Schlangengift-Proteasen sowie die ADAMs (*A Disintegrin And Metalloprotease*). Diese zeigen vor allem in ihrer Protease-Domäne eine starke Homologie. Hier binden sie im aktiven Zentrum ein Zink<sup>2+</sup>-Ion über die Histidinreste (H) des konservierten Sequenzmotifs HExxHxxGxxH. Glutamat (E) und Glycin (G) komplexieren nicht. Zusätzlich wird eine distinkte  $\beta$ -Faltblattstruktur im aktiven Zentrum gefunden, die durch Methioninreste vermittelt wird und wichtig für die katalytische Aktivität ist. Insgesamt besteht jedoch lediglich zu etwa 20% eine Homologie der Aminosäuresequenz zwischen den Mitgliedern der Metzinkinen. Die hier näher betrachteten MMPs und ADAMs sind extrazellulär auf oder an der Plasmamembran aktiv und spalten dort eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle. Die Hauptaufgabe der MMPs besteht im Abbau und der Remodellierung der extrazellulären Matrix (EZM), wodurch die Voraussetzung für die Migrationsfähigkeit von Zellen im Gewebe geschaffen wird, welche auch zur Invasivität von Tumoren beiträgt (Kajita *et al.*, 2001; Noe *et al.*, 1997). Darüber hinaus werden von den MMPs auch Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle prozessiert. Dies trägt zu so unterschiedlichen zellulären Aktivitäten wie u.a. Angiogenese, Entzündung oder Differenzierung bei (Stefanidakis *et al.*, 2006; Page-McCaw *et al.*, 2007; Fingleton *et al.*, 2007). Die ADAMs spalten Membranproteine, wodurch die Freisetzung der extrazellulären Domänen von der Zelloberfläche erreicht wird. Dieser Prozess wird als „*Ektodomain Shedding*“ bezeichnet (Jalkanen *et al.*, 1987).

ADAM-Metalloproteasen spalten unter anderem Adhäsionsmoleküle wie Cadherine, Proteine der Immunglobulin-Superfamilie und Selektine (Reiss *et al.*, 2006). Ebenso werden der

Signalübertragung dienende endo- und parakrine Botenstoffe proteolytisch von der Zelloberfläche freigesetzt, so unter anderem Zytokine und deren Rezeptoren im Rahmen einer Entzündungsreaktion (Mullberg *et al.*, 2000; Rose-John *et al.*, 2000). Differenzierungsprozesse, bedeutsam vor allem in der Entwicklungsbiologie komplexer Organismen und der Krebsentstehung, beruhen zu einem großen Teil auf Signalübertragungen von Zelle zu Zelle durch Wachstumsfaktoren. An der Modulation auch dieser Signalübertragungswege sind *Shedding*-Prozesse z.B. im Falle des *Epidermal Growth Factor* (EGF) oder des *Transforming Growth Factor-alpha* (TGF-alpha) grundlegend beteiligt (Blobel *et al.*, 2005).

Nach der Freisetzung der extrazellulären Domäne eines Membranproteins wird der in der Membran verbleibende Rest häufig einer weiteren Prozessierung unterworfen, die in der Spaltung innerhalb der Transmembrandomäne besteht. Dies wurde zuerst für das Amyloid Precursor Protein (APP) und den Notch-Rezeptor gezeigt. Dieses Typ I-Transmembranprotein wird nach der extrazellulären Spaltung durch den Presenilin-Komplex innerhalb der Membran geschnitten. Mitglieder der Familie der Signalpeptid-Peptidasen wirken in vergleichbarer Weise auf Typ II Transmembranproteine. Diese sequentielle Spaltung wird in ihrer Gesamtheit als „*Regulated Intramembrane Proteolysis*“ (*Ripening*) bezeichnet (Steiner *et al.*, 2000).

Man nimmt an, dass Störungen in der strengen Regulation der Metalloproteasen bzw. des *Ripening*-Prozesses insgesamt an der Entstehung bedeutender Krankheiten wie u.a. Krebs, Arthritis und Morbus Alzheimer beteiligt sind (u.a. Selkoe *et al.*, 1998; Holmbeck *et al.*, 1999; Mochizuki *et al.*, 2007).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Regulierten Intramembrane Proteolyse („Riping“)**

Viele Transmembranproteine werden einer sequentiellen Prozessierung unterworfen. Zunächst erfolgt ein extrazellulärer Schnitt, der zur Freisetzung einer Extrazellulären Domäne führt. Nachfolgend wird der in der Membran verbleibende Rest innerhalb der Transmembrandomäne prozessiert. Dadurch wird die intrazelluläre Domäne (IZD) ins Zytosol freigesetzt. In vielen Fällen konnte für diesen und /oder assoziierte Proteine eine Translokation in den Zellkern nachgewiesen werden, wo auf diese Weise die Transkription verschiedener Zielgene moduliert werden kann.

## 1.2 Die Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen

Die ADAM-Proteasen sind Typ I Transmembranproteine, die an vier Aminosäure-Resten eine N-Glykosylierung aufweisen und im Trans-Golgi Netzwerk sowie an der Plasmamembran lokalisiert sind. Bereits in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* werden ADAMs gefunden, jedoch nicht in *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* oder Pflanzen (Rooke *et al.*, 1996; Wen *et al.*, 1997; Seals and Courtneige, 2003).

Die zuerst identifizierte ADAM-Protease Fertilin (ADAM1) wurde auf der Spermienoberfläche des Meerschweinchens entdeckt (Blobel *et al.*, 1992), wo sie über die Bindung an Integrine auf der Oberfläche der Eizellen essentiell für die Fusion von Spermium und Eizelle zu sein scheint (Evans *et al.*, 1995; Almeida *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1997a; Evans *et al.*, 1997b). Aus diesem Grund wurde eine Funktion bei der Zell-Zell-Adhäsion für die ADAMs postuliert (Blobel *et al.*, 2005).

Eine Übersicht über die Familie der ADAM-Proteasen ist auf der Internet-Seite [http://people.virginia.edu/~jw7g/Table\\_of\\_the\\_ADAMs.html](http://people.virginia.edu/~jw7g/Table_of_the_ADAMs.html) erhältlich. Von den bisher 40 identifizierten ADAMs zeigen lediglich 25 ein funktionelles Zinkbindungsmotiv in der Metalloprotease-Domäne. Die übrigen sind daher proteolytisch wahrscheinlich nicht aktiv. Unter den proteolytisch aktiven sind ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19 und 28 als physiologisch und/ oder pathophysiologisch besonders relevante ADAMs zu nennen. Viele ADAMs (u.a. ADAM 8, 9, 10, 11, 12, 15, 17, 19, 22, 23, 28, 33) werden eher ubiquitär im somatischen Gewebe exprimiert. Andererseits finden sich etwa die Hälfte der ADAMs (u.a. ADAM 2, 7, 18, 20, 21, 29, 30) ausschließlich oder vorwiegend in den Hoden (Seals and Coutneidge, 2003).

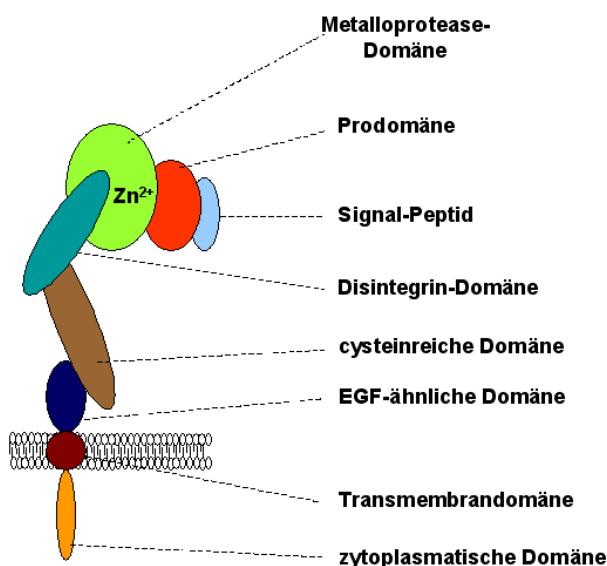
Die Translokation der ADAMs an die Plasmamembran geht mit der Abspaltung einer relativ großen Prodomäne durch Protein-Konvertasen wie Furin und Protein-Konvertase-7 einher. Dies stellt eine kontrollierte proteolytische Aktivierung der Proform (Zymogen) dar (Moss *et al.*, 1997; Loechel *et al.*, 1999; Anders *et al.*, 2001). Dabei dissoziiert im sogenannten Cystein-Wechsel (“cystein switch”) ein Cystein der Prodomäne vom Zinkatom des aktiven Zentrums (van Wart und Birkedal-Hansen, 1990; Milla *et al.*; 2006).

Alternatives *Splicing* wird für einige ADAMs beschrieben, so z.B. ADAM22 (Sagane *et al.*, 1998), ADAM29, ADAM30 (Ceretti *et al.*, 1999) und ADAM33 (Powell *et al.*, 2004), ohne dass eine funktioneller Unterschied der resultierenden Isoformen gefunden wird. In einigen Fällen werden durch alternatives Splicing lösliche Genprodukte generiert (u.a. ADAM 9, 10, 12, 28), deren Funktion allerdings wenig untersucht ist (Gilpin *et al.*, 1998; Howard *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 1999; Yavari *et al.*, 1998; Hotoda *et al.*, 2000).

### 1.3 Die Domänen-Struktur der ADAM-Proteasen

Topologisch lassen sich die meisten ADAMs in mehrere Domänen unterteilen, wie in Abb. 2 dargestellt ist (Seals and Courtneidge, 2003; White *et al.*, 2003; Becherer *et al.*, 2003)

Die Prodomäne der ADAMs weist N-terminal eine Signalsequenz auf, die die Protease dem sekretorischen Transportweg zuführt. Neben ihrer bereits erwähnten inaktivierenden Funktion scheint sie eine Chaperon-Funktion zu besitzen: Wird ein ADAM10-Konstrukt ohne Prodomäne exprimiert, ist es aufgrund nicht nativer Faltung inaktiv in Bezug auf seine Proteaseaktivität. Die Koexpression der Prodomäne führt hier zur Wiederherstellung der Proteaseaktivität, wie Anders *et al.* 2001 zeigen konnten.



**Abb. 2: Domänen-Struktur einer typischen ADAM-Metalloprotease**

Die ADAMs umfassen in der Regel eine Prodomäne mit einem N-terminalem Signalpeptid, die Metalloprotease-Domäne, eine Disintegrin-Domäne, eine cysteinreiche Domäne, die Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Domäne. Einige Mitglieder der ADAM-Familie besitzen extrazellulär zusätzlich membranproximal eine EGF-ähnliche Domäne.

Durch Kristallisation der Metalloprotease-Domänen von ADAM17 (Maskos *et al.*, 1998) und ADAM33 (Orth *et al.*, 2004) konnte der katalytische Mechanismus der Metzinkin-Proteasen genauer definiert werden. Im aktiven Zentrum koordinieren drei Histidinreste und ein Cysteinrest ein Zinkatom sowie Wassermoleküle. Dieses Strukturmotif markiert also die potentiell katalytisch aktiven ADAMs.

Die Disintegrin-domäne ist, teilweise in Kombination mit einer cysteinreichen Domäne, an der Regulation der katalytischen Aktivität (Smith *et al.*, 2002), der Substraterkennung (Reddy *et al.*, 2000; Janes *et al.*, 2005) und der Entfernung der Prodomäne von der katalytischen Domäne (Milla *et al.*, 1999) beteiligt. Die putative Rolle der Disintegrin-domäne bei der Substraterkennung könnte der Grund dafür sein, dass die Disintegrin-domänen der jeweiligen ADAMs zwischen verschiedenen Spezies relativ hoch konserviert sind (Nakamura *et al.*, 2004). Neben den ADAMs besitzen auch die Schlangengift-Metalloproteasen eine etwa 90 Aminosäuren große Disintegrin-domäne. Takeda *et al.* konnten 2006 die Metalloprotease-Domäne der zu den ADAMs homologen Schlangengift-Protease Vap1 zusammen mit deren Disintegrin-domäne kristallisieren. In der resultierenden Struktur ragt die Disintegrin-domäne aus der MP-Domäne heraus und beschreibt einen C-förmigen Arm mit gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Die Disintegrin-Schleife („*disintegrin-loop*“) ist durch die cysteinreiche Domäne blockiert, so dass hier die Bindung an Integrinrezeptoren unwahrscheinlich ist. Daher ist eine Funktion der meisten ADAMs in der Zell-Zell-Adhäsion nicht anzunehmen. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit in der cysteinreichen Domäne, die durch streng konservierte Disulfidbrücken stabilisiert wird, eine sogenannte „hypervariable Region“ identifiziert. Durch sie könnte ein großer Teil der spezifischen Substraterkennung vermittelt sein.

Ebenfalls innerhalb der cysteinreichen Domäne konnte durch Janes *et al.* für ADAM10 ein Interaktionsmodul für die Erkennung des Sustratkomplexes ephrin-5A/EphA3 identifiziert werden. ADAM10 ist hier konstitutiv mit der Rezeptor-Tyrosin-Kinase EphA3 assoziiert. Durch deren Bindung an den Ephrin-Liganden Ephrin-A5 wird durch ADAM10 die Spaltung von Ephrin-A5 vermittelt, wofür dieses als „hydrophobe Tasche“ bezeichnete Modul essentiell ist. Inwieweit andere Substrate der ADAMs durch diesen definierten Sequenzabschnitt erkannt werden, ist bisher nicht detailliert untersucht. Weiterhin könnte die cysteinreiche Domäne die Bindung von Proteoglykanen vermitteln (Iba *et al.*, 2000).

Viele ADAMs, nicht aber ADAM10 und ADAM17 weisen darüber hinaus noch eine Membran-proximal gelegene EGF-ähnliche Domäne auf, deren Funktion unbekannt ist.

Die zytoplasmatischen Domänen der ADAMs sind sowohl in Länge als auch Sequenz sehr variabel. Hier finden sich häufig Phosphorylierungsstellen und SH3- (*src homology 3*) Protein-Binde-Motive. Eine Reihe von Adapterproteinen binden am zytoplasmatischen Teil verschiedener ADAMs (Howard *et al.*, 1999). Daher wurde postuliert, dass über diese Domäne die Reifung und Lokalisation sowie die regulierte Aktivität vermittelt wird (Seals and Courtneige, 2003). Dies konnte jedoch in relativ wenigen Fällen klar gezeigt werden (siehe „Regulation der ADAMs“).

## 1.4 Knock-out Studien zur Untersuchung der Funktion der ADAM-Proteasen

Durch Analyse von Knock-out Mäusen konnten die *in vivo* Funktionen einiger ADAMs näher eingegrenzt werden.

ADAM15 Knock-out-Mäuse zeigen verstärkte Osteoarthritis im Alter, so dass dieser Protease vor allem eine Rolle in der Homeostase von Knorpelgewebe zugesprochen wird (Bohm *et al.*, 2005).

ADAM2- und ADAM3- defiziente Mäuse sind trotz normaler Entwicklung steril (Cho *et al.*, 1998, Nishimura *et al.*, 2001), was durch Defekte in der Spermienwanderung (Cho *et al.*, 1998) bzw. der Spermienfusion mit der *Zona pellucida* (Shamsadin *et al.*, 1999; Nishimura *et al.*, 2001) erklärbar ist. ADAM8<sup>-/-</sup> und ADAM9<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen dagegen keinen offensichtlichen Phänotyp, obwohl diese Proteasen in vielen Geweben hoch exprimiert werden (Weskamp *et al.*, 2002). Der Grund hierfür dürfte vornehmlich in einer beobachteten Redundanz bzw. Kompensation der ADAM-Aktivität im Bezug auf ein Substrat liegen. Daher wurden verschiedene *Knock-out* Mäuse hergestellt, die gleichzeitig für mehrere ADAMs defizient sind. So wurde durch die Herstellung von ADAM9/12/15-, ADAM9/12/15/19-, ADAM9/19- und ADAM17/19-mehrfachdefizienten Mäusen eine redundante oder kompensatorische Rolle für verschiedene ADAMs in der Herzentwicklung nachgewiesen (Horiuchi *et al.*, 2005).

Die frühe postnatale Sterblichkeit von ADAM19-defizienten Mäusen ist auf verschiedene Entwicklungsdefizite des Herzens wie fehlgebildete Herzklappen und einem Septumdefekt zurückzuführen (Kurohara *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004).

Die perinatalen und embryonal letalen Effekte der Deletionen von ADAM17 bzw. ADAM10 deuten auf die essentiellen Funktionen dieser proteolytisch besonders aktiven ADAMs bereits bei der embryonalen Entwicklung hin (Black *et al.*, 1997, Peschon *et al.*, 1998, Hartmann *et al.*, 2002). ADAM17-defiziente Mäuse sterben kurz nach der Geburt mit den auch für TGF- $\alpha$ - und EGF-Rezeptor defizienten Mäusen charakteristischen Entwicklungsdefekten an Epithelien (geöffnete Augenlider) und am Herzen (verdickte und fehlgebildete Herzklappen) (Lee *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2003; Hinkle *et al.*, 2004; Sahin *et al.*, 2000; Peschon *et al.*, 1998a; Zhao *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2003). Der zugrundeliegende Mechanismus dürfte in einem Verlust der EGF-Rezeptor vermittelten Signaltransduktion liegen (Blobel *et al.*, 2005). Mohammed *et al.* konnten 2004 die Bedeutung von ADAM17 für die Regulation von Zytokin-Netzwerken mit Hilfe von adulten Mäusen zeigen, die defizient für TIMP-3 (*tissue*

*inhibitor of metalloproteinases-3*) sind. Das Ausschalten dieses endogenen Inhibitors von ADAM17 (und zahlreicher MMPs) führte in dieser Arbeit zu einer erhöhten ADAM17-Aktivität und damit zu einer verstärkten TNF- $\alpha$ -Proteolyse. Dies resultiert wiederum in einer verstärkten Infiltration der Leber durch Lymphozyten und damit einhergehender letaler Leber-Nekrose.

Der frühen Tod von ADAM10-defizienten Mausembryonen am Embryonaltag 9,5 aufgrund von Entwicklungsdefekten bei der Neurogenese, in den Somiten und im Kardiovaskularsystem deutet einen weiten Wirkungsbereich dieser Protease bereits in der Embryonalentwicklung an (Hartmann *et al.*, 2002). Genauere Erkenntnisse über ADAM10-abhängige embryonale Defekte wurden anhand von Untersuchungen am ADAM10-Ortholog Kuzbanian in *Drosophila melanogaster* gewonnen: Die gestörte Neurogenese sowie Defekte in der Augen- Flügel- und Venenentwicklung konnte auf eine kritische Bedeutung der ADAM10-katalysierten Spaltung des Notch-Rezeptors sowie dessen Liganden Delta zurückgeführt werden. Ektodomänen-*Shedding* wurde so als ein notweniger Schritt in der durch den Delta/Notch Signalweg gesteuerten Lateralinhibition identifiziert (Rooke *et al.*, 1996; Sotillos *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1997a; Hattori *et al.*, 2000; Schimmelpfennig *et al.*, 2001).

## 1.5 Regulation des Ektodomänen-*Shedding*s

Auf der Zelloberfläche existiert eine basale Metalloprotease-Aktivität, die einen stetigen Umsatz von Proteinen vermittelt („konstitutives *Shedding*“). Dabei besitzt jede Metalloprotease ein charakteristisches, mehr oder weniger weites Substratspektrum. ADAMs erkennen im Gegensatz zu vielen anderen Proteasen keine eng definierten Spaltsquenzen. Für die reine Substraterkennung scheint die cysteinreiche Domäne nach bisherigen Untersuchungen die größte Rolle zu spielen (siehe „Domänenstruktur der ADAMs“)

Darüber hinaus kann eine Zelle durch Induktion des *Shedding*s relativ schnell auf bestimmte äußere Einflüsse reagieren („induziertes *Shedding*“). Die Aktivität von Metalloproteininasen wird endogen unter anderem durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, die der Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren oder Veränderungen in der intrazellulären Kalziumkonzentration beeinflusst (Hooper *et al.*, 1997; Subramanian *et al.*, 1997; Blobel *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2002). Experimentell kann die Ektodomänenpaltung vieler Proteine wie von CD44 (Nagano 2004) oder von Betacellulin durch Ionomycin (vermittelt Kalzium-Influx) stimuliert werden. Eine weitere *in vitro* Stimulation kann über Phorbolester wie Phorbol-12-

Myristat-13-Acetat (PMA) erreicht werden: z.B. beim IL6- Rezeptor (Matthews *et al.*, 2003; Arribas *et al.*, 1996; Mulberg *et al.*, 1993), TGF- $\alpha$  (Arribas *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 2004) L-Selektin (Peschon *et al.*, 1998; Arribas *et al.*, 1996), APP (Arribas *et al.*, 1996, Buxbaum *et al.*, 1998), L1 (Maretzky *et al.*, 2006) oder CX3CL1 (Hundhausen *et al.*, 2003). Es ist allerdings bisher weitgehend unbekannt, welche molekularen Mechanismen dieser Stimulation zugrunde liegen. Auch liegen teilweise für identifizierte Signalkaskaden unterschiedliche Ergebnisse vor, wie z.B. im Falle des PMA-induzierten pro-HB-EGF *Shedding*: Izumi *et al.*, (1998) schreiben hier der Proteinkinase C (PKC $\delta$ ) eine grundlegende Rolle zu, während Gechtman *et al.*, (1999) eine essentielle Beteiligung des MAP-Kinase-Signalweges nachwiesen. Hier scheint eine Abhängigkeit vom jeweils untersuchten Zellsystem gegeben zu sein.

Für die Regulation der ADAM-Aktivitäten werden häufig die wenig konservierten zytoplasmatischen Domänen der ADAMs diskutiert. Sie sind sowohl in Länge als auch Sequenz sehr variabel. In einigen ADAMs werden in dieser Domäne Phosphorylierungsmotive gefunden. Für das *Shedding* von TrkA (Neurotrophinrezeptor) wurde eine PKC/Erk vermittelte Phosphorylierung des Thr<sup>735</sup> in TACE als notwendig beschrieben (Soond *et al.*, 2005, Diaz-Rodriguez *et al.*, 2003). Ebenfalls durch Erk wird Ser<sup>819</sup> in TACE nach TGF- $\alpha$ -Stimulation phosphoryliert, ohne dass hierfür allerdings eine physiologische Konsequenz ermittelt wurde (Fan *et al.*, 2003).

Für die ebenfalls häufig vorkommenden SH3-Bindemotive konnten teilweise Interaktionspartner identifiziert werden, die zum einen die Lokalisation und Transport der entsprechenden ADAMs vermitteln (PACSIN2, alpha-Actinin1 und 2) und so auch zur Regulation der ADAM-Aktivität beitragen könnten. Besonders ADAM15 weist eine Vielzahl von Interaktionspartnern auf, so die Adapterproteine EndophilinI, SH3PX1 und GRB2 und drei Kinasen aus der Src-Familie (Src, Lck, Hck) (Howard *et al.*, 1999; Poghosyan *et al.*, 2002).

Eine relativ komplexe Form der ADAM-Regulation wird in den letzten Jahren anhand eines Mechanismus deutlich, in dem G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) das *Shedding* bestimmter Substrate initiieren (Hollbro *et al.*, 2004). Dabei wird ein Transaktivierungsmechanismus beobachtet, in dem über GPCR-Aktivierung die Spaltung von EGF-Liganden durch ADAM-Metalloproteasen stimuliert wird (Daub 1996; Yan 2002). Es werden hierfür Signalkaskaden, die über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und unterschiedliche *second messenger* wie Ca<sup>2+</sup> oder ROS („*reactive oxygen species*“) führen, diskutiert. Darüber

hinaus wird auch hier die Phosphorylierung durch PKCs als bedeutsamer Mechanismus angenommen (Ohtsu *et al.*, 2006)

Die Aktivität von MPs wird endogen durch die vier strukturell sehr homologen TIMP-Proteine (*tissue inhibitors of metalloproteases*) mittels Bindung an das katalytische Zinkion der ADAMs inhibiert (Brew *et al.*, 2000) TIMP-1, -2, und -4 werden sezerniert, während TIMP-3 mit der extrazellulären Matrix assoziiert bleibt (Gomez *et al.*, 1997). TIMP-3 inhibiert ADAM17 (Amour *et al.*, 2000) und ADAM12 (Loechel *et al.*, 2000), ADAM10 wird durch TIMP-1 und -3 inhibiert (Amour *et al.*, 2000). TIMP3 scheint insgesamt auf die meisten ADAMs inhibitorisch zu wirken (ADAM12, 13, 17, 19, 28 und 33) (Arribas *et al.*, 1996; Hargreaves *et al.*, 1998; Borland *et al.*, 1999; Fitzgerald *et al.*, 2000; Mohammed *et al.*, 2004). Lediglich für die Metalloproteasen ADAM8 und ADAM9 wirken keine der TIMPs inhibitorisch (Amour *et al.*, 2002).

Synthetische Hydroxamat-basierende Inhibitoren wie Batimastat und Marimastat ersetzen das Zink-koordinierende Wassermolekül im katalytischen Zentrum und blockieren dadurch zinkabhängige Proteininasen (Maksos *et al.*, 1998). Über die Breitband-Inhibitoren hinaus wurde in letzter Zeit versucht, spezifischere Inhibitoren zu entwickeln (Kottirsch *et al.*, 2002; Sawa *et al.*, 2002), auch um das Problem der Redundanz zwischen den Metalloproteasen näher analysieren zu können. Hier sind die ebenfalls Hydroxamat basierten Inhibitoren GI254023X und GW280264X zu nennen (Ludwig *et al.*, 2005). GI254023X blockiert das konstitutive *Shedding* des IL-6-Rezeptors sowie der Chemokine CX3CL1 und CXCL16, welches durch ADAM10 vermittelt wird. Der Inhibitor hat aber keinen Einfluß auf die PMA-induzierbare Prozessierung dieser Substrate durch ADAM17. Daher kann GI254023X als preferentieller ADAM10-Inhibitor angesehen werden. Kinetische Analysen zeigten eine mehr als 100fach höhere Inhibiton von ADAM10 als von ADAM17 durch GI254023X (Ludwig *et al.*, 2005). Die PMA-induzierte sowie die konstitutive Freisetzung der genannten Substrate dagegen kann durch den Inhibitor GW280264X blockiert werden, welcher daher gegen beide Proteasen wirksam ist.

## 1.6 ADAM10 und ADAM17

ADAM17 wurde zunächst als die Protease identifiziert, welche den Tumor-Nekrosefaktor alpha (TNF-alpha) prozessiert, und wird daher auch als TACE (*Tumor necrosis factor alpha converting enzyme*) bezeichnet (Gearing *et al.*, 1994). Besondere Bedeutung kommt ADAM17 bei der Regulation von Entzündungsprozessen zu, vor allem durch die Beteiligung

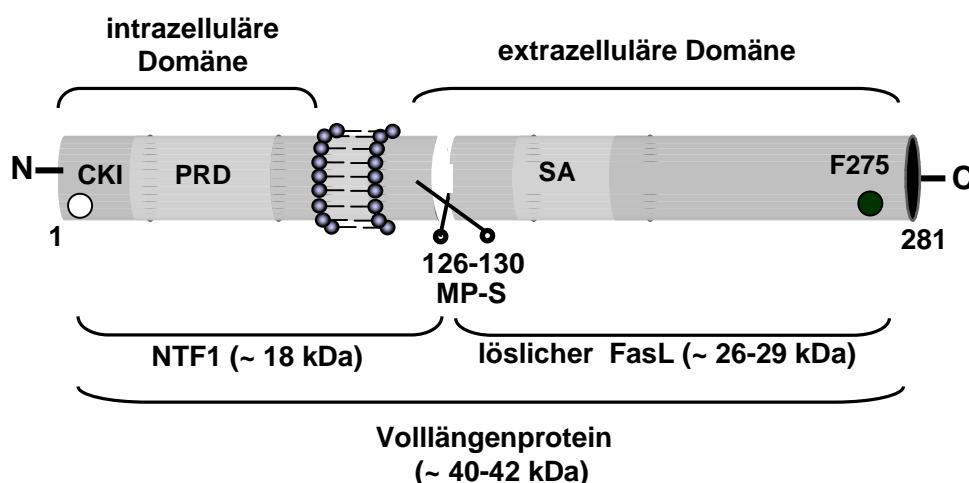
an der Prozessierung von Zytokinen wie dem Chemokin CX3CL-1 und Zytokin-Rezeptoren (CD30, CD40, IL-1-Rezeptor-II, IL-6-Rezeptor, IL-15-Rezeptor, TNF-Rezeptor I und TNF-Rezeptor II) (Peschon *et al.*, 1998a; Garton *et al.*, 2001; Hundhausen *et al.*, 2003; Matthews *et al.*, 2003; Black *et al.*, 2003; Becherer *et al.*, 2003; Contin *et al.*, 2003; von Tresckow *et al.*, 2004; Budagian *et al.*, 2004). Über die Regulation von Zytokinen und deren Rezeptoren hinaus ist ADAM17 ebenfalls an der Regulation von Wachstumsfaktoren und Wachstumshormonen beteiligt. So werden verschiedene Mitglieder der EGF-Familie prozessiert (Blobel *et al.*, 2005).

Die Metalloprotease ADAM10 (SUP-17/*C.elegans*, KUZ, kuzbanian/ *D. melanogaster*) ist ubiquitär exprimiert, wobei eine besonders hohe Expression im Gehirn beobachtet wird. Sie besitzt ein weites Substratspektrum und ist dadurch an sehr vielen unterschiedlichen Prozessen beteiligt. ADAM10, isoliert aus dem Rinderhirn, wurde zuerst als „*myelin basic protein degrading enzyme*“ beschrieben und später als ADAM10 klassifiziert (Chantry *et al.*, 1989).

Im adulten Organismus ist ADAM10, wie auch ADAM17, an verschiedenen Prozessen und Regulationsnetzwerken beteiligt, so u.a. an der Proteolyse der Wachstumsfaktoren Betacellulin, EGF und HB-EGF (Sahin *et al.*, 2004), des ImmunglobulinE-Rezeptors CD23 (Weskamp *et al.*, 2006) oder der Zytokine CX3CL1, CXCL16 und TNF- $\alpha$  (Abel *et al.*, 2004; Gough *et al.*, 2004). Als Zytokinrezeptor ist bisher nur der IL-6-Rezeptor als ADAM10-Substrat bekannt (Matthews *et al.*, 2003). Des Weiteren werden durch diese beiden Proteasen wichtige Adhäsionsmoleküle wie N- und E-Cadherin oder L1 prozessiert (Reiss *et al.*, 2006). Aufgrund der frühen Letalität von ADAM10- und ADAM17-defizienten Mausembryonen wurden zahlreiche Substratanalysen mit aus diesen Tieren gewonnenen Fibroblasten-Zelllinien durchgeführt. In diesen Untersuchungen zeigte sich auch für ADAM10 und ADAM17 eine hohe Redundanz gegenüber einer Vielzahl von Substraten. So wird z.B. APP von beiden Proteasen prozessiert, wobei allerdings die Rolle von ADAM10 in verschiedenen Zelllinien stark variiert (Hartmann 2002). In vielen Fällen wird beobachtet, daß ADAM10 ein bestimmtes Substrat konstitutiv spaltet, während ADAM17 das gleiche Protein unter bestimmten Stimulationsbedingungen, vor allem durch PMA-Stimulation, prozessiert. Dieses Prinzip findet man unter anderem bei diversen EGF-Liganden und den Adhäsionsmolekülen E- und N-Cadherin. Darüber hinaus ist bei den letzteren Molekülen auch die Spaltung durch ADAM10 über das konstitutive Maß hinaus durch das Ionophor Ionomycin oder Agenzien wie Staurosporin oder Methylcyclodextrin (MCD) stimulierbar (Maretzky *et al.*, 2005; Reiß *et al.*, 2005).

## 1.7 Der Fas Ligand

Der Fas-Ligand (FasL) ist ein aus 281 Aminosäuren bestehendes TypII Transmembranprotein. Schematisch ist der FasL in Abb.3 dargestellt. Extrazellulär besitzt er drei N-Glykosylierungsstellen sowie eine Selbstassemblierungsdomäne, die eine Trimerisierung des FasL vermitteln kann. Die Generierung des löslichen FasL (lFasL) wird durch die proteolytische Spaltung zwischen den Aminosäuren 125-131 erreicht (Tanaka *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 1998) Intrazellulär wird eine einzigartige prolinreiche-Domäne (PRD) sowie ein potentielles Casein-Kinase-Motif (CKI) gefunden.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der FasL- Struktur**

Der humane FasL ist 281 Aminosäuren umfassendes Typ II Transmembranprotein. Intrazellulär findet sich ein Casein-Kinase Motif (CKI) und eine prolinreiche Domäne (PRD), die Wechselwirkungen mit SH3 Domänen anderer Proteine vermitteln könnte. Extrazellulär sind Spaltstellen für eine oder mehrere Metalloproteasen beschrieben. Diese liegen zwischen der Transmembrandomäne und einer Region, die für die Selbstassemblierung des FasL von Bedeutung ist. Die C-terminale Domäne ist homolog zu anderen Mitgliedern der TNF-Familie und weist C-terminal einen für die Zytotoxizität kritischen Phenylalanin an Position 275 auf.

Der Fas Ligand gehört zur Familie der TNF-Zytokine. Diese Superfamilie besteht aus 19 Mitgliedern, die über die Bindung von insgesamt 29 Rezeptoren so unterschiedliche Prozesse wie Immunantworten, Haematopoese und Morphogenese regulieren. Pathophysiologisch sind sie unter anderem an der Tumorgenese, Diabetes, Rheumatoider Arthritis und am septischen Schock beteiligt (Aggarwal, 2003). Nach Bindung an den Rezeptor vermitteln die Mitglieder

der TNF-Familie entweder Apoptose (TNF, LT, FasL, TRAIL, TWEAK und LIGHT), Überleben (TRANCE, BAFF), Differenzierung (TNF, TRANCE, DR6) oder Proliferation (TNF, CD27L, CD30L, CD40L, APRIL, BAFF) (siehe Aggarwal *et al.*, 2003, und Referenzen darin)

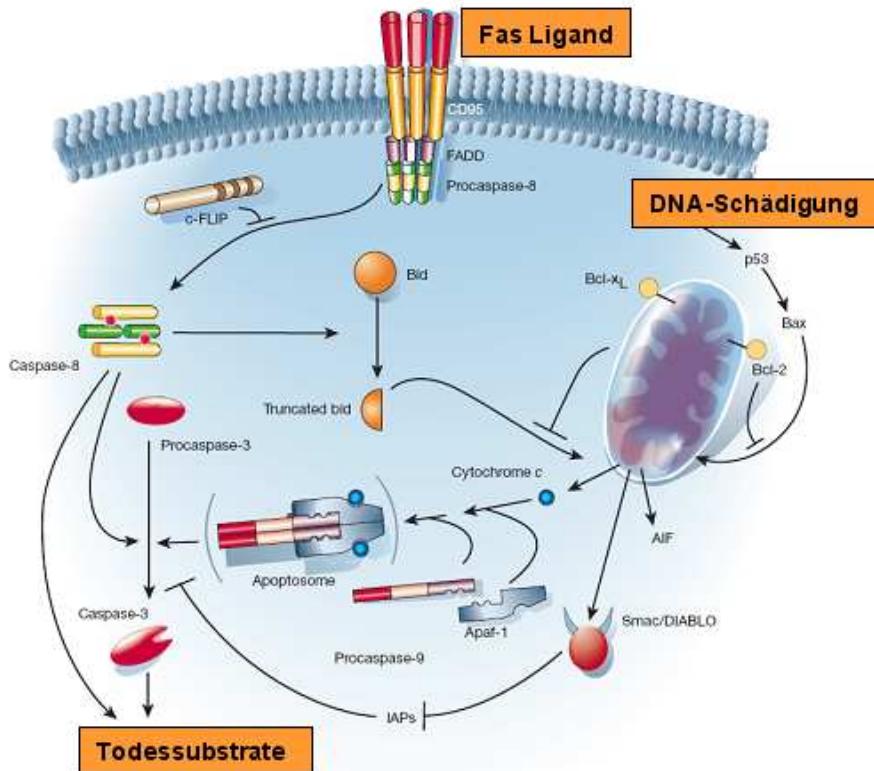
Der FasL wird insbesondere von zytotoxischen T-Zellen (CTLs) und Natürlichen Killerzellen exprimiert. Aber auch von Zellen der Schilddrüse (Giordano 1997), Keratinozyten (Gutierrez-Steil *et al.*, 1998), Neutrophilen (liles *et al.*, 1996), Astrozyten (Choi *et al.*, 1999) oder Mikroglia (Frigerio *et al.*, 2000) wird der FasL exprimiert. Des Weiteren findet man FasL-Expression in immunprivilegierten Geweben wie Gehirn, Hoden (Bellgrau *et al.*, 1995) und Auge (Griffith *et al.*, 1995) sowie in manchen Tumoren (O`Connel *et al.*, 1996).

Die Bindung von FasL an den Fas-Rezeptor induziert den programmierten Zelltod (Apoptose) der Fas tragenden Zelle. Die Apoptose stellt eine entscheidende Voraussetzung für die Metamorphose, Differenzierung sowie für die Homeostase eines Organismus dar (Krammer *et al.*, 2007).

Apoptose kann intrinsisch über die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien, zum Beispiel als Reaktion auf DNA-Schädigung, ausgelöst werden. Durch sogenannten Todesrezeptoren aus der TNF-Rezeptorfamilie wird ein extrinsisches apoptotisches Signal ausgelöst (Peter *et al.*, 1999). Beide Signalwege resultieren in der sequentiellen Aktivierung von Caspasen (Cysteinyl-Aspartat spezifischen Proteasen), die das kontrollierte genetische Programm der Apoptose vermitteln (siehe Hengartner, 2000 und Referenzen darin). Man unterscheidet Initiatorcaspasen von den nachgeschalteten Caspasen, die durch die Initiatorcaspasen aktiviert werden. Ziele der nachgeschalteten Caspasen sind unter anderem DNAsen, DNA-Reparaturenzyme und diverse Strukturproteine wie Aktin und Lamine. Dadurch werden die typischen Veränderungen der apoptotischen Zelle hervorgerufen, die sie z.B. von einer nekrotischen Zelle unterscheidbar machen. Schon morphologisch ist die Apoptose an der Abschnürung sogenannter apoptotischer Vesikel (Kerr *et al.*, 1972) zu erkennen, während bei der Nekrose Zytoplasma austritt. Biochemisch kann man den während der Apoptose auftretenden geordneten Abbau des Chromatins u.a. am Leitermuster der DNA im Agarosegel nachweisen.

Für den extrinsischen Weg stellt der Fas-Rezeptor (CD95) den gut untersuchten Prototyp der apoptotisch aktiven TNF-Rezeptoren dar. Die Bindung von FasL führt zu dessen Multimerisierung, was eine Rekrutierung der Caspase-8 über die sog. Todesdomänen im sog. DISC (death inducing signaling complex) bewirkt. Dies führt zur autokatalytischen Spaltung und damit Aktivierung der Initiatorcaspase-8. Diese Caspase aktiviert durch Spaltung der

Proformen verschiedene nachgeschaltete Effektorcaspasen wie Caspase-3. Aber auch Caspase-6 und Caspase-7, die einer Signalverstärkung durch Prozessierung der Caspase-8 vermitteln (Medema *et al.*, 1997; Kischkel *et al.*, 1995).



**Abb. 4: Intrinsischer und extrinsischer apoptotischer Signalweg**

Im intrinsischen Signalweg führt z.B. eine Schädigung der DNA zur Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol. Dadurch lagert sich ein als Apoptosom bezeichneter Multiproteinkomplex zusammen, der unter anderem Apaf-1 und Caspase-9 enthält. Die nachfolgende Spaltung der Effektorcaspase-3 stellt die Schnittstelle mit dem extrinsischen apoptotischen Signalweg dar. Dieser wird durch Ligandenbindung an einen apoptotisch aktiven Rezeptor aus der TNF-Superfamilie ausgelöst. Dabei stellt der Fas-Rezeptor den klassischen Todesrezeptor dar, und die Bindung des Fas-Liganden führt zu einer Trimerisierung des Rezeptors. Der weitere apoptotische Signalweg verläuft über die autokatalytische Aktivierung der Caspase 8. Details siehe Text.

(nach Hengartner, 2000)

Die für die Vermittlung des intrinsischen Signalwegs essentielle Zusammenlagerung des sogenannten Apoptosoms wird durch die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien eingeleitet, wobei dies wiederum durch DNA-Schädigung ausgelöst werden kann.

Auch für die erfolgreiche Ausführung eines extrinsischen Todessignals kann die Cytochrom c-Freisetzung notwendig sein. Dies ist der Fall, wenn nur wenig Caspase-8 im DISC rekrutiert

wird, so dass eine Aktivierung der Caspase-3 unterbleibt. Hier kann eine Signalverstärkung durch die Caspase-8 vermittelte Spaltung von Bid und dadurch ausgelöste Cytochrom c-Freisetzung (Li *et al.*, 1998, Luo *et al.*, 1998) erreicht werden, wodurch dann über diesen Weg doch noch die Caspase-3 aktiviert wird.

Im Immunsystem nimmt die Fas/FasL-vermittelte Auslösung der Apoptose eine Schlüsselfunktion ein. So wird z.B. eine Virusinfektion durch Auslösung von FasL-vermittelter Apoptose in infizierten Zellen bekämpft (Rouvier *et al.*, 1993). Auch stellt der FasL einen entscheidenden Vermittler der Tumorsuppression durch das Immunsystem dar (Rensing-Ehl *et al.*, 1995). Doch auch für die effektive Gegenregulation einer T-Zell vermittelten Immunantwort ist das Fas/FasL-System von entscheidender Bedeutung. Aktivierte, mature T-Zellen exprimieren gleichzeitig Fas und FasL, und sind sensitiv gegenüber FasL vermittelter Apoptose, wobei die Fas-Aktivierung auch in autokriner Weise geschehen kann (Nagata *et al.*, 1995; Brunner *et al.*, 1995; Dhein *et al.*, 1995, Scott, D. W. *et al.*, 1996). Dieses Phänomen wird als Aktivierungs-induzierter Zelltod (AICD) bezeichnet (Alderson *et al.*, 1995). Entsprechend zeigen Mäuse, deren FasL aufgrund einer Punktmutation (F275L) im C-terminalen Bereich Fas nicht binden können, den sogenannten *gld* (*generalised lymphoproliferative disease*)-Phänotyp, der auch als Canale-Smith-Syndrom beschrieben ist (Wu *et al.*, 1996; Rieux-Lauca *et al.*, 2003). Dieser ist durch eine Anhäufung von (autoreaktiven) T-Zellen charakterisiert (Cohen *et al.*, 1991). Eine vollständige Deletion des Fas Ligand-Gens verursacht darüber hinaus, ebenso wie die Deletion des *FasR* Gens, eine noch massivere Proliferation der Lymphozyten. Dies weist auf eine Restaktivität des *gld*-Alles hin (Karray *et al.*, 2004).

In Zellen des Immunsystems wird der FasL nach primärer Stimulation exprimiert und in spezialisierten Organellen, den sogenannten sekretorischen Lysosomen, gepeichert (Blott und Griffith, 2002). Nach Kontakt mit einer Zielzelle wird dieses Kompartiment zur immunologischen Synapse geleitet, so dass sich ihre zytotoxischen Proteine gegen die Zielzelle richten können (Bossi und Griffith, 1999).

Die Expression des FasL erfolgt im Rahmen der T-Zell-Aktivierung mit einer frühen Aktivität von Src-Kinasen über Stimulation des T-Zell-Rezeptors, und mehrere klassische Transkriptionsfaktoren wie NF-AT, NF- $\kappa$ B und c-myc binden am FasL Promoter (Janssen *et al.*, 2003). Durch den Entzug von Wachstumsfaktoren wird die Expression des FasL über den *forkhead* Transkriptionsfaktor stimuliert (Kavurma *et al.*, 2003; Brunet *et al.*, 1999).

Die Expression des FasL trägt zur Aufrechterhaltung des immunprivilegierten Status der entsprechenden Gewebe bei. In der Transplantationsbiologie werden allogene und sogar

xenogene, FasL-exprimierende Transplantate von immunprivilegierten Organen wie die Cornea vom Empfängerorganismus nicht abgestoßen (Bellgrau *et al.*, 1995, Griffith, *et al.*, 1995). Die weiteren Untersuchungen brachten allerdings widersprüchliche Resultate hinsichtlich der Übertragbarkeit dieses Phänomens auf die Transplantation anderer Gewebe wie den Langerhans Inseln, die zur konstitutiven Expression von FasL gebracht wurden. Während auf diese Weise in einer Studie die Abstoßung von transplantierten Langerhans-Inseln verhindert werden konnte (Lau *et al.*, 1996), führte die Überexpression von FasL in der anderen Untersuchung zu einer verstärkten Entzündungsreaktion (Allison *et al.*, 1997). In analoger Weise zum Modell des Immunprivilegs wird für eine Vielzahl von Tumoren angenommen, daß sie sich durch FasL Expression einem Zugriff des Immunsystems entziehen. Dieses Modell der FasL-vermittelten Deletion von infiltrierenden Immunzellen durch die Tumore wird als „*tumor counterattack*“ bezeichnet (O’Connell *et al.*, 1996; Hahne *et al.*, 1996).

### 1.7.1 Die proteolytische Prozessierung des Fas Liganden

Nachdem der FasL auf die Zelloberfläche gelangt, wird er in großem Ausmaß proteolytisch abgespalten und löslicher FasL (lFasL) sezerniert. Metalloprotease-Inhibitoren vermindern die Menge an lFasL bei gleichzeitiger Verstärkung der FasL-Oberflächenexpression (Tanaka 1999).

Die Identität der FasL-prozessierenden Metalloprotease ist lediglich für spezielle Gewebe oder durch *in vitro* Versuche bekannt (Powell *et al.*, 2001; Mitsuades *et al.*, 2001; Vargo-Gogola *et al.*, 2002a; Crawford *et al.*, 2002; Vargo-Gogola *et al.*, 2002b). Für Mausepithel-Zellen wurde beschrieben, dass MMP7 die Spaltung von biologisch aktivem, zytotoxischen FasL vermittelt (Powell 1999). Die Spaltstellen des humanen FasL wurden für Mauszellen an der Position Lysin<sup>129</sup>-Glycin<sup>130</sup> (Tanaka, 1998) kartiert, in humanen Zellen wird der hFasL zwischen den Aminosäuren Serin<sup>126</sup>-Leucin<sup>127</sup> geschnitten (Schneider 1998). Daher könnte der FasL in humanen bzw. murinen Zellen von unterschiedlichen Proteasen prozessiert werden, oder die gleiche Protease nutzt unterschiedliche Spaltstellen. *In vitro* kann der hFasL durch MMP7 an diesen beiden Schnittstellen, sowie darüber hinaus noch an einer membranproximalen Sequenz der Aminosäurereste 109-115 (ELAELR) (Vargo-Gogola *et al.*, 2002a).

Möglicherweise könnten unterschiedliche Spaltstellen in verschiedenen Zellsystem die beobachteten Unterschiede in der biologischen Aktivität des lFasL erklären: In hohen Konzentrationen kann der humane lösliche FasL toxisch wirken, wie Tanaka *et al.* mit Überständen von hFasL-transfizierten Zellen zeigen konnten. Da alle beschriebenen Spaltstellen außerhalb der für die zytotoxische Aktivität essentiellen Selbstassemblierungs-Domäne liegen, ist diese Beobachtung plausibel (Orlinick *et al.*, 1997). In anderen experimentellen Zusammenhängen wurde dem lFasL allerdings auch eine antiapoptotische Wirkung zugeschrieben, indem durch ihn die Bindung des membrangebundenen FasL an den Fas-Rezeptor blockiert wird (Schneider *et al.*, 1998). In erster Linie wird das Ektodomänen-*Shedding* des FasL als Mechanismus zur Herunterregulation seiner Aktivität interpretiert, da der membrangebundene, auf der Zelloberfläche exponierte FasL gegenüber der löslichen Form ein höhere biologische Potenz aufweist (Schneider *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1998; Suda *et al.*, 1997; Hohlbaum *et al.*, 2000).

Des Weiteren besitzt der lFasL in geringeren Konzentrationen proinflammatorische Wirkung, indem er als Chemokin auf Neutrophile wirkt (Ottonello *et al.*, 1999).

## 2 Wissenschaftliche Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten bisher nicht identifizierte Substrate für die Metalloprotease ADAM10 gefunden werden.

Aufgrund der Literaturlage erschienen Mitglieder aus der Familie der Tumor-Nekrosefaktoren hierfür als aussichtsreich. Insbesondere sollte untersucht werden, ob ADAM10 den Fas Ligand protelytisch prozessieren kann.

Eine Analyse der physiologische Relevanz der ADAM10-vermittelten proteolytischen Prozessierung des entsprechenden Proteins sollte folgen.

Darüber hinaus sollten in dieser Arbeit molekulare Mechanismen, die zur Sustratspezifität von ADAM-Proteasen beitragen, identifiziert werden. Des Weiteren sollten ebenso Fragen zu der Regulation der proteolytischen Freisetzung von ADAM-Substraten untersucht werden.

Hierfür sollten chimäre Proteasen aus ADAM10 und ADAM17 hergestellt werden. Mit ihnen sollten möglichst strukturelle Einheiten ermittelt werden, die notwendig und/oder hinreichend für die konstitutive oder stimuliert Aktivität der beiden ADAM-Proteasen sind.

Dazu sollten im Verlauf der Arbeit weitere Substrate identifiziert werden, die sich für die Chimärenanalysen eignen, da sie einer spezifischen Prozessierung durch jeweils eine der beiden ADAM-Proteasen unterliegen.

Basierend auf ADAM10/ADAM17-doppeldefizienten Mausfibroblasten, die in der Arbeitsgruppe hergestellten worden waren, sollten auf diesem Weg methodische Grundlagen zur Untersuchung der Spezifität und Regulation von ADAM-Proteasen aufgebaut werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Agarosegeldokumentationsanlage	Gel Jet Imager, Intas, Göttingen, D
Agarosegelkammer	Modell H5, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA
Chemilumineszenzkammer	Fujifilm, Kanagawa, Japan
1000/LAS-1000	GeneQuant pro, Biochrom Ltd, Cambridge, UK
DNA-Photometer	Gene Pulser™, BioRad, München, D
Elektroporationsgerät	Heraeus, Hanau, D
Inkubatoren (Zellkultur)	Memmert, Schwabach, D
(Bakterien)	Sunrise, Tecan, Crailsheim, D
96-well-Mikrotiterplattenleser	BioRad, München, D
Nass-Blot-Apparatur	AMAXA, Köln, D
(Trans Blot/Wet Blot)	Perkin Elmer, USA
Nukleofektionsgerät Nucleofector™	Krick, Langenselbold, D
PCR-Cycler	BioRad, München, D
pH-Meter	BioRad, München, D
SDS-PAGE Kammer Mini-Protean	Claus Damm A/S, Humlebaek, DK
3-Elektrophoresis-System,	Eppendorf, Hamburg, D
Spannungsquelle Powerpack 200/300	Camag, Muttenz, Ch
Sterilbank danLAF VFR 1806	
Thermoblock Thermomixer 5436	
UV-Tisch Reprostar	
<u>Mikroskope</u>	
Fluoreszenzmikroskop, Modell Axiovert	Zeiss, Jena, D
Fluoreszenzkamera, Axiovert 200M	Zeiss, Jena, D
Fluoreszenzfilter – A350/A488/A594	Zeiss, Jena, D
Phasenkontrastmikroskop	Leika
<u>Zentrifugen:</u>	
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, D
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Zellzentrifuge Universal 32, Typ1605	Hettich, Tuttlingen, D

### 3.1.2 Verbrauchsmaterial

Zellkultur-Material	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kunststoffverbrauchsmaterial	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterilfilter	Roth, Karlsruhe, D
PVDF-Membran	Roth, Karlsruhe, D
Whatmanpapier	Roth, Karlsruhe, D
Parafilm „M“	American National Can <sup>TM</sup> , Chicago, IL, COREX", Du Pont Instruments, Wilmington, DE, USA
Zentrifugenröhrenchen	
Protein-G-Sepharose	Gibco, Paisley, Schottland

### 3.1.3 Chemikalien

30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, D
Agar-Agar, hochreine Qualität	Roth, Karlsruhe, D
Agarose, Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumchlorid, 99,5%	Roth, Karlsruhe, D
Ampicillin	Melford Laboratories, Chelsworth, UK
APS	Roth, Karlsruhe, D
BSA	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Bromphenolblau	Canalco, Bethesda, MD, USA
Calciumchlorid	p.a., Merck, Darmstadt, D
CIAP	Fermentas, St. Leon-Rot, D
ConcanavalinA	Sigma Aldrich, Steinheim, D
L-Cysteinhydrochlorid	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA
DABCO	Sigma Aldrich, Steinheim, D
DAPI	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Dithiothreitol	Sigma Aldrich, Steinheim, D
DMSO	Sigma Aldrich, Steinheim, D
DNA-Auftragspuffer	6x Loading Dye, Fermentas, St. Leon-Rot, D
DNA 1kb Marker, DNA-Längenstandard	Roche, Mannheim, D
DNA-Polymerasen	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Pfu	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Taq	Fermentas, St. Leon-Rot, D
dNTPs	Gibco, Paisley, Schottland
EBSS	Roth, Karlsruhe, D
EDTA	Riedel-deHaen, Seelze, Germany
Eisessig, 99-100%	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol, 99.8 %	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromidlösung,	Roth, Karlsruhe, D
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin, D
Ficoll (1.077 g/ml)	Biochrom AG, Berlin
Fugene6	Roche, Mannheim, D
Glycerol	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D

Hefeextrakt, pulv., f.d. Bakteriologie	Roth, Karlsruhe, D
HEPES	Roth, Karlsruhe, D
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
Ionomycin	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Kanamycin	Sigma Aldrich, Steinheim, D
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, D
Methyl-Cyclo-Dextrin (MCD)	Research Biochemicals International (Natick, MA, USA), Calbiochem, Darmstadt, D
Mowiol	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Natriumazid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe, D
Neomycin	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
4-Nitrophenyl-Phosphat Dinatrium	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Hexahydrat (NBT)	Calbiochem, Darmstadt, D
NP-40	Merck, Darmstadt, D
Paraformaldehyd, reinst	PAA-Laboratories, Linz, A
Penecillin/Streptomycin, 100x	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)	Murex Biotech, England
Phytohemagglutinin (PHA)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Ponceau S-Lösung, 0,1% ig	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Poly-D-Lysin	Merz Pharma, Frankfurt a.M., D
Pursept A	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Restriktionsenzyme	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D
rekombinantes huADAM10	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D
rekombinantes humanes ADAM17	Alexis Biochemicals, Lörrach, D
rekombinanter humaner Fas-Ligand	Chiron GmbH, Marburg, D
rekombinantes Interleukin-2 (rIL-2)	Toxin Technologies, FL, USA
Staphylococcal enterotoxin superantigen A, B, C, D, E (SEA, B, C, D, E)	Roth, Karlsruhe, D
SDS	Pierce, Rockford, IL, USA
SulfoLink™ Coupling Gel	Fermentas, St. Leon-Rot, D
T4 DNA-Ligase	Roth, Karlsruhe, D
Temed, 99% für SDS-PAGE	Roth, Karlsruhe, D
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Trypanblau, 0,4%	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypsin/EDTA	PAA-Laboratories, Linz, A
Trypton/Pepton aus Casein	pankreatisch verdaut, Roth, Karlsruhe, D
Tween-20	Sigma Aldrich, Steinheim, D

### 3.1.4 Inhibitoren

AEBSF	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim, D
GI254023X	Professor Andreas Ludwig, RWTH Aachen
GM6001	Calbiochem, Darmstadt, D
GW280264X	Professor Andreas Ludwig, RWTH Aachen
Lactacystin	Calbiochem, Darmstadt, D
PepstatinA	Sigma Aldrich, Steinheim, D
TAPI-1	Calbiochem, Darmstadt, D
ZVAD-fmk	Bachem, Bubendorf, Ch

### 3.1.5 Verwendete Kits

Human Leukocyte Nucleofector	Amaxa, Köln, D
High Pure PCR Purification Kit	Roche, Mannheim, D
peqGold Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen, D
Pure Yield Plasmid Midiprep Kit	Promega, Mannheim, D
Annexin V-FITC Apoptosis	
Detection Kit	BD Bioscience, Heidelberg, D
Quiaquick Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden, D
Western Blotting Detektionskit	Amersham, Braunschweig, D

### 3.1.6 Vektoren

Als Basisvektor wurde für alle Konstrukte, die verschiedene ADAMs bzw. ADAM10/ADAM17- Chimäre Proteine exprimieren, pcDNA 3.1 von Invitrogen verwendet. Für huFasL bzw. dessen generierte Mutanten wurde pcDNA3 p217 (Invitrogen) verwendet. pcDNA3.1 besitzen einen T7 Promotor und können über Ampicillin-Resistenz in *E.coli* XL-1 Blue selektiert und so amplifiziert werden.

Name	Insert	Vektor	Quelle
<b>p217s</b>	humaner Fas Ligand	pcDNA3.1	AG Janssen, CAU Kiel
<b>mADAM10</b>	Maus ADAM10	pcDNA3.1	Thorsten Maretzky, Kiel
<b>mADAM17</b>	Maus ADAM17	pcDNA3.1	Thorsten Maretzky, Kiel
<b>ADAM10dn</b>	Maus ADAM10, MP deletiert	pcDNA3.1	Athena Chalaris, Kiel
<b>ADAM17dn</b>	Maus ADAM10, MP deletiert	pcDNA3.1	Athena Chalaris, Kiel
<b>Dynamin K44A-HA</b>	Dominant-negative Dynamin-2 Mutante	pcDNA3.1	Stefan Lichtenthaler, München

### 3.1.7 Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Kulturbedingungen	Referenz
<b>PS1<sup>+/+</sup> SV</b>	embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen	DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep	D. Hartmann, Leuven, Belgien
<b>12<sup>+/+</sup></b>	embryonale Mausfibroblasten, primär oder spontan transformiert	DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep	eigene Arbeitsgruppe
<b>36<sup>-/-</sup></b>	ADAM10-defiziente embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen	DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep	D. Hartmann, Leuven, Belgien
<b>40<sup>-/-</sup></b>	ADAM10- defiziente embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen	DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep	D. Hartmann, Leuven, Belgien
<b>ADAM9<sup>-/-</sup></b>	embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen	DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep	Carl Blobel, New York, USA
<b>ADAM15<sup>-/-</sup></b>	embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen	DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep	Carl Blobel, New York, USA
<b>ADAM17<sup>-/-</sup></b>	embryonale Mausfibroblasten, immortalisiert mit dem großen SV-40 Antigen	DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep	K.Reiß, Kiel, D
<b>HEK-293T</b>	Menschliche epitheliale Zelllinie aus der embryonalen Niere	DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep	ATCC, etablierte Zelllinien
<b>COS-7</b>	Nieren-Fibroblasten aus <i>Cercopithecus aethiops</i> , immortalisiert mit dem großen SV40 T-Antigen	DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep	ATCC, etablierte Zelllinien
<b>HeLa</b>	menschliche epithelartige Zelllinie aus einem Zervix-Karzinom	DMEM, 10 % FKS, 1% Pen/Strep	ATCC, etablierte Zelllinien
<b>Jurkat (E6-1)</b>	Humane Leukämie-Zelllinie	RPMI1640, 5 % FKS, 1% Pen/Strep	ATCC, etablierte

<b>K562</b>	Humane Leukemie-Zelllinie	RPMI1640, 5 % FKS, 1% Pen/Strep	David Kaplan
<b>KFL-9</b>	Stabil FasL transfizierte K562-Zellen	RPMI1640 5% FKS, 1% Pen/Strep	David Kaplan
<b>T-Zellklon 12603</b>	CD4+ T-Zellklon	RPMI1640 5% FKS, 1% Pen/Strep	AG Jannsen CAU Kiel

### 3.1.8 Antikörper

<b>3.1.8.1.1.1 Antikörper</b>	<b>erzeugt in</b>	<b>IF</b>	<b>WB</b>	<b>Herkunft</b>
<b>Primärantikörper</b>				
<b>β-Actin</b>	Maus		1.5000	Santa Cruz
<b>α- E-Cadherin (Klon36)</b>	Maus	1:300	1:1500	BD Bioscience
<b>α-ADAM10 (B42.2)</b>	Kaninchen		1:10000	Leuven
<b>α-hFasL (Ab-3)</b>	Kaninchen		1:500	Calbiochem
<b>α-hFasL (G247-4)</b>	Maus		1:2000	BD Pharmingen
<b>α-hFasL (Nok- 1)</b>	Maus			BD Pharmingen
<b>α-hFas (B10)</b>	Maus		1:500	Santa Cruz
<b>α-HA (3F10)</b>	Ratte	1:300	1:1500	Roche
<b>α-HIS (14/45/31-2)</b>	Maus		1:1000	Dianova
<b>α-humanes c-Myc Epitop (9E10)</b>	Maus		1:5000	Santa Cruz
<b>α-Flag (M-2)</b>	Maus		1:2500	Sigma
<b>Sekundärantikörper</b>				
<b>α-Kaninchen, HPR-konjugiert, sc2313</b>	Esel	--	1:10000	Santa Cruz, Heidelberg
<b>α-Maus, HRP-konjugiert</b>	Schaaf	--	1:10000	Santa Cruz, Heidelberg
<b>α-Ratte, HRP-konjugiert</b>	Esel	--	1:10000	Santa Cruz, Heidelberg
<b>α-Ratte AF488 IgG</b>	Esel	1:500		Molecular Probes
<b>α-Maus AF594 F(ab)<sub>2</sub></b>	Ziege	1:500		Molecular Probes

### 3.1.9 Oligonukleotide

#### Stealth si-RNAi (Invitrogen)

Fas Staeth RNAi: HSS100597, HSS100598, HSS100599  
ADAM10 Stealth RNAi: HSS100165, HSS100166, HSS100167

#### Sequenzierungs-Primer

##### Humaner FasL

217_vec_fwd	CGAGCTCGGATCCACTAG
217_vec_rev	CTAGATGCATGCTCGAGC
3.1fwd	TAATACGACTCACTATAGGG
3.1rev	TAGAAGGCACAGTCGAGGC
HAfwd	ATGTACCCATACGATGTTCCAGATTAT
FasL-rev_91-73	GAAGAACTGTGCCTGGAG
FasL-fwd_740-758	CAGTGTCAATCTTACCAAG

##### Maus-ADAM10

m10p1-394	GGTGGCACGTTTACATTGAG
m10P2-775	CAGACTACAGACTTCTCCGGA
m10P3-1248	CATCATGTATGCAAGAGCAAC
m10p4-1604	GGATATGCAATGGCTTCACAG
m10p5-2010	CATTGCTGAGTGGATTGTG

##### Maus-ADAM17

m17p1-351	TCATGTGGTTGGTGAGCC
m17p2-704	TTTATAAATACATGGGCC
m17p3-1051	GCTTACGTTGGTTCTCCC
m17p4-1415	GCGCAGCAACAAGGTGT
m17p5-1754	AGCAGGAGCTGGAGTCCTGC
m17p6-2101	CAGTATGAATCCCTGTCT

#### Chimären-Herstellung

##### 10HA

GCTGGATCCTTAAGCATAATCTGGAACATCGTATGGGTACATGCGTCGCATGTGTCCCAT  
TTG

##### 17HA

GCTGGATCCTTAAGCATAATCTGGAACATCGTATGGGTACATGCACTCTGTCTTTGCT

##### KTTT (10/17)

10/17_1 (fwd)	GTTGCCACACACCTTGTGCCAGATTCAACAAAACAG
10/17_2 (rev)	CTGTTTGTGAATCTGGCAACAAGGTGTGGCAAC

##### TKKK (17/10)

17/10_1 (fwd)	GCTTCCAGGAGCGCAGCCAGCCTATCTGTGGAAACG
17/10_2 (rev)	CGTTCCACAGATAGGCTGGCTGCGCTCCTGGAAAGC

KKTT (AB)

A (fwd) TATGAAAACATTGCTGAGGTTGGGTCTGTTCTGGTT  
B (rev) AACCAACAGACCCAACCTCAGCAATGTTTCATA

KKKT (CD)

C (fwd) GCCCTGATCATGTTAATGTGTGGATAAGAAACTG  
D (rev) CAGTTCTTATCCACACACATTAACATGATCAGGGC

TTKK (EF)

E (fwd) TTCTGGCAGATAACATCTGGATTGTGGCTCACTGG  
F (rev) CCAGTGAGCCACAATCCAGATGTTATCTGCCAGAAA

TTTK (GH)

G (fwd) TTCAGCATTCTGTCCACGCTGGATTATCAAGATTH  
H (rev) AATCTTGATAAAATCCAGCGTGGACAAGAATGCTGAA

KTKK (IJ)

I (fwd) TTTCTGGCAGATAACATCTGGATTGTGGCTCACTGG  
J (rev) CCAGTGAGCCACAATCCAGATGTTATCTGCCAGAAA

TKTT (KL)

K (fwd) TATGAAAACATTGCTGAGGTTGGGTCTGTTCTGGTT  
L (rev) AACCAACAGACCCAACCTCAGCAATGTTTCATA

KTK

KTKrev ATCTTGATAAAATCCAGCGTGGACAAGAATGCTG  
TTKtfwd CTGATCATGTTAATGTGTGGATAAGAAACTG

TTKT

TTKTrev CAGTTCTTATCCACACACATTAACATGATCAGG  
KTKfwd AGCATTCTGTCCACGCTGGATTATCAAGATTGC

lösliches ADAM10 (sAD10)

sAD10 CA-GGATCC-TTA-AGCATAATCTGGAACATCGTATGGGTACAT-  
CTCTATGAAAACATTGCT

ADAM10 mit deletierter zytoplasmatischer Domäne (AD10delCy)

AD10\_delCy GCT-GGATCC-TAA-AGCATAATCTGGAACATCGTATGGGTACAT-  
TCCAGC-CATTAACATGATC

**Humaner Fas Ligand- Kstrukte**

FasL-HA N-term TATGGATCCCAGCAGCCCTCAATTACC

D4 (del 111-131)

D4fwd CTTCCACCTACAGAAGGAGCCAGTCCACCCCTGAAAAA  
D4rev TTTTCAGGGGTGGACTGGCTCCTCTGTAGGTGGAAG

D5 (del 128-131)

Del\_128-131\_fwd      CACACAGCATCATCTTGGGCCACCCAGTCCAC  
Del\_128-131\_rev      GTGGACTGGGGTGGCCAAAGATGATGCTGTGTG

P206D

P206Dfwd      TCAATCTTGCACAAACCTGGACCTGAGCCACAAGGTCTAC  
P206Drev      GTAGACCTTGTGGCTCAGGTCCAGGTTGCAAGATTGA

F275L

F275Lfwd      GAATCTCAGACGTTATTCGGCTTATAT  
F275Lrev      ATATAAGCCGAATAACGTCTGAGATTTC

S126L/L127L

S126L/L127Efwd      CACAGCATCAGAGGAGGAAGCAAATAGGCCA  
S126L/L127Erev      TGGCCTATTGCTTCTCCTCCTGTGATGCTGTG

Del 40-80

del 40-80 fwd      TCTGTGCCAGAAGGCCTCTGTGTCTCCTGTGATG  
del 40-80 rev      CATCACAGGAGACACAGAGGCCTGGGCACAGA

Del intra

del\_intra\_myc      GTTGCCTCGAGATGGAACAAAAACTTATTCTGAAG  
AAGATCTGCTGTCTCCTGTGATGTT

TTF

TTF fwd      TGCTTGTCCCTCAGCCTCTGTGTCTCCTGTGATG  
TTF\_rev      TCACAAGGAGACACAGGAGGCTGAGGAACAAGC

FFT

FFT\_rev      CCACGATCAGGAAGGAGAAGCCTGTGCTGTGGTCCC  
FFT\_fwd      AACCACAGCACAGGCTCTCCTGTGATCGTGG

FTF

FTF\_fwd:      TGCACTTGGAGTGATCCAGCTTCCACCTACAG  
FTF\_rev:      CTGTAGGTGGAAGAGCTGGATCACTCCAAAGTGCAG

TFT

TFT\_fwd:      TGGGCCTGGGGATGTTGGCCCCCAGAGGGAAG  
TFT\_rev:      CTTCCCTCTGGGGCCAAACATCCCCAGGCCA

Humaner FasL:

FasL\_N-term myc\_Xho\_fwd:  
GTTGCCTCGAGATGGAACAAAAACTTATTCTGAAGAAGATCTGCAGCAGCCCTCAATT  
ACC

TNF\_C-term Bam\_rev:

TAAGGATCCTTAGAGCTTATATAAGCCGAAAAAC

Humaner TNF $\alpha$ :

TNF\_N-term myc\_Xho\_fwd:  
GTTGCCTCGAGATGGAACAAAAACTTATTCTGAAGAAGATCTGAGCACTGAAAGCATGA  
TCC

TNF\_C-term Bam\_rev:  
TAAGGATCCTCACAGGGCAATGATCCCAAAG

### 3.1.10 Medien und Lösungen

DMEM	PAA Laboratories, Linz, A
RPMI-1640	PAA Laboratories, Linz, A
Erythrozytenlysepuffer	0,16 M NH <sub>4</sub> Cl, 0,01 M KHCO <sub>3</sub> , 0,1 mM Na-EDTA, pH 7,4
FKS	PAA Laboratories, Linz, A; 30 min hitzeinaktiviert bei 56°C
LB-Medium	10 % Trypton/Pepton aus Casein, 5 % Hefeextrakt, 10 % NaCl, pH 7,0
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,4
PBA	PBS, 0,5 % BSA, 0,02% NaN <sub>3</sub>
TBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris, pH 7,4
TBS-T TBS, 0,01 % Tween	
Lysispuffer	ADAM10 (1% Triton-X-100, 5 mM Tris, 1 mM EGTA, 250 mM Saccharose, pH 7,4) RIPA (1% NP40, 0,1% SDS, 150mM NaCL, 10mM NaPO4, pH 7,2)
Waschpuffer (Immunfluoreszenz)	1% BSA (w/v) in PBS mit 0.1% w/v Natrium-Azid (NaN3)
Fixierlösung (Immunfluoreszenz)	1% PFA (w/v) in PBS, store at 4°C in the dark

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

Sämtliche Zellen wurden bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Kultivierung von adhärenten Zellen erfolgte in DMEM-Medium, Suspensionszellen wurden in RPMI-1640-Medium kultiviert. Den Medien wurde 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) und 10% FKS (v/v) zugesetzt.

#### 3.2.1.1 Gewinnung und Kultivierung von primären T-Zellen

PBMNZ (periphere mononukleäre Blutzellen) wurden aus Eigenblut mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurde das mit Heparin versetzte Blut über Ficoll-Hypaque (Dichte 1,077) geschichtet und für 20 min bei 2000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Die PBMNZ, die sich entsprechend ihrer Dichte in der Interphase zwischen Serum und Ficoll ansammeln, wurden abgenommen und mit PBS sowie Kulturmedium gewaschen. Die verbleibenden Erythrozyten wurden mittels Erythrozyten-Lysepuffer entfernt, wonach ein weiterer Waschschritt mit PBS folgte. Zur Herstellung von PHA-Blasten wurden diese Zellen in einer Dicht von  $2.5 \times 10^6$  in Gegenwart von 0.5 µg/ml PHA für drei Tage kultiviert. Lebende Zellen wurden mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation von Zelltrümmern abgetrennt und in Gegenwart von rIL-2 (10 U/ml) in RPMI 1640 weiter kultiviert. Die Zellen wurden nach weiteren 12-16 Tagen verwendet.

#### 3.2.1.2 Passagieren von adhärenten Zellen

Das Medium einer konfluent bewachsenen Schale wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA Lösung bei 37°C bis zum Ablösen inkubiert. Nach Ablösung der Zellen wurde zur Inhibition des Trypsins serumhaltiges Medium zugegeben, die Zellen hierin resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung in neue Zellkulturschalen mit frischem Medium ausgesät.

### **3.2.1.3 Einfrieren von Zellen**

Zur Aufbewahrung der Zellen in flüssigem Stickstoff ließ man die zum Einfrieren bestimmten Zellen bis zu einer etwa 80 %igen Konfluenz in 100 mm Schalen wachsen. Nach der Trypsinierung (siehe 3.2.1.2) und der Aufnahme der Zellen in 5 ml Medium wurde die Suspension 5 min bei 600 x g zentrifugiert (Universal 32, Typ 1605, Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und für 10 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die gleiche Menge Gefriermedium (20 % DMSO (Dimethylsulfoxid) in vollständigem Zellkulturmedium) zugegeben. 1ml Aliquots wurden in Schraubdeckelrörchen zunächst für 24 Stunden in Styroporbehältern bei -80 °C gelagert, bevor die Rörchen zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff bei -196°C überführt wurden.

### **3.2.1.4 Auftauen von Zellen**

Die aufzutauenden Rörchen wurden bei 37°C im Wasserbad fast vollständig aufgetaut. Unter der Sterilbank wurde nun die aufgetaute Zellsuspension in ein 15 ml Rörchen mit 5 ml Zellkulturmedium gegeben und für 3-5 min bei 600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und zur Kultivierung in einer 25 mm<sup>2</sup>-Flasche im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Anwachsen der aufgetauten Zellen kontrolliert. Tote Zellen wurden durch Mediumwechsel entfernt.

### **3.2.1.5 Ernten von eukaryotischen Zellen**

Die mit den zu erntenden Zellen bewachsenen Zellkulturschalen wurden auf Eis gestellt und die Zellen nach Absaugen des Mediums zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem biegsamen Zellschaber abgeschabt und mit 2 x 0,5 ml eiskaltem PBS in 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Eppendorfgefäß wurde 5 min bei 4 °C und 5000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet entweder direkt weiterverwendet oder auf Trockeneis abgekühlt und anschließend bei -80 °C eingefroren.

### **3.2.1.6 Herstellung von Zelllysaten**

Zelllysaten wurden hergestellt, indem das Zellpellet je nach Größe in etwa 50-400 µl Lysispuffer (1:25 mit Complete-Proteaseinhibitor) durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren

resuspendiert wurde. Es folgte eine 10-30 minütige Inkubation auf Eis, gefolgt von einem weiteren Resuspensionsschritt. Im Anschluss wurde das Lysat 5 min bei 14000 rpm bei 4°C zur Abtrennung von Zellkernen und anderem Zelldebris in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und der Proteingehalt ermittelt (siehe unten). Das Lysat wurde je nach Konzentration mit 2-4fach konzentriertem, reduzierendem SDS-PAGE Probenauftragspuffer (4x Stammlösung: 250 mM Tris/HCl pH 6,8; 9 % SDS; 40 % Glycin; eine Spatelspitze Bromphenolblau; 25 %  $\beta$ -Mercaptoethanol in H<sub>2</sub>O) versetzt und 5 min im Thermoblock bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden entweder direkt auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen oder bei -20°C verwahrt.

### 3.2.1.7 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

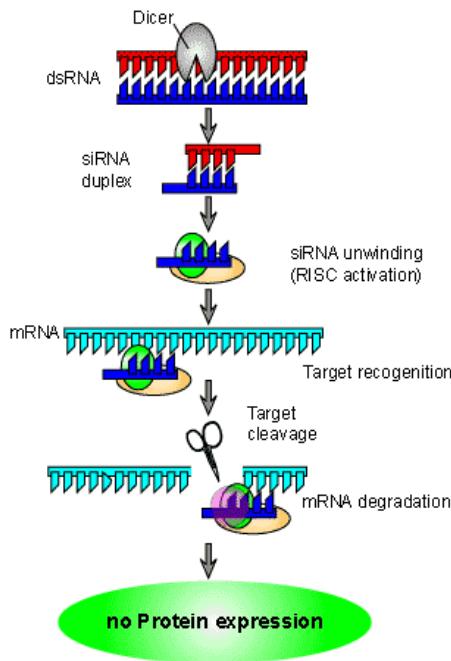
Für die Transfektion wurden die Zellen bis zu einer Dichte von etwa 60-80% kultiviert und vor der Transfektion mit neuem Zellkulturmedium versorgt. Für die Verwendung der transfizierten Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz wurden diese auf Deckglässchen kultiviert. Die Transfektion erfolgte mit FuGene6 (Roche, Heidelberg). Dabei wurden 100  $\mu$ l DMEM ohne Serum mit 3  $\mu$ l FuGene und 1,0  $\mu$ g DNA in einem Eppendorfgefäß gemischt und für mindestens 15- 45min bei Raumtemperatur inkubiert. Das lipophile Reagenz bildet mit der zu transfizierenden DNA einen Lipid-DNA-Komplex, der zur DNA-Aufnahme in die Zellen und anschließender Expression in diesen führen soll. Das Transfektionsreagenz blieb für 6 bis 24 Stunden auf den Zellen. Die Expression des transfizierten Gens wurde nach 24 bis 72 Stunden mittels Immunfluoreszenz ( 3.2.4.5), Immunoblot-Analyse ( 3.2.2.3) oder ELISA (3.2.4.7) untersucht.

### 3.2.1.8 siRNA

„RNA interference“ (RNAi) kann als posttranskriptioneller „gene silencing“ Mechanismus zur Herunterregulation der Genexpression in Protozoen, Pilzen, Pflanzen und Tieren nachgewiesen werden. Durch doppelsträngige RNA (dsRNA) wird die sequenzspezifische Degradation homologer mRNA-Moleküle ausgelöst.

Dabei wird im sogenannten Initiationsschritt zunächst doppelsträngige RNA durch die Ribonuklease Dicer in „short interfering“ RNAs (siRNAs), die eine Länge von 21-26 Nukleotiden aufweisen, prozessiert. Dadurch lagern sich hier zusätzliche Proteine mit je einem siRNA-Molekül zum „induced silencing complex“ (RISC) zusammen. Anschließend kommt es zur Erkennung und Degradation der Ziel-mRNA. Die Erkennung erfolgt dabei

durch die Ausbildung komplementärer Basenpaarungen zwischen der siRNA und dem Zielmolekül. Die abschließende Degradation der mRNA wird durch eine endonukleolytische Aktivität des RISCs katalysiert.



**Abb. 5: Schematische Darstellung der RNAi-vermittelten Verhinderung der Genexpression**

Im Initiationsschritt werden doppelsträngige RNA-Moleküle durch die Ribonuklease Dicer in „*short interfering*“ RNAs (siRNAs) prozessiert, wodurch sich hier zusätzliche Proteine mit je einem siRNA-Molekül zum „*induced silencing complex*“ (RISC) zusammenlagern.

Dadurch kommt es zur Erkennung und Degradation der ZielmRNA. Die komplementärer Basenpaarungen vermittelt die Erkennung zwischen der siRNA und dem Zielmolekül und führt zur Ausbildung dieses Komplexes. So kann durch eine endonukleolytische Aktivität des RISCs die abschließende Degradation der mRNA katalysiert werden.

Zur Herunterregulation der endogenen ADAM10-Expression in humanen T-Zellen (PHA-Blasten) wurden folgende RNAi-Oligonukleotide (Stealth RNAi, Invitrogen) verwendet: HSS100165, HSS100166 und HSS100167. Als negative Kontrolle wurde unspezifische RNAi mit einem niedrigen GC-Gehalt verwendet (Stealth™ RNAi Negative Control LO GC (12935-200)). Pro Transfektionsansatz wurden  $5 \times 10^6$  mit insgesamt 150 pMol einer äquimolaren Mischung der drei Konstrukte transfiziert. Dazu wurde das Programm X-01 des AMAXA Elektroporationssystems entsprechend den Anweisungen des Herstellers verwendet. Nach 6 Stunden Inkubation wurde das Medium erneuert und die Zellen für weitere 72 Stunden inkubiert. Nach Restimulation mit PMA und Ionomycin, wurde das Konditionierte Medium geerntet und die Menge des freigesetzten löslichen FasL mit ELISA gemessen. Nachfolgend wurde die erfolgreiche Herunterregulation der ADAM10-Expression im Immunoblot kontrolliert.

Für die Herunterregulation des FasR in Hela-Zellen wurden die Stealth-RNAi-Oligonukleotide HSS100597, HSS100598 und HSS100599 verwendet und mittels Fugene in die Zellen eingebracht. Dabei wurden pro 6-well 1 $\mu$ l Fugene und 20pMol einer äquimolaren Mischung der drei Oligos verwendet.

### 3.2.2 Biochemische Methoden

#### 3.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Proteingehaltsbestimmung erfolgte nach der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode mit einem Kit der Firma Pierce (Rockford, USA) im 96-well-Format. Es wurde die Extinktion bei 562nm gemessen. Als Standard dienten serielle BSA-Verdünnungen in ddH<sub>2</sub>O (Sigma Aldrich, Steinheim, D). Es wurden Dreifachwerte gemessen und der Mittelwert wurde für die Berechnung der Proteinkonzentration verwendet.

#### 3.2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels der diskontinuierlichen SDS-PAGE können Proteine unabhängig von ihrer Ladung nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dies geschieht mit Hilfe eines elektrischen Feldes, das an ein Polyacrylamidgel angelegt wird, sowie einem SDS- haltigen Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem nach Laemmli, 1977. Es wurde ein vertikales Mini-Protean-3-Elektrophoresis-System verwendet (BioRad, Hercules, USA). Die Porengröße der 1,5 mm dicken Trennägele wurde über den Acrylamidanteil festgelegt, wobei für die Auftrennung großer Proteine ein niedriger Anteil an Acrylamid (10%) verwendet wurde, für kleinere Proteine, insbesondere die Spaltfragmente des FasL, wurden 15%ige Gele verwendet. Als Proteinstandard diente Precision Plus Protein Standard All Blue Molekulargewichtsmarker von BioRad (München). Der Gellauf wurde mit einem Vorlauf von ca. 10 min bei 80 V und einem Gellauf bei 120-150 V durchgeführt. Durch eine Färbung mit Coomassiefärbelösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blue (w/v) (Sigma, Steinheim), 40 % Methanol, 10 % Essigsäure in H<sub>2</sub>O) nach Weber & Osborn (1969) oder durch Immunoblotting (3.2.2.3) konnten die aufgetrennten Proteine anschließend detektiert werden. Coomassie gefärbte Gele wurden in 5 % Methanol und 7,5 % Essigsäure entfärbt.

#### 3.2.2.3 Immunoblot (Westernblot)

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran (Roti-PVDF, Roth, Karlsruhe) erfolgte mittels einer *Semi-Dry-Blot*-Apparatur (Transblot SD, Bio-Rad, München). Zuerst wurde die PVDF-Membran mit Methanol und Transferpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris/HCl pH 8.5; 10 % (v/v) Methanol) äquilibrierte, das SDS-Gel ebenfalls kurz in Transferpuffer gespült und blasenfrei

auf Membran gelegt. Beiderseits wurden je zwei Lagen Whatmanpapier der Stärke 1,5 mm angefügt. Bei einer Spannung von 20V wurde die Proteine für 70 min übertragen, anschließend konnten die transferierten Proteine mit Ponceau S-Lösung (Ponceau S Solution, Sigma Aldrich, Steinheim) auf der PVDF-Membran angefärbt werden. So wurde sowohl der erfolgreiche Proteintransfer als auch eine gleichmäßige Beladung der Spuren kontrolliert. Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese 60 min mit 3 % Magermilchpulver in TBS-T blockiert, um die direkte Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in einem 50 ml-Röhrchen für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Rundumschüttler (Assistent, Sondheim). Die Antikörper wurden in 3 % Magermilchpulver in TBS-T verdünnt. Die Membran wurde danach dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen und für eine Stunde mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper bei RT im 50 ml-Röhrchen auf einem Rundumschüttler inkubiert. Schließlich wurde die Membran erneut dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen. Durch eine Meerrettichperoxidase-katalysierte Chemolumineszenzreaktion (ECLplus- bzw. ECLadvanced Western Blotting Detection Systems, Amersham, Braunschweig; Durchführung nach Angaben des Herstellers) konnten die markierten Proteine über eine Chemolumineszenzkamera (LAS-1000, Fujifilm, Kanagawa, Japan) visualisiert und die Membran fotografiert werden (Expositionszeit zwischen 1 s und 30 min). Neben einer qualitativen Auswertung erfolgte in einigen Fällen eine densitometrische Auswertung der Banden mit der PCBAS (Version 2.09g).

### 3.2.2.4 *Strippen* von Westernblots

Um verschiedene Proteine nacheinander auf der gleichen Membran nachweisen zu können, wurden die gekoppelten Antikörper mittels einem als *Strippen* bezeichneten Verfahren durch thermische Energie, Detergenzien und Reduktionsmitteln entfernt. Die auf die Membran transferierten Proteine bleiben dabei weitgehend gebunden und können. Zur Detektion des nächsten Proteins wurde der Westernblot zweimal 10 min mit TBS-Tween gewaschen, um restliches ECLplus-Reagenz von der Detektion des ersten Proteins zu entfernen. Anschließend wurde die Membran 30 min mit *Stripping* Puffer (62,5 mM Tris/HCl; 2 % SDS; 0,83 %  $\beta$ -Mercaptoethanol in H<sub>2</sub>O) bei 70°C im Wärmeschrank inkubiert, erneut zweimal 10 min mit TBS-T bei RT gewaschen und anschließend erneut mit Antikörpern inkubiert.

### 3.2.2.5 Fas Ligand *in vitro* Spaltungsversuch

Für diesen Versuch wurden folgende rekombinante Proteine verwendet: Die extrazelluläre Domäne (Aminosäurereste 103-281) des humanen FasL, die am N-Terminus über ein 26Aminosäuren langes Linker-Peptid an einen Flag-Tag fusioniert ist (250 ng pro 30 µl Reaktions-Mix) (Alexis Biochemicals, Heidelberg, Germany); humanes, 10x Histidin-Tag-markiertes ADAM10 und ADAM17 (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D) (250 ng/30 µl Reaktions-Mix). Die Inkubation des FasL mit den beiden Proteasen erfolgte für 5 und 14 Stunden bei 37°C. Als Kontrolle für eine mögliche unspezifische Degradation des FasL wurde der FasL auch ohne Protease alleine im ADAM-Reaktionspuffer (25 mM Tris, 0,005% Brij-35; 2,5 µM ZnCl<sub>2</sub>, pH 8,8) über 14 Stunden inkubiert. Vor dem Reaktionsstart wurde ein Aliquot genommen, welches den intakten FasL repräsentiert. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von Laemmli-Puffer gestoppt und die Proben mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Dazu wurden anti-Flag und anti His-Antikörper verwendet.

### 3.2.2.6 Alkalische Phosphatase-Assay

Durch den Alkalische Phosphatase-Assay ist es möglich, *Shedding*-Ereignisse relativ einfach nachzuweisen. Dabei werden Protease-Substrate, deren *Shedding* analysiert werden soll, an der extrazellulären Domäne mit der Alkalischen Phosphatase fusioniert. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase kann durch Umsatz des Substrats p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol nachgewiesen werden. Durch Vergleich der Aktivität im Zellkulturüberstand mit der Aktivität, die mit dem Zellpellet assoziiert ist, kann die *Shedding*-Rate für ein bestimmtes Substrat berechnet werden.

100µl einer Lösung des chromogenen Substrats p-Nitrophenylphosphat wurden mit 100µl passend verdünntem Zellkulturüberstand oder Zellysat versetzt. Die Bildung von p-Nitrophenol wurde über die optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 405nm im ELISA-Lesegerät vermessen.

### **3.2.3 Molekularbiologische Methoden**

Molekularbiologische Methoden wurden, soweit nicht anders angegeben, nach den Standardprotokollen von Sambrook, Fritsch und Maniatis (dritte Ausgabe, 2001) durchgeführt.

#### **3.2.3.1 DNA-Gehaltsbestimmung**

Durch photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm kann die Nukleinsäurekonzentration in einer Lösung photometrisch bestimmt werden (GeneQuant pro, Biochrom, Cambridge, UK). Eine OD von 1,0 bei dieser Wellenlänge entspricht einem Doppelstrang-DNA-Gehalt von 50 µg/ml. Die Reinheit der DNA, bzw. eine Verunreinigung mit Protein, kann durch die Ermittlung des Verhältnis der OD bei 260 nm zu der OD bei 280 nm ermittelt werden. Reine Doppelstrang-DNA weist ein Verhältnis OD260/OD280 von 1,8 auf. Das Verhältnis sollte für ausreichend saubere doppelsträngige DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

#### **3.2.3.2 Agarosegelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit 1-2%igen Agarosegelen in einer horizontalen Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,11 % Essigsäure in H<sub>2</sub>O) als Laufmittel. Die Proben wurden mit Auftragspuffer versetzt (Fermentas, St. Leon-Rot). Ein 1 kb-Molekulargewichtsmarker diente als Standard (Fermentas, St. Leon-Rot), von dem 6 µl aufgetragen wurden. Die Auftrennung wurde für ca. 30 min bei einer konstanten Spannung von 120 V durchgeführt. Sollten die Fragmente nicht weiterverwendet werden, wurde die DNA durch das gebundene Ethidiumbromid bei Beleuchtung mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda=312$  nm sichtbar gemacht. Die beleuchteten Gele wurden mit Hilfe der Geldokumentationsanlage Gel Jet Imager (Intas, Göttingen) fotografiert und die Fotos ausgewertet. Sollte mit der DNA weitergearbeitet werden, wurde das entsprechende Fragment zum Schutz vor UV-induzierten Mutationen aus dem Gel bei sehr schwacher UV-Bestrahlung isoliert (3.2.3.3), bevor das restliche Gel zur Auswertung fotografiert wurde.

### **3.2.3.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Für die Aufreinigung wurde das Gelstück mit der erwünschten DNA-Bande mit Hilfe eines Skalpells auf einem UV-Tisch bei Beleuchtung mit einer Wellenlänge von 366 nm (Reprostar, Camag, Muttenz, Schweiz) aus dem Gel herausgeschnitten. Die Verwendung von UV-Licht geringerer Intensität verminderte das Risiko der Mutationsentstehung. Die in den Gelstücken enthaltene DNA wurde mit dem Qiaquick Gelextraktionskit (Qiagen, Hilden) isoliert.

### **3.2.3.4 Herstellung elektrokompetenter Zellen**

Aus einem bei -80°C gelagerten Aliquot *E. coli* XL1 blue wurde zunächst ein Verdünnungsausstrich auf einer LB-Agarplatte mit 50 µl Tetrazyklin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit einer Einzelkolonie von der Platte eine Vorkultur von 50 ml LB Medium mit 50 µl Tetrazyklin angeimpft und über Nacht angezogen. Aus der Vorkultur wurden dann 20 ml abgenommen und zum Animpfen einer 1 l Kultur LB-Medium (ohne Tetrazyklin) verwendet. Die Bakterienkultur wurde bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 bis 0,6 bei 37°C geschüttelt und anschließend unter Schütteln auf Eis heruntergekühlt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Durch eine Zentrifugation von 15 min bei 5000 rpm und 4°C wurden die Zellen pelletiert. Nun wurde das Pellet zweimal mit 250 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O bidest gewaschen und anschließend in 50 ml eiskalter 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 20 min bei 3200 rpm und 4°C worauf das Zellpellet in 2 ml 10 %iger Glycerinlösung aufgenommen wurde. Schließlich wurde die Bakteriensuspension zu 50 µl Aliquots in auf Trockeneis gekühlte Eppendorfgefäß gegeben und bei -80°C eingefroren.

### **3.2.3.5 Transformation durch Elektroporation**

Vor der Elektroporation wurden die bei -80°C gelagerten *E. coli*-Bakterien des Stammes XL1-Blue auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden mit 1 µl Vektor-DNA versetzt und in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette transformiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 400 Ω und 25 µF im Gene Pulser (BioRad, Hercules, USA). Anschließend wurden die transformierten Bakterien in 1 ml antibiotikafreies LB-Medium überführt und für 30 min bei 37°C im Thermoblock geschüttelt. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension 2 min bei 10000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. 750 µl des Überstandes wurden abgenommen und die pelletierten Bakterien in den restlichen 250 µl LB-Medium

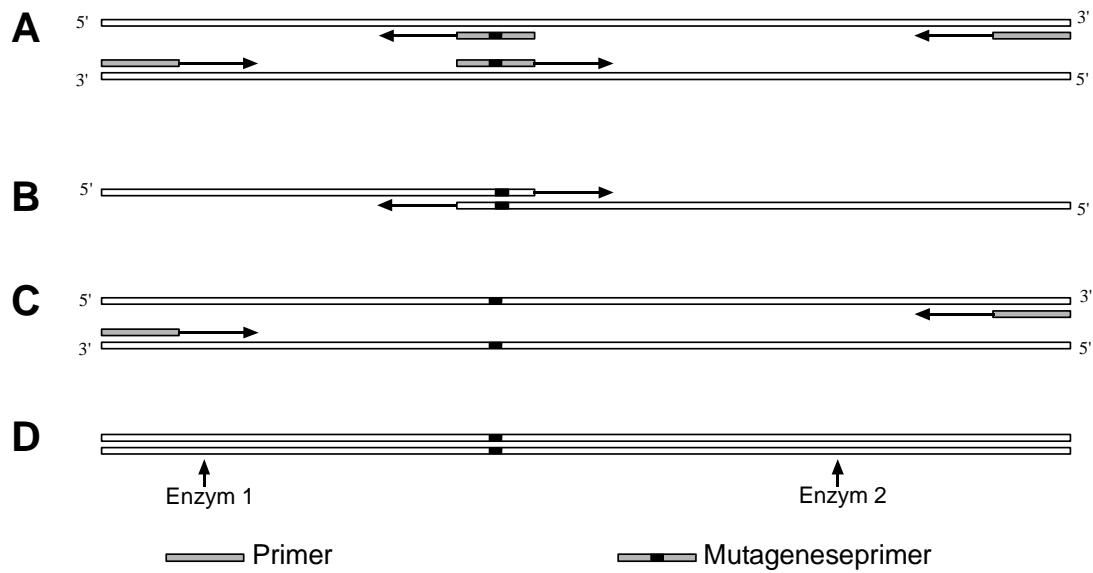
resuspendiert. Schließlich wurde die Bakteriensuspension auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C für 12-16 Stunden bis zur Plasmidamplifikation inkubiert.

### 3.2.3.6 Plasmidamplifikation und –aufreinigung

Die über Nacht gewachsenen Kolonien der transformierten, auf LB-Agarplatten ausgestrichenen Bakterien wurden mit sterilen Zahnstochern gepickt. Je nach Bedarf wurden 3 ml oder 200 ml ampicillinhaltiges LB-Medium (50µg/ml Ampicillin) angeimpft und über Nacht unter Schütteln (etwa 250 Umdrehungen pro Minute) bei 37°C inkubiert. Die Plasmide wurden bei 3 ml Ansätzen mit dem peqGold Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab), bei 200 ml Ansätzen mit dem Pure Yield Plasmid Midiprep Kit (Promega) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### 3.2.3.7 Einführung von Punktmutanten durch zweifach rekombinante PCR

Um einzelne Aminosäuren in Proteinen auszutauschen, wurden auf cDNA-Ebene die entsprechenden Basentriplets mutiert. Dies wurde mittels rekombinanter PCR (Higuchi, 1990) erreicht. Das Prinzip ist in Abb. 6 verdeutlicht: In zwei getrennten Standard-PCR Ansätzen wurden Primer verwendet, die die zu mutierende Basensequenz enthalten. Aufgrund von flankierenden Basen wird eine ausreichende Hybridisierung erreicht, so dass durch PCR-Amplifizierung zwei Fragmente entstehen, die an ihren einem Ende zueinander homologe, bereits mutierte Sequenzen aufweisen. In einem zweiten PCR-Schritt mit diesen aufgereinigten Fragmenten, die sich quasi gegenseitig als Primer benutzen, kann der vollständige, nun mutierte Doppelstrang wieder hergestellt werden. Durch Benutzung von flankierenden Primern, die Schnittstellen für Restriktionsenzyme aufweisen oder gegebene Restriktionsschnittstellen mit einschließen, kann das entstandene mutierte Fragment in einen gewünschten Vektor kloniert werden.



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Herstellung einer Punktmutante durch zweifach rekombinante PCR.**

(A) In zwei separaten Reaktionen werden überlappende Sequenzabschnitte mit jeweils einem genspezifischen und einem Mutageneseprimer amplifiziert. (B,C) In einer dritten PCR Reaktion binden die beiden Fragmente im überlappenden Bereich (B) und werden verlängert. So entstandene, rekombinierte Fragmente werden in derselben Reaktion durch spezifische Primer aus (A) vermehrt (C). (D) Nach der PCR wird das Fragment mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten, um es in ein Plasmid zu legieren.

### 3.2.3.8 Erzeugung von Proteinfusionen und chimären Proteinen durch rekombinante PCR

Das Aneinanderfügen zweier beliebiger cDNA-Sequenzen wurde ebenfalls durch rekombinante PCR erreicht. Analog zu Kabitel 3.2.3.8 wurden in beiden Sequenzen jeweils die Bereiche amplifiziert, die die Fusionsstelle später flankieren sollten. Es wurden an der Fusionstelle über 18-24 Nukleotide überlappende Primer eingesetzt und das Standard PCR-Protokoll gemäß Kapitel 3.2.3.7 verwendet.

### 3.2.4 Immunologische Methoden

#### 3.2.4.1 Durchflusszytometrie

Durch FACS-Analyse (Fluorescence-activated cell sorting) können Größe, Granularität, und Expressionstärke spezifischer Proteine in einer Vielzahl einzelner Zellen charakterisiert werden. Bei der FACS-Messung werden die gefärbten Zellen in einer Einzelzellsuspension an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration wird durch einen Photodetektor registriert. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und –streuung Informationen über die Zellgröße (im „Forward-Scatter“) und die Granularität der Zelle (im „Sideward-Scatter“) gewonnen.

#### 3.2.4.2 Immunfärbung für die Durchflusszytometrie

Bei der FasL-Färbung wurden FasL exprimierende KFL-Zellen in Gegenwart von DMSO oder verschiedenen MP-Inhibitoren für einen Zeitraum von 30-60 Minuten vorbehandelt. Die Färbungen wurden in 96-well Rundbodenplatten durchgeführt. Es wurden zunächst pro, Färbung  $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  Zellen für 5 min. bei 1100 rpm und 4°C zentrifugiert und nachfolgend mit kaltem Waschpuffer gewaschen. Nach der Zugabe des fluoreszenzmarkierten anti FasL- Antikörpers (NOK-1) oder einer geeigneten Isotypkontrolle wurden die Zellen für 15 min unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, mit 1% PFA fixiert, in Röhrchen überführt und bis zur Messung in Dunkelheit auf Eis gehalten.

#### 3.2.4.3 AnnexinV- Färbung

Die Translokation des normalerweise asymmetrisch verteilten Phospholipids Phosphatidylserin auf die Zelloberfläche ist ein früher Marker apoptotischer Zellen (Martin *et al.*, 1995). Das Protein AnnexinV besitzt eine natürliche Affinität für Phosphatidylserin.

Im AnnexinV-Test werden lebende Zellen mit FITC-konjugiertem AnnexinV sowie Propidiumjodid inkubiert. So können sowohl früh-apoptotische (AnnexinV-positiv,

Propidiumjodid-negativ) als auch spät-apoptotische Zellen (AnnexinV-positiv, Propidiumjodid-positiv) von lebenden Zellen unterschieden werden.

Es wurde das „AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit“ der Firma BD Bioscience verwendet. Hierbei wurden durch Zentrifugation pelettierte Zellen in AnnexinV-Puffer resuspendiert und mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid 15 Minuten im Dunkel inkubiert. Nach Auffüllen mit 500 $\mu$ l Annexin-Puffer wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht.

Im Durchflusszytometer (FACSScan, Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) wurden pro Ansatz 10000 lebende Zellen aquiriert. Die Auswertung erfolgte mit der Software CellQuest (BD Bioscience).

### **3.2.4.4 Zellzahlbestimmung**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Um die Zellzahl einer Zellsuspension zu bestimmen, wurden die Zellen zunächst 1:1 mit 0,4%iger Trypanblau-Lösung gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Die durchschnittliche Anzahl von Zellen in einem Großquadrat  $\times 10^4$  entspricht der Zellzahl pro ml. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Er dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Bei der Auszählung wurden nur die lebenden Zellen berücksichtigt, wobei der Anteil an lebenden Zellen in einer intakten Zellkultur größer als 95% sein sollte

### **3.2.4.5 Indirekte Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen**

Die Lokalisation von Proteinen in der Zelle kann mittels der indirekten Immunfluoreszenz erfolgen. Dabei werden gegen das Zielprotein gerichtete, primäre Antikörper verwendet. Diese werden dann mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern detektiert. Dies erlaubt eine höhere Sensitivität als die direkte Immunfluoreszenz, in der fluoreszenzmarkierte primäre Antikörper eingesetzt werden.

Für die Betrachtung aller fluoreszenzgefärbten Zellen wurde ein Axiovert 200M (Carl Zeiss, Jena, D) verwendet, das mit der Axio Vision 4.1 beta Version 08.2003 Software bedient wurde. Die Bilder wurden mit dem Axio Vision Viewer LE Rel. 4.1 und mit der Adobe Photoshop Version 7.0 Software bearbeitet.

Mit Hilfe eines Apotoms, das die Erstellung „optischer Schnitte“ durch Fluoreszenzpräparate erlaubt, konnten Kolokalisierungsstudien durchgeführt werden. Bei dieser Technologie wird das Prinzip der ‚Streifenprojektion‘ umgesetzt, indem eine Gitterstruktur mit definierter

Gitter-streifenbreite mit Hilfe eines Apotomschiebers in die Ebene der Leuchtfeldblende des Auflicht-strahlenganges des Mikroskops eingebracht wird. Die Ebene der Leuchtfeldblende ist konjugiert zu der Fokusebene, so dass bei dem Blick durch die Okulare das Gitter überlagert mit der Probe gesehen werden kann. Über einen *Scanning*-Mechanismus im Apotomschieber wird die Gitterstruktur in der Präparatebene in drei definierten Schritten verschoben, wobei an jeder Gitterposition ein digitales Bild aufgenommen wird. Die drei Rohbilder werden von dem Computer zu einem Ergebnisbild verrechnet. Das berechnete Bild stellt einen optischen Schnitt durch die Probe dar.

Die auf Deckgläschchen ( $\varnothing$  13 mm) kultivierten Zellen wurden einmal kurz mit PBS gewaschen und für 30 min mit 4 % PFA in PBS fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um das Fixativ zu entfernen. Die Zellen konnten nun bis zur Antikörperfärbung bei 4°C in PBS gelagert werden. Für die Immunfärbung wurden die fixierten Zellen 5 min mit 0.1 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert, wonach eine Absättigung der freien Aldehydgruppen für 10 min mit 0.12 % Glycin in PBS erfolgte. Zwischen den Schritten wurde jeweils einmal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern, wurden die Zellen 15 min mit 3 % BSA in PBS blockiert. Zur Bindung des Primärantikörpers wurden 30  $\mu$ l der Antikörperverdünnung in 3 % BSA auf Parafilm pipettiert und die Deckgläschchen, mit der Zellseite zur Lösung gewandt, auf das Parafilm gelegt. Nach einer Inkubationszeit von 1-2 Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde auf die gleiche Weise wie der Primärantikörper für 60 min bei RT inkubiert. Vor der Einbettung der Zellen wurden die Deckgläschchen dreimal mit PBS und einmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen sowie kurz auf Zellstoffpapier abgetupft. Anschließend wurden die Deckgläschchen in einem Gemisch aus Mowiol, DABCO (17 % Mowiol, 33 % Glycerin, 50 mg/ml DABCO) eingebettet. DABCO enthält Antibleichmittel, Stabilisatoren und Signalverstärker. Sollten auch die Zellkerne der Zellen angefärbt werden, wurde dem Mowiol/DABCO-Gemisch noch 1  $\mu$ l einer 1  $\mu$ g/ml DAPI-Lösung in DMSO zugesetzt. Die auf den Objektträgern fixierten Deckgläschchen wurden bei 4°C oder -20°C im Dunkeln gelagert.

### 3.2.4.6 Chrom<sup>51</sup>-Freisetzung-Versuche

In immunologischen Experimenten werden häufig Versuche zur toxischen Wirkung von Zellen auf andere Zellen durchgeführt. In diesem Zusammenhang werden die zytotoxischen Zellen, häufig T-Zellen, als Effektorzellen bezeichnet, die in der Koinkubation Zielzellen

absterben lassen. Hier wurden die zytotoxische Wirkung des FasL untersucht. Jurkat-Zellen wurden für 1 Stunde mit  $100 \mu\text{Ci Na}_2[^{51}\text{Cr}]O_4$  (Amersham-Buchler, Braunschweig, Germany) radiomarkiert und dann dreimal gewaschen.  $1 \times 10^4$  Zellen wurden für jeden Ansatz verwendet und mit einem 15 fachen Überschuss an FasL-exprimierenden KFL-9 Zellen für 20 Stunden koinkubiert. Jede experimentelle Bedingung wurde in Triplikaten angesetzt. Die Freisetzung des Chromium wurde durch Messung im Szintillationszähler ermittelt. Ermittelt. Der Prozentzatz an spezifischer Lyse wurde mittels der Formel  $100 \times (\text{cpm Versuchsansätze} - \text{cpm spontane Freisetzung}) / (\text{cpm maximale Freisetzung} - \text{cpm spontane Freisetzung})$ . (cpm = counts per minute) Die spontane Freisetzung in markierten Zellen ohne Koinkubation war gewöhnlich kleiner als 10% der maximalen Freisetzung, die durch vollständige Lyse der markierten Zellen mit Detergenz ermittelt worden war.

### 3.2.4.7 ELISA

Vor der analytischen, quantitativen FasL Detektion wurde konditioniertes Medium einer Ultrazentrifugation unterworfen ( $100000 \times g$  für 2 Stunden). Zellpellets wurden in Triton - basierendem ADAM10- oder RIPA- Lysispuffer lysiert. Da der Lysispuffer die Antigen-Epitop-Bindung etwas reduzierte (<10%), wurde der FasL-Standard für die Analyse der Zellpellets ebenfalls Tritonpuffer in entsprechendem Anteil zugesetzt, während der FasL-Standard für die Analyse der Überstände in Medium verdünnt wurde. Das FasL ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Eine 96-well Platte (Microlon; Greiner, Frickenhausen, Germany) wurde über Nacht mit  $360 \mu\text{g/ml}$  Maus anti-FasL Antikörper beschichtet. Der in einer ELISA-Platte fixierte sog. „Capturing“-Antikörper, fängt löslichen hFasL aus Zellkultur-Überstand oder Zelllysat heraus, der dann durch einen zweiten, biotinylierten Detektions-Antikörper nachgewiesen werden kann. Der Nachweis erfolgt dabei über die Aktivität einer Streptavidin-gekoppelten Meerrettich-Peroxidase, die an den Detektions-Antikörper bindet.

Am nächsten Tag nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für eine Stunde mit 1% BSA in PBS blockiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS-T wurden die verschiedenen Proben sowie der FasL-Standard zugegeben und die Platte bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Der gebundene FasL wurde detektiert, indem biotinylierter anti-FasL Antikörper ( $9 \mu\text{g/ml}$  in PBS mit 1% BSA) für 1-2 Stunden und nachfolgend nach weiteren Waschschritten  $100 \text{ mU/ml}$  Streptavidin-Peroxidase Konjugat (Roche) in PBS-T mit 1% BSA für 20 min zugegeben wurde. Die chromogene Reaktion wurde durch Mischen mit  $2\text{N H}_2\text{SO}_4$  gestoppt

und die optische Dichte bei 450 nm, korrigiert mit der Absorbtion bei 540 nm, wurde gemessen.

Die Produktion von löslichem FasL in Gegenwart oder Abwesenheit von verschiedenen Inhibitoren wurden die PHA-Blast-Zellen einmal mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit den Inhibitoren in der angegebenen Konzentration inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit 5 µg/ml of ConA restimuliert und die lFasL-Menge, die über zwölf Stunden gebildet wurde, mittels ELISA gemessen.

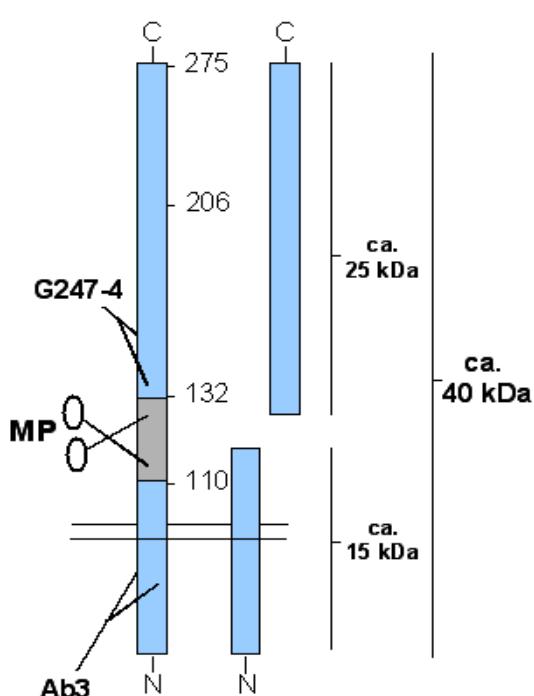
### **3.2.4.8 Messung des Aktivierungs-induzierten Zelltods**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Klon12603, AG Janssen; CAU Kiel) wurden mit Metalloprotease-Inhibitoren oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Nach Vorinkubation von 30 Minuten wurden die Zellen 18 Stunden mit Staphylokokken Enterotoxin A (0,5 ng/ml) oder ohne Zusätze inkubiert. Nachfolgend wurde der Anteil toter Zellen mittels Propidiumjodid-Färbung bestimmt. Zur Korrelation des Aktivierungs-induzierten Zelltods mit der FasL-Oberflächenexpression wurde diese durchflusszytometrisch mit dem Antikörper NOK-1 bestimmt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Analysen zum Fas Ligand-Shedding

Der humane Fas Ligand (hFasL) ist ein Typ II-Transmembranprotein und besteht aus 281 Aminosäureresten. Im Immunoblot nach SDS-Gelelektrophorese ist es bei einer Größe von 40 kDa durch verschiedene Antikörper nachweisbar. Dabei wird häufig eine Doppelbande detektiert, die auf eine differenzierte Glykosylierung zurückzuführen sein könnte (Schneider *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1995). Der Volllängen-Fas Ligand (VL-FasL, VL) wird durch die Aktivität einer Metalloprotease (MP) prozessiert. Dieses *Shedding*-Ereignis resultiert in der Generierung einer etwa 25 kDa großen löslichen Form (lFasL). Die korrespondierenden N-terminalen Spaltfragmente (NTFs), die mit der Membran verbunden bleiben, haben ein Molekulargewicht von etwa 15 kDa.



**Abb. 7: Schematische Darstellung des humanen FasL**

FasL ist ein Typ II Transmembranprotein mit einer Größe von 40 kDa. Durch die Aktivität einer Metalloprotease (MP) im Bereich der Aminosäurereste 111-131 (dargestellt durch den grauen Kasten) wird ein ca. 25 kDa großes lösliches Fragment abgespalten (lFasL). Dieser lFasL kann durch den Antikörper G-247-4 detektiert werden. Der Antikörper Ab3 wurde durch Immunisierung gegen eine Peptidsequenz der intrazellulären hFasL-Domäne generiert und kann daher sowohl das Volllängenprotein (VL) als auch N-terminale Spaltfragmente erkennen. Phenylalanin<sup>275</sup> und Prolin<sup>206</sup> sind kritisch für die Bindung des hFasL

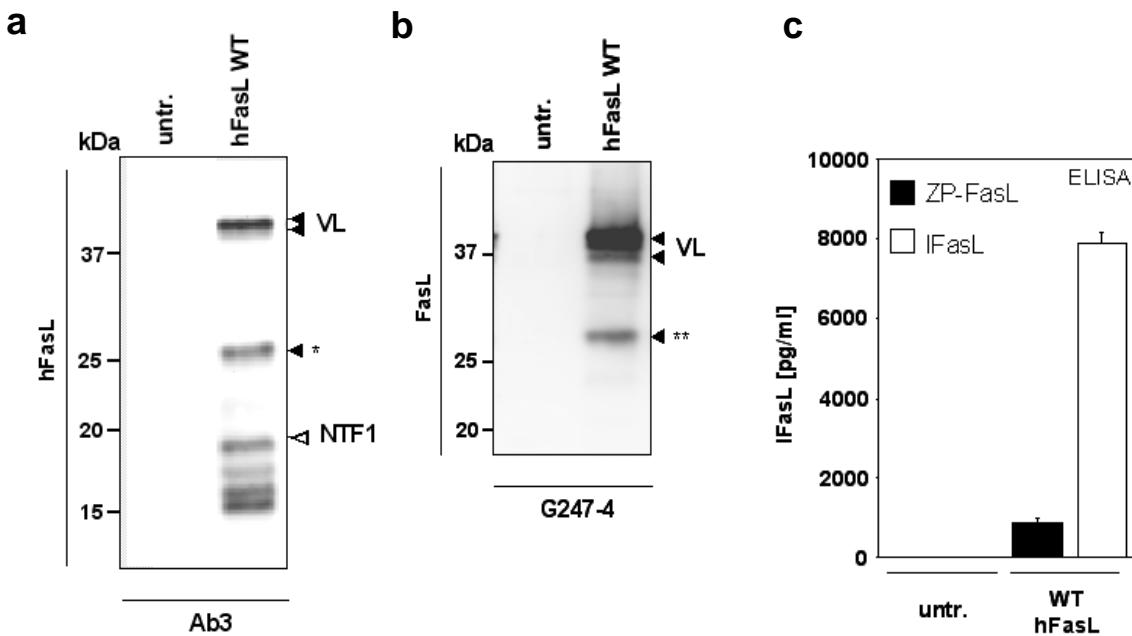
In Abb. 7 sind schematisiert sowohl das *Shedding* des hFasL als auch die Bindungsstellen der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper dargestellt. Des Weiteren sind bedeutende Aminosäurereste gezeigt, die entweder mit der apoptotischen Aktivität oder dem *Shedding* des hFasL im Zusammenhang stehen: Eine Mutation der Aminosäurereste Phenylalanin<sup>275</sup> zu Leucin und Prolin<sup>206</sup> zu Tyrosin führen zu einer starken Verminderung der Fas-Rezeptor-

Bindung (Hahne *et al.*, 1995, Schneider *et al.*, 1997). Auf diese Weise mutierte Moleküle zeigen keine apoptotische Aktivität. Tanaka *et al.* beschrieben 1998 eine humane FasL-Mutante, die eine Deletion der Aminosäurereste 111 bis 131 aufweist. Diese Mutante ist nicht mehr durch Metalloproteasen spaltbar, wie durch fehlende Immunpräzipitation von löslichen hFasL aus dem Überstand von Mauszellen (1A12) gezeigt wurde. Im Verlauf der Arbeit wurden diese und weitere Mutanten generiert und in Bezug auf ihr *Shedding*-Verhalten analysiert.

### 4.1.1 Verifizierung und Testung der verwendeten Antikörper

Der Antikörper Ab3 wurde in weiten Teilen dieser Arbeit verwendet und detektiert membrangebundene Vollängen-FasL (VL) und N-terminale Spaltfragmente (NTFs). Des Weiteren wurde Antikörper G247-4 zur Detektion des extrazellulären löslichen Spaltfragments eingesetzt (lFasL). Mit diesem Antikörper sollte im Verlauf der Arbeit der Vollängen-FasL und der lösliche FasL nachgewiesen werden. Der Antikörper NOK-1 wurde für FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Analysen zur Oberflächenexpression des FasL verwendet und erkennt ebenfalls die Ektodomäne des hFasL. Weiterhin wurde neben den erwähnten Antikörpern ein ELISA-System benutzt (*Enzyme-linked Immunosorbant assay*), das auf der Verwendung eines Antikörperpaars beruht, das gegen die extrazelluläre Domäne des hFasL gerichtet ist. Abb. 8 zeigt die durch die Verwendung der beiden hFasL-spezifischen Antikörper Ab3 und G247-4 im Immunoblot detektierbare Signale. Nach Expression der hFasL cDNA in embryonalen humanen 293T Nierenepithelzellen und anschließender Separierung der hergestellten Zelllysate mittels SDS-Gelelektrophorese ist das Vollängenprotein wie erwartet bei einer Größe von etwa 40-42 kDa im Immunoblot detektierbar. Dabei wird, wie sowohl in Abb. 8a und Abb. 8b erkennbar, die erwartete Doppelbande durch beide Antikörper detektiert. Der Antikörper Ab3 wurde gegen ein Peptid generiert, das dem N-Terminus des hFasL entspricht. Im gezeigten Immunoblot erkennt Ab3 durch die Bindung an den N-Terminus des hFasL 4 N-terminale Spaltfragmente, die bei etwa 15-18 kDa detektierbar sind. Beide Antikörper erkennen darüber hinaus noch eine weitere Bande. Diese tritt bei der Verwendung von Ab3 bei etwa 25 kDa auf, G247-4 detektiert eine zusätzliche Bande bei etwa 28 kDa. Die Identität dieser Banden ist unklar.

Durch die Verwendung eines ELISA-System, das die extrazelluläre Domäne des hFasL erkennen kann, wird sowohl Zellpellet-assoziierter FasL (ZP-FasL) nach Lyse mit 1%igem TritonX-100 Lysepuffer als auch löslicher FasL im konditioniertem Medium detektiert. Dies ist in Abb. 8c zu erkennen. Sowohl im ELISA als auch bei der Verwendung der beiden Antikörper G247-4 und Ab3 ist nur ein sehr geringes Hintergrundsignal gegeben, was die hohe Spezifität der verwendeten Antikörper widerspiegelt.



**Abb. 8: Prozessierung des hFasL in embryonalen humanen Nierenepithelzellen 293T-Zellen)**

Die cDNA des humanen FasL wurde in 293T-Zellen (humanen Zellen des Nierenepithels mit embryonalem Ursprung) transfiziert. 6 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden für weitere 18 Stunden inkubiert. Nach der Ernte wurde das Zelllysat von transfizierten oder untransfizierten Zellen in einer SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgel Gelelektrophorese) mittels eines 15%igen Gels aufgetrennt. Nach Übertrag der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran im Westernblot-Verfahren wurde der hFasL mit spezifischen Antikörpern detektiert. Dazu wurde in (a) der gegen ein N-terminales Epitop gerichtete Antikörper Ab3, in (b) der gegen die extrazelluläre Domäne generierte Antikörper G247-4 verwendet. (c) Die hFasL-Menge der Zelllysate und Überstände transfizierter und untransfizierter Zellen wurde mittels hFasL-spezifischem ELISA bestimmt.

Auffällig ist, dass ein großer Teil der Gesamtmenge des detektierten FasL im konditionierten Medium (KM) zu finden ist. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Immunoblot-Signalen, die durch die Verwendung des Ab3 entstehen: Die mutmaßlichen N-terminalen Spaltfragmente bei 15 bis 18 kDa sind weitaus stärker detektierbar als Vollängen-

hFasL. Dies deutet auf eine sehr effiziente Abspaltung des FasL von der Zelloberfläche in 293T-Zellen hin. Es könnte zusätzlich auch eine relativ lange Halbwertszeit der N-terminalen Fragmente gegeben sein.

#### **4.1.2 Prozessierung des humanen Fas Ligand in humanen und murinen Zellen**

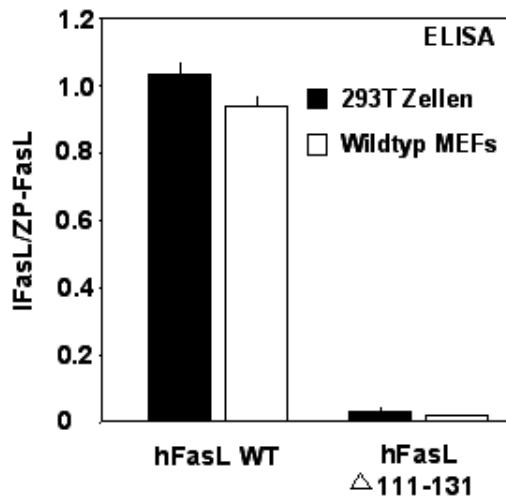
Bisherige Untersuchungen zum FasL-*Shedding* beschreiben eine etwas unterschiedliche Art der Prozessierung des humanen FasL in humanen im Vergleich zu murinen Zellen: Tanaka et al. identifizierten 1998 durch Edmann-Sequenzierung des löslichen hFasL nach Expression in murinen 1A12-Zellen (FasL-Transformanten von WR19L) die Spaltstelle zwischen den Aminosäuren Lysin<sup>129</sup> und Glutamin<sup>130</sup>. Schneider et al. exprimierten 1998 hFasL in humanen 293T- Zellen und fanden durch massenspektrometrische Analyse diese Spaltstelle zwischen Serin<sup>126</sup>-Leucin<sup>127</sup>. Entsprechende Mutanten dieser putativen Spaltstellen führten in diesen Untersuchungen zu einem Verlust der Spaltfähigkeit des FasL. Diese voneinander abweichende Befunde könnten unter anderem auf eine unterschiedliche Identität der jeweiligen Protease hindeuten. Aber auch eine lediglich leicht unterschiedliche Spezifität der jeweiligen Protease gegenüber dem hFasL könnte gegeben sein.

Da in dieser Studie die Prozessierung des hFasL sowohl in humanen als auch murinen Zellen untersucht wurde, sollte zunächst das FasL-*Shedding* in beiden Systemen verglichen werden. Dafür wurde als erstes ein unspaltbares FasL-Protein konstruiert, das eine weitreichende Deletion der Aminosäurereste 111-131 aufweist (Tanaka et al., 1998). Diese Mutante wurde mit dem Wildtypprotein in Bezug auf sein *Shedding*-Muster in Mausfibroblasten und humanen 293T-Nierenepithelzellen mittels ELISA und Immunoblot verglichen.

Diese, wie auch die nachfolgend beschriebenen Mutanten des hFasL, wurde mittels PCR-basierender Mutagenese hergestellt. In dieser Methode werden 2 revers-komplementäre, etwa 40bp lange Primer benutzt, die in etwa ihrer Mitte die entsprechende Mutation aufweisen. Nach zwei PCR-Reaktionen mit entsprechenden Vektor-Primern werden die beiden entstandenen Fragmente in einer weiteren PCR-Reaktion fusioniert. Dabei dienen die Fragmente gleichzeitig als Primer (siehe Material und Methoden).

Die quantitative Analyse der Menge an löslichem FasL, die über einen Zeitraum von 3 Stunden im Verhältnis zu membrangebundenem FasL gebildet wird, ist in Abb.9 dargestellt.

Sowohl in Maus- als auch in humanen Zellen ist durch die Deletion ein *Shedding* nicht mehr möglich.

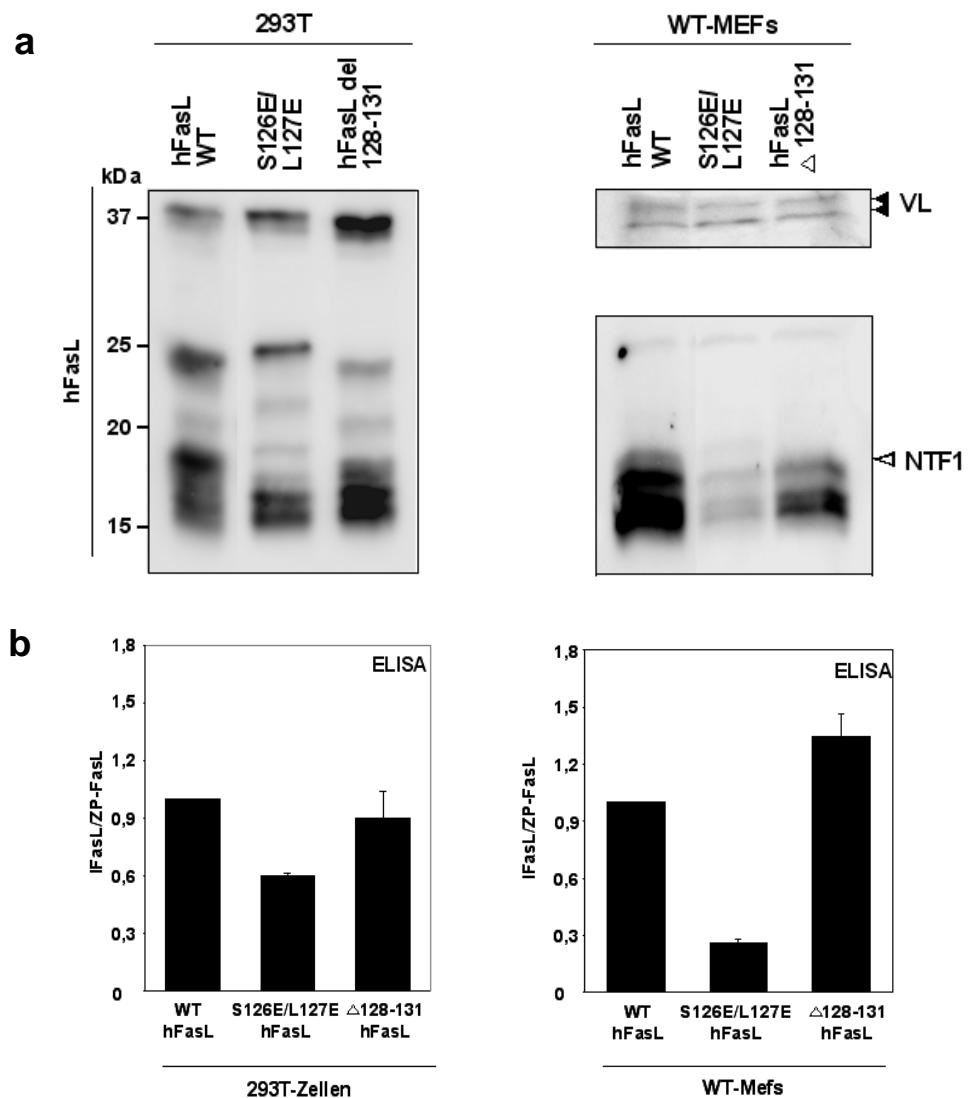


**Abb. 9: hFasL wird in menschlichen und murinen Zellen zwischen den Aminosäuren 110 und 132 geschnitten.**

Die unspaltbare hFasL-Mutante trägt eine Deletion der Aminosäuren 111 bis 131; dieser Bereich umfasst vorher beschriebene Spaltstellen. Diese Mutante sowie Wildtyp-FasL wurden in 293T-Zellen und murinen Fibroblasten transfiziert. Die FasL-Menge im konditionierten Medium (KM) und die Menge an Zell-Pellet assoziiertem FasL im jeweiligen Ansatz wurden mittels ELISA gemessen. Um unterschiedliche Transfektionseffizienzen normalisieren zu

können, wurden jeweils die FasL-Sheddingrate als Verhältnis aus lFasL zu ZP-FasL ausgedrückt. Die Akkumulation an löslichem FasL im KM über einen Zeitraum von 3 Stunden wurde untersucht. In beiden Zelltypen ist die lFasL-Freisetzung im Falle der Mutante deutlich herabgesetzt. Es sind die Durchschnittswerte und Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt.

Nachfolgend wurden die beiden in der Literatur beschriebenen hFasL-Spaltungsmutanten D5 (delta 128-131; Tanaka *et al.*, 1998) bzw. S126E/L127E (Schneider *et al.*, 1998) mittels Fusions-PCR mit entsprechenden Primern hergestellt. Die erhaltenen Konstrukte wurden wiederum in Mausfibroblasten und Nierenepithelzellen exprimiert und Überstände sowie Zelllysate wie oben beschrieben analysiert. Wie in Abb. 10 zu erkennen, hatte die Deletion der Aminosäuren 128-131 weder in murinen noch in humanen Zellen einen signifikanten Einfluß auf die *Shedding*-Rate. Die Mutation von Serin<sup>126</sup> und Leu<sup>127</sup> zu Glutamat-Resten (S126E/L127E) führte hingegen in beiden Zelltypen zu einer Reduktion der lFasL-Menge gegenüber der ZP-FasL-Menge. Dabei fiel allerdings in den murinen Zellen dieser Effekt mit einem Rückgang von 70% stärker aus als in den 293T-Zellen. Hier war lediglich ein Rückgang um etwa 40% zu verzeichnen.



**Abb. 10: Vergleich der Prozessierung von hFasL Spaltungs-Mutanten in humanen und murinen Zellen.**

Die beiden hFasL Mutanten tragen eine Substitution der Aminosäuren Serin<sup>126</sup> und Lysin<sup>127</sup> durch Glycin bzw. eine Deletion der Aminosäuren 128-131. (a) Lysate der transfizierten Zellen wurden mittels Westerblot-Analyse untersucht. Der Nachweis des hFasL erfolgte mit dem Antikörper Ab3, der gegen den N-Terminus des hFasL gerichtet ist. Dadurch wurden sowohl das Volllängenprotein (VL) als auch die N-terminalen Spaltfragmente detektiert. Es zeigte sich, dass beide Spaltungsmutanten ein abgeschwächtes Signal für das N-terminale Spaltfragment 1 (NTF1) geben. (b) Das Verhältnis von löslichem zu Zellpellet-assoziiertem hFasL wurde mittels ELISA-Analyse bestimmt. Beide Mutanten zeigten, in Übereinstimmung mit der Immunoblot-Analyse, eine ähnliche Reduktion der *Shedding*-Rate, wobei diese Beobachtung zumindest qualitativ unabhängig von den untersuchten Zelltypen ist.

Diese Befunde weisen darauf hin, dass die endogene Spaltstelle des FasL, wie von Schneider *et al.* 1998 beschrieben, zwischen den Aminosäure Serin<sup>126</sup> und Leucin<sup>127</sup> liegen könnte.

Insbesondere zeigen diese Analysen, dass kein qualitativer Unterschied in der Art der Prozessierung zwischen den verwendeten humanen und murinen Zellen zu erkennen ist:

Analog zu einer Reduktion des lFasL kann in der S126E/L127E Mutante in beiden Zelltypen auch eine Verminderung des größten N-terminalen Fragments detektiert werden. Aufgrund dieser Korrelation könnte dieses NTF1 dem nach Abspaltung der Ektodomäne in der Membran verbleibenden Spaltfragment entsprechen. Daraus folgt, dass ein abgeschwächtes Signal für das NTF1 mit einer Reduktion von löslichem FasL korreliert.

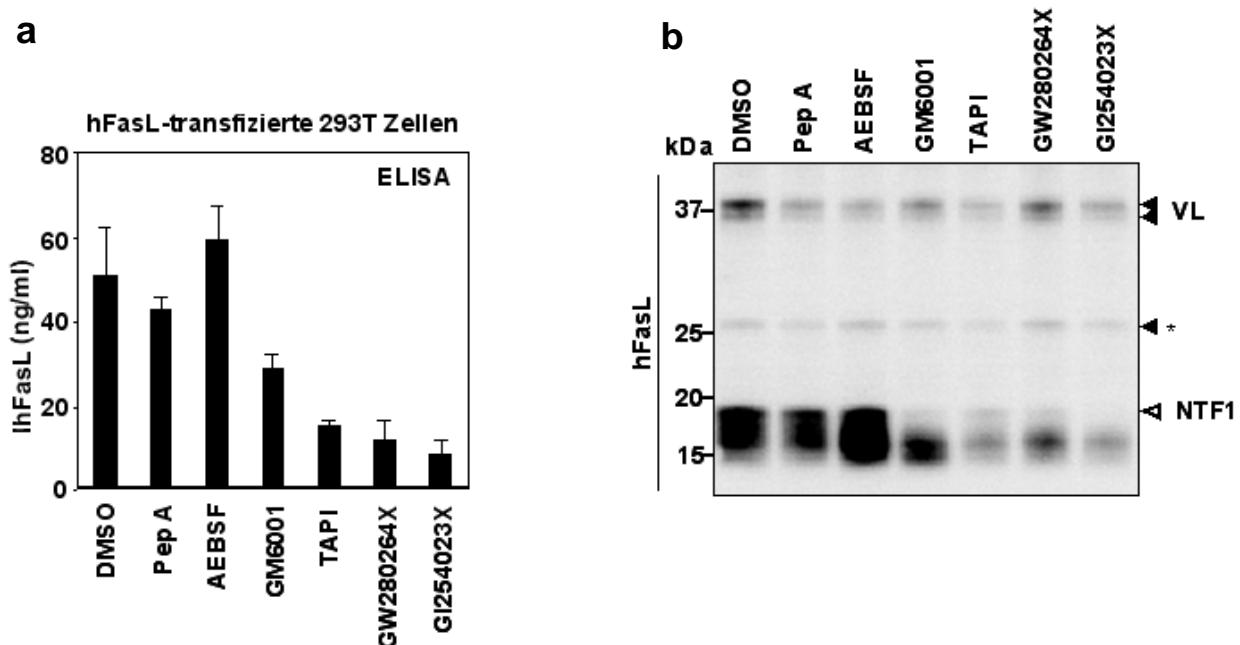
### 4.1.3 Untersuchungen zur Identifizierung der Fas Ligand prozessierenden Protease

Seit 1995 ist bekannt, dass der FasL von der Oberfläche von FasL exprimierenden Zellen abgespalten wird und in löslicher Form auch im menschlichen Serum vorliegt (Tanaka 1995, Tanaka *et al.*, 1996). Obwohl erhöhte Werte von lFasL mit Krankheiten wie Rheumatoider Arthritis, verschiedenen Krebs-Formen und immunologischen Leiden assoziiert sind (Mountz *et al.*, 1996, Suzuki *et al.*, 1998; Jannssen *et al.*, 2003, Ghio *et al.*, 2000), ist die Identität der FasL-*Sheddase* nicht bekannt (Itai, 2001).

#### 4.1.3.1 Pharmakologische und biochemische Hinweise auf eine Rolle von ADAM10 im Fas Ligand-*Shedding*

Um die FasL-prozessierende Protease zu charakterisieren, wurde zunächst die lFasL-Freisetzung aus hFasL-transfizierten 293T-Zellen in Gegenwart von verschiedenen Protease-Inhibitoren analysiert. Dazu wurde die Menge an löslichem FasL im konditioniertem Medium der Zellen mittels ELISA quantifiziert. Um auszuschließen, dass eventuell FasL-enthaltene Exosomen detektiert werden (Taylor *et al.*, 2005; Martinez-Lorenzo *et al.*, 1999), wurde der Überstand zuvor einer Ultrazentrifugation unterworfen. Wie in Abb. 11a zu erkennen ist, haben die Substanzen PepstatinA (Aspartat-Protease-Inhibitor) und AEBSF (Serin-Protease-Inhibitor) keinen signifikanten Einfluß auf die Menge des abgespaltenen FasL. Diese wird dagegen von den Breitband MP-Inhibitoren GM6001 und TAPI deutlich vermindert. Weiterhin wurden die zwei kürzlich beschriebenen spezifischeren, Hydroxamat-basierenden

MP-Inhibitoren GW280264X und GI254023X verwendet (Ludwig *et al.*, 2005). Diese beiden Substanzen unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, die beiden Disintegrin-Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 zu inhibieren: Während GW280264X auf beide Proteasen gleich stark wirkt, inhibiert GI254023X ADAM10 mit einer mehr als 100fach höheren Affinität als ADAM17 und wirkt daher relativ spezifisch auf ADAM10. Beide Inhibitoren verringern das FasL-*Shedding* stark. Durch die deutliche Inhibition des FasL-*Shedding* bei Inkubation mit dem ADAM10-spezifischen Inhibitor GI254023X wurde ein erster Hinweis gewonnen, dass ADAM10 an der Freisetzung von lFasL beteiligt sein könnte.



**Abb. 11: Behandlung von hFasL transfizierten 293T-Zellen mit verschiedenen Protease-Inhibitoren**

293T-Zellen wurden mit hFasL transfiziert. 6 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und DMSO oder verschiedene Protease-Inhibitoren in folgenden Konzentrationen zugesetzt: PepstatinA (1  $\mu$ M), AEBSF (100  $\mu$ M), TAPI (50  $\mu$ M), GM 6001 (10  $\mu$ M), GW280264 (5 $\mu$ M), GI254023 (5 $\mu$ M). Nach weiteren 12h wurden die Prozessierung des hFasL mittels ELISA (a) und Immunoblot (b) analysiert. Überstände wurden vor ELISA-Analyse ultrazentrifugiert.

Zuätzlich wurden die entsprechenden Zellysate mittels Immunoblot analysiert (Abb. 11b). Dabei kann eine ähnliche Transfektionsrate aufgrund eines vergleichbaren Signals für den Volllängen-FasL festgestellt werden, so dass die absoluten FasL-Mengen im Überstand, die durch ELISA-Analyse ermittelt worden waren, untereinander vergleichbar sind.

Im Bereich von etwa 15-18 kDa findet man ein ineinanderlaufen der Signale für die 4NTFs, die in der Abb. 8 deutlich zu erkennen sind. Eine solch unscharfe Auf trennung der vier NTFs wurde im Laufe dieser Arbeit häufig beobachtet. Durch die Verwendung unterschiedlicher Gelsysteme konnte hier keine Verbesserung erzielt werden. Ebenso war eine Behandlung der Zelllysate mit Alkalischer Phosphatase zur Entfernung möglicher Phosphatreste am zytoplasmatischen Teil des hFasL nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

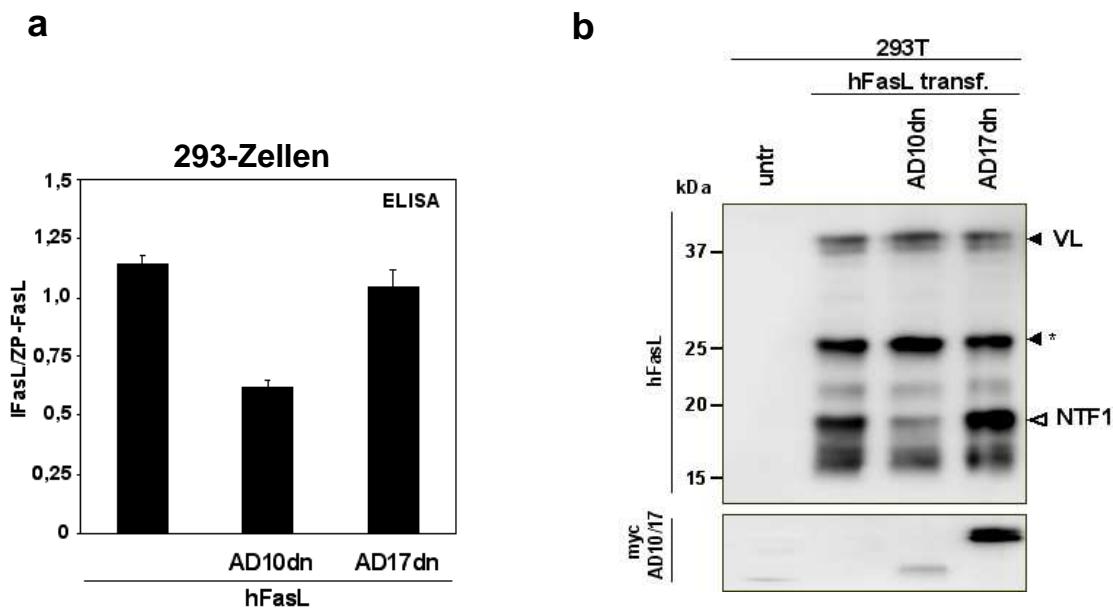
In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der ELISA-Analyse konnte trotz der unscharfen Auf trennung der N-terminalen Spaltfragmente eine deutliche Korrelation zwischen Generierung von lFasL und der Signalstärke der NTFs festgestellt werden. In den Ansätzen mit MP-Inhibitoren fehlen N-terminale Fragmente, die in den DMSO-Kontroll- sowie den PepstatinA und AEBSF Ansätzen deutlich bei der Größe des zu erwartendem Molekulargewichts zu erkennen sind.

Diese Befunde deuten wiederum auf eine Bedeutung von ADAM10 bei der Prozessierung der FasL Ektodomäne hin

Die nähere Betrachtung des Bandenmusters der NTFs zeigt hier ein ineinanderlaufen der Banden. Dennoch wird, besonders in der Spur GM6001, deutlich, dass das größte Spaltfragment bei einer Größe von etwa 18 kDa am ehesten mit einer Reduktion des lFasL im Überstand der Zellen korrelierbar ist. Es wird daher in den folgenden Analysen in erster Linie betrachtet und als NTF1 bezeichnet.

Itai *et al.* beschrieben 2001, dass die Koexpression von hFasL mit einer dominant-negativen ADAM17-Mutante (dnADAM17), deren Metalloprotease-Domäne deletiert worden ist, in 293T-Zellen zu einer verminderten hFasL-Freisetzung führe, obwohl hier für den hFasL, anders als für hTNF- $\alpha$ , keine Interaktion mit ADAM17 nachgewiesen werden konnte.

Zur Überprüfung dieses Befundes sowie weiteren Eingrenzung der FasL-abspaltenden Protease wurde der hFasL zusammen mit den hergestellten, C-terminal mit einem myc-Tag fusionierten dominant-negativen Mutanten von ADAM10 und ADAM17 (ADAM10dn-myc und ADAM17dn-myc) in 293T-Zellen koexprimiert. Die Freisetzungsraten von lFasL wurde mittels ELISA (Abb. 12a), die korrespondierend NTFs im Immunoblot (Abb. 12b) analysiert.



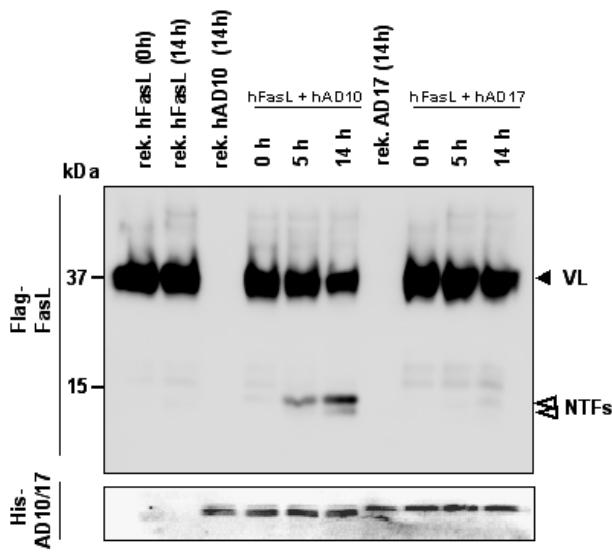
**Abb. 12: Die Kotransfektion von humanem Fas Ligand mit einer dominant-negativen Mutante von ADAM10 reduziert dessen *Shedding*-Rate**

293T-Zellen wurden mit dem hFasL und einer inaktiven Mutante von ADAM10 und ADAM17 transfiziert. Diese Mutanten besitzen eine Deletion der Prodomäne und der katalytischen Domäne. (a) Mittels ELISA-Analyse wurde eine deutliche Reduktion der *Shedding*-Rate des hFasL durch Kotransfektion mit dominant negativem (dn) ADAM10 ermittelt, wohingegen dnADAM17 hier keinen deutlichen Effekt zeigte. (b) Die korrespondierenden Zellysate wurden mittels Immunoblot mit dem Antikörper Ab3 analysiert. Eine Reduktion des NTF1 ist bei Koexpression von hFasL mit dnADAM10 zu beobachten, wohingegen inaktives ADAM17 keine Auswirkung zeigte.

Durch die Koexpression von ADAM10dn-myc konnte sowohl eine Reduktion des NTF1 als auch eine verminderte FasL-Freisetzungsrates erreicht werden. Durch die Koexpression von hFasL mit ADAM17dn-myc hingegen konnte hier keine signifikante Reduktion erreicht werden, obwohl die Expression von ADAM17dn gegenüber ADAM10dn stärker war. Dieser Befund ist als weiterer Hinweis auf die mögliche Rolle von ADAM10 in der FasL-Prozessierung anzusehen.

Die Möglichkeit der FasL-Prozessierung durch ADAM10 wurde des Weiteren in einem zellfreien System analysiert (Abb. 13). Durch einen solchen Versuch kann man vor allem die theoretische Möglichkeit minimieren, dass die pharmakologische Inhibition von ADAM10 oder die Koexpression von ADAM10dn auf indirekte Weise die FasL-Freisetzung verhindert. In dem *in vitro* Spaltungsversuch wurden rekombinantes ADAM10 oder ADAM17 mit rekombinantem humanen FasL für 5 und 14 Stunden koinkubiert. Das rekombinante FasL-Protein umfasst die gesamte Ektodomäne des humanen Fas-Liganden (Aminosäuren 103-281), welche über ein 10 Aminosäuren langes Linker-Peptid an einen Flag-Tag fusioniert

vorliegt. Ebenso umfassen die rekombinanten Proteasen die jeweilige Ektodomäne der maturen Form, fusioniert an einen 10x Histidin-Tag. Sowohl das Volllängenprotein des rekombinanten hFasL als auch Spaltfragmente konnten aufgrund des N-terminalen Flag-Tags nachgewiesen werden. Die beiden Proteasen wurden über die Detektion ihres N-terminalen Histidin-Tags mit anti-Histidin Antikörpern nachgewiesen.



**Abb. 13: Rekombinanter hFasL wird *in vitro* durch rekombinantes hADAM10 gespalten**

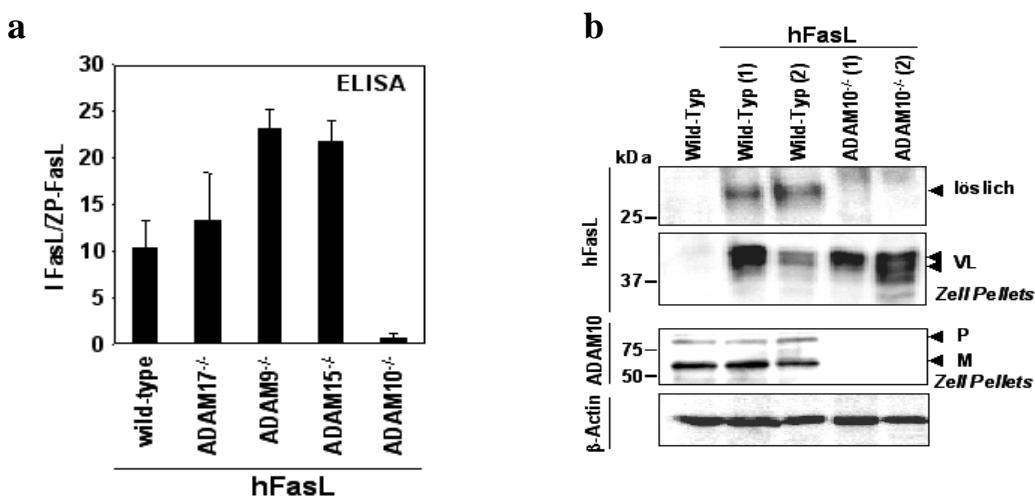
Rekombinanter hFasL wurde mit rekombinantem humanem ADAM10 (rek. hAD10) oder ADAM17 (rek hAD17) in Reaktionspuffer inkubiert. Vor dem Reaktionsstart wurde eine Kontrollprobe mit intaktem hFasL genommen. Nach 5 und 14 Stunden wurden weitere Aliquots genommen, ebenso mit Laemmlipuffer versetzt und alle Proben einer SDS-PAGE (15%) unterzogen. Im Immunoblot wurden rekombinantes ADAM10 und rekombinantes ADAM17 mit einem anti His-Antikörper und Flag-markierter rekombinanter hFasL mit einem anti Flag-Antikörper detektiert. Man erkennt, dass rek. ADAM10, nicht aber rek. ADAM17 unter den gegebenen Pufferbedingungen den rek. FasL prozessieren kann.

NTFs = N-terminale Spaltfragmente von hFasL; VL = Volllängen-FasL; rek. = rekombinant

Die Inkubation von rekombinantem hFasL mit ADAM17 führte zu keiner signifikanten Prozessierung. Dagegen konnten nach Koinkubation mit ADAM10 nach 5 Stunden ein, und nach insgesamt 17 Stunden zwei Spaltfragmente detektiert werden. Diese Beobachtung legt nahe, daß der FasL spezifisch mit ADAM10 interagieren kann, und dass eine daraus resultierende Prozessierung an mindestens zwei unterschiedlichen Spaltstellen stattfinden könnte. Dies ist in klarer Übereinstimmung mit den bisherigen Zellkultur-basierten Ergebnissen zu sehen.

#### 4.1.3.2 Genetische Identifizierung von ADAM10 als prinzipielle FasL-Sheddase

Um die Rolle der ADAMs im MP-vermittelten FasL-Shedding genauer analysieren zu können, wurden verschiedene Zelllinien embryonaler Mausfibroblasten (MEFs) verwendet, die für eine definierte ADAM-Protease defizient sind (Maretzky *et al.*, 2005). Diese Analyse ist besonders in Anbetracht der hohen Redundanz innerhalb des ADAM-Systems von Bedeutung, aufgrund der eine Reihe von ADAM-Substraten durch mehrere ADAMs geschnitten werden können. Hier sollte so untersucht werden, ob der hFasL eventuell auch in geringerem Ausmaß von einer anderen Protease prozessiert werden könnte.



**Abb. 14: Reduktion von löslichem FasL im konditionierten Medium von ADAM10<sup>-/-</sup> Maus-Fibroblasten**

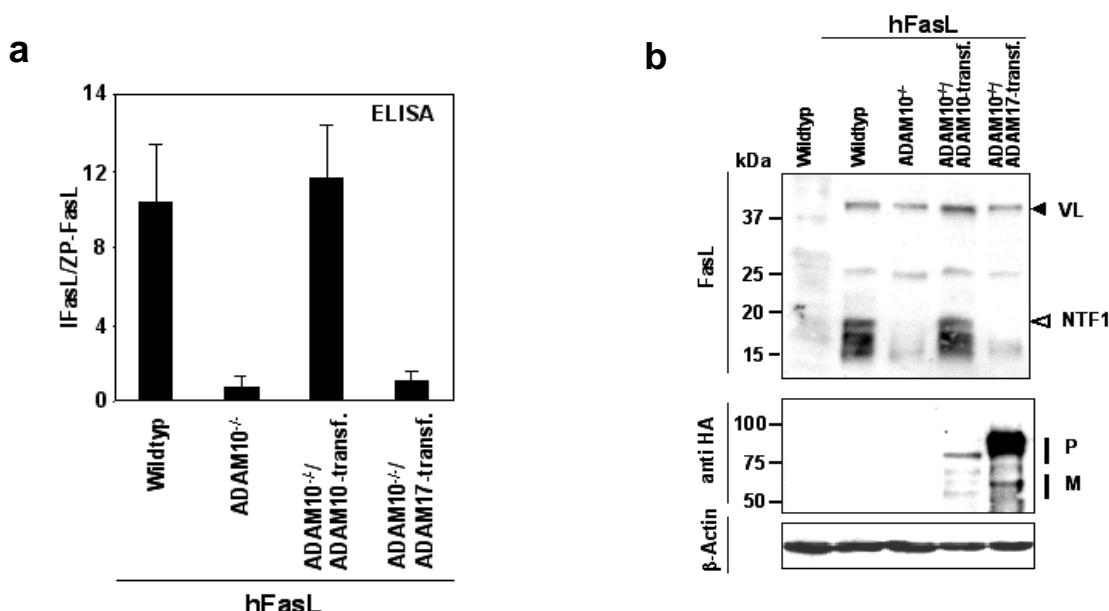
hFasL wurde in verschiedene Maus-Fibroblasten Zelllinien transfiziert, die für jeweils eine distinkte ADAM-Metalloprotease defizient sind. Nach 6 Stunden wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 12 Stunden das konditionierte Medium sowie die Zell-Pellets analysiert. Für die ELISA-Messung wurde die IFasL-Bildung über 12 Stunden gemessen

(a) Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten wurden zur Berechnung der Standardabweichungen herangezogen. (b) Die Bildung von IFasL im KM untransfizierter MEFs sowie transfizierter Wildtyp- und ADAM10-defizienter Mausfibroblasten wurde mittels Immunoblot analysiert. Trotz vergleichbarer FasL-Expression, erkennbar am Signal für Volllängen-FasL (VL), konnte IFasL nur im KM von FasL-transfizierten Wildtyp-Zellen mittels des Antikörpers G-247-4, der gegen ein extrazelluläres Epitop gerichtet ist, nachgewiesen werden (oberes Panel). Die Expression von ADAM10 und Lade-Kontrolle sind in den unteren beiden Panels gezeigt.

Die ADAM-defizienten Zellen wurden mit hFasL transfiziert und die Menge an löslichem FasL im Verhältnis zu ZP-FasL nach 12 Stunden bestimmt. Während, wie in Abb. 14a ersichtlich, in den ADAM17-, ADAM9-, und ADAM15-defizienten Zellen die Freisetzung

von löslichem FasL nicht beeinträchtigt, sondern eventuell sogar heraufreguliert war, konnte im Überstand von ADAM10-defizienten Zellen so gut wie kein löslicher FasL detektiert werden. Die reduzierte *Shedding*-Fähigkeit dieser Zellen von hFasL wurde mittels Immunoblot-Analyse für zwei unterschiedliche Zelllinien mit deletiertem ADAM10 bestätigt. Nur im konditionierten Medium der Wildtypzellen ist der lösliche lFasL detektierbar, nicht aber im Überstand der ADAM10- defizienten Zellen (Abb. 14b).

Um zu untersuchen, ob eine Retransfektion von ADAM10-cDNA in die ADAM10-defizienten Zellen zur Wiedererlangung der Fähigkeit zur FasL-Spaltung führt, wurden diese Zellen mit einem ADAM10- und zur Kontrolle mit einem ADAM17-cDNA-Konstrukt transfiziert. Dies führte für ADAM10 zu einer Wiederherstellung des FasL-*Shedding*, was durch ELISA- (Abb. 15a) und Immunoblot-Analyse (Abb. 15b) festgestellt wurde: Sowohl die Menge an löslichem FasL als auch die Generierung von NTFs konnte wieder auf ein mit Wildtypzellen vergleichbares Niveau gebracht werden. In den Versuchsanträgen mit ADAM17-transfizierten Zellen konnten keine solchen Effekte erkannt werden, was die wichtige Rolle von ADAM10 in diesem Zusammenhang verdeutlicht.



**Abb. 15: Retransfektion von ADAM10 in ADAM10-defiziente MEFs stellt das FasL-*Shedding* wieder her.**

(a) hFasL-transfizierte ADAM10-defiziente MEFs wurden mit ADAM10 oder ADAM17 retransfiziert und mit Wildtyp- oder ADAM10<sup>-/-</sup> MEFs in Bezug auf die lFasL-Freisetzung mittels ELISA verglichen. Daten dreier voneinander unabhängiger Experimente sind dargestellt. (b) Entsprechend wurden hFasL transfizierte ADAM10<sup>-/-</sup> MEFs mit ADAM10 oder ADAM17 retransfiziert und die FasL-Freisetzung mit Wildtyp- sowie ADAM10<sup>-/-</sup> MEFs verglichen. Die Immunoblots zeigen hFasL, HA-markiertes ADAM10 und ADAM17 und β-Aktin. Lediglich durch die Retransfektion mit ADAM10 konnte das *Shedding* von hFasL wieder hergestellt werden.

#### **4.1.3.3 Fas Ligand wird auch in endogen FasL-exprimierenden Zellen durch ADAM10 proteolytisch prozessiert**

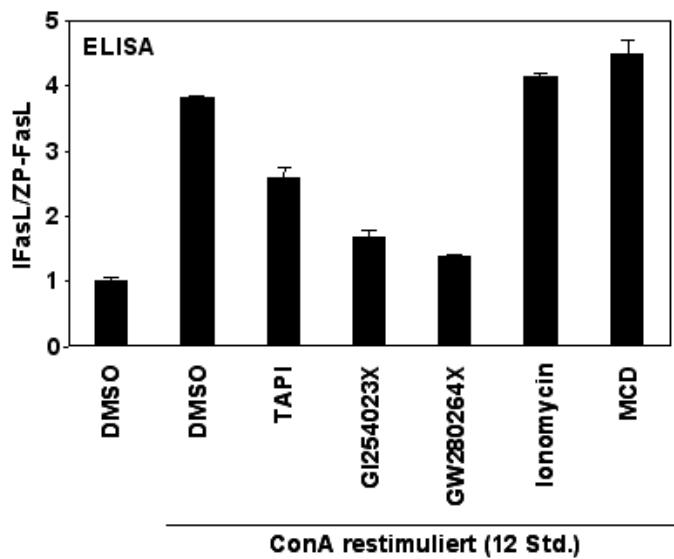
Die Prozessierung des hFasL durch ADAM10 wurde bisher durch Experimente gezeigt, in denen der hFasL durch Transfektion der entsprechenden cDNA überexprimiert wurde. Da solche Versuche prinzipiell, u.a. aufgrund der unnatürlich starken Expression des jeweiligen Proteins, anfällig für eine Bildung von Artefakten sein können, wurden nun Zellen verwendet, die eine endogene Expression des hFasL zeigen. Es sollte so untersucht werden, ob ADAM10 auch in diesen Zellen essentiell an der FasL-Prozessierung beteiligt ist.

Der FasL ist ein wichtiges Effektorprotein von T-Zellen und wird von diesen nach ihrer Aktivierung stark exprimiert (Suda *et al.*, 1995). Zusätzlich ist der Phänotyp von FasL-defizienten Mäusen durch eine Hyperproliferation von T-Zellen charakterisiert, da es aufgrund eines Defektes im Fas/FasL vermittelten Aktivierungs-induzierten Zelltod (*Activation Induced Cell Death*, AICD) zu einer Anhäufung von autoimmun reagierenden T-Zellen kommt.

Auf Grund der besonderen Bedeutung der FasL-vermittelten Funktion bei der Homöostase von zytotoxischen T-Zellen wurde in dieser Arbeit eine Beteiligung von ADAM10 im FasL-*Shedding* zunächst in diesem Zelltyp überprüft.

Hierfür wurden T-Zellen aus Eigenblut mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und durch Phytohämagglutinin- (PHA-) induzierte Proliferation PHA-Blasten hergestellt. Nach Kultivierung in Gegenwart von Interleukin-2 für 14 Tage wurden die Zellen mit ConcanavalinA, einem Lektin aus der Jackbohne, restimuliert. Die Metalloprotease-vermittelte Generierung von löslichem FasL über 12 Stunden wurde in Gegenwart verschiedener Substanzen mit bekannter inhibitorischer Wirkung auf verschiedene Proteasen mittels hFasL-spezifischem ELISA analysiert. Um Unterschiede in der FasL-Expressionsrate zu kompensieren, wurde auch hier die Menge an gebildetem löslichen FasL in Bezug zur Zellpellet assoziierten FasL-Menge gesetzt.

Während Ionomycin und Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (MCD) nur leicht die *Shedding*-Rate heraufsetzten, führte die Anwendung von Metalloprotease-Inhibitoren zu einer starken Reduktion der lFasL-Bildung. Dieser Effekt war auch und sogar besonders deutlich für den präferentiellen ADAM10-Inhibitor GI254023 und den ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW280264 erkennbar (Abb. 16). Dies deutet darauf hin, daß ein Großteil des FasL-*Sheddings* in diesen Zellen ADAM10 vermittelt sein könnte.



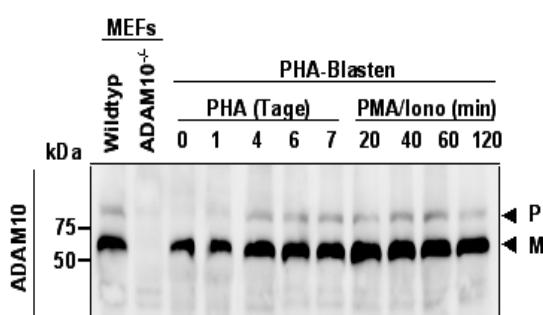
**Abb. 16: ADAM10-Inhibierung führt zu reduzierter Freisetzung von löslichem FasL in endogen FasL exprimierenden T-Zellen**

PHA aktivierte periphere mononukleäre Blutzellen (PBMNZ) wurden für eine Stunde in Medium mit DMSO, TAPI (50  $\mu$ M), GI254023 (5  $\mu$ M), GW280264 (5  $\mu$ M), Ionomycin (20 ng/ml) und MCD (10 mM) vorinkubiert. Die Zellen wurden mit ConcanavalinA (5 $\mu$ g/ml) restimuliert und die lFasL-Produktion über einen Zeitraum von 12 Stunden mittels ELISA gemessen. Um Unterschiede in der FasL Expression normalisieren zu können, wurde die Rate der FasL-Spaltung als Quotient aus löslichem FasL zu Zellpellet-assoziiertem FasL dargestellt. Durch die Zugabe von Metalloprotease-Inhibitoren kann eine Verminderung der *Shedding*-Rate erreicht werden. Der vornehmlich auf die ADAM10-Aktivität wirkende Inhibitor GI254023 zeigt dabei einen deutlichen Effekt. Standardabweichungen wurden aus Dreifachwerten errechnet.

Der Fas Ligand wird von aktivierten T-Zellen in sogenannten sekretorischen Lysosomen gespeichert. Diese enthalten neben FasL auch die zytotoxischen Effektormoleküle Perforin und GranzymB. Der Inhalt dieser Organellen wird nach Restimulation durch Fusion der Lysosomen mit der Plasmamembran auf die Zelloberfläche gebracht (Bossi und Griffith, 1999; Blott *et al.*, 2001). Die Restimulation kann *in vitro* mittels verschiedener Agenzien erfolgen. Neben verschiedenen Lektinen können T-Zellen auch durch Endotoxine, spezifisch mit Anti CD3 Antikörpern über den T-Zell-Rezeptor oder unter Umgehung des T-Zell-Rezeptors mittels PMA und Ionomycin stimuliert werden. In den nachfolgenden Experimenten zum FasL-*Shedding* in T-Zellen sollte die Restimulation mit PMA und Ionomycin erfolgen. Da dieser Stimulationsweg auch Auswirkungen auf die Prozessierung von ADAM10 und/oder dessen Expression haben könnte, wurde zunächst eine Expressionskinetik von ADAM10 in T-Zellen unter Stimulation mit PHA und Restimulation

mit PMA und Ionomycin aufgenommen. Dabei wurden sowohl das Expressionslevel als auch die Maturierung von ADAM10 mittels Immunoblot analysiert.

Es konnten, wie in Abb. 17 zu erkennen ist, keine signifikanten Unterschiede in der ADAM10-Expression durch die beschriebene Behandlung der Zellen festgestellt werden. Allenfalls ist möglicherweise eine Hochregulation von ADAM10 4 bis 7 Tage nach der Aktivierung gegeben. Dabei muss allerdings bedacht werden, dass sich während dieser Zeit die Zusammensetzung der Zellkultur ändert und der Anteil an T-Zellen durch die PHA-induzierte Proliferation zunimmt. Bedeutsamer ist, dass die ADAM10 Menge sowie das Verhältnis von Proform zu maturer Form nicht durch die PMA/IO-Behandlung beeinflusst werden, was direkte Auswirkungen auf das FasL-Shedding nach Restimulation mit diesen Substanzen haben könnte.



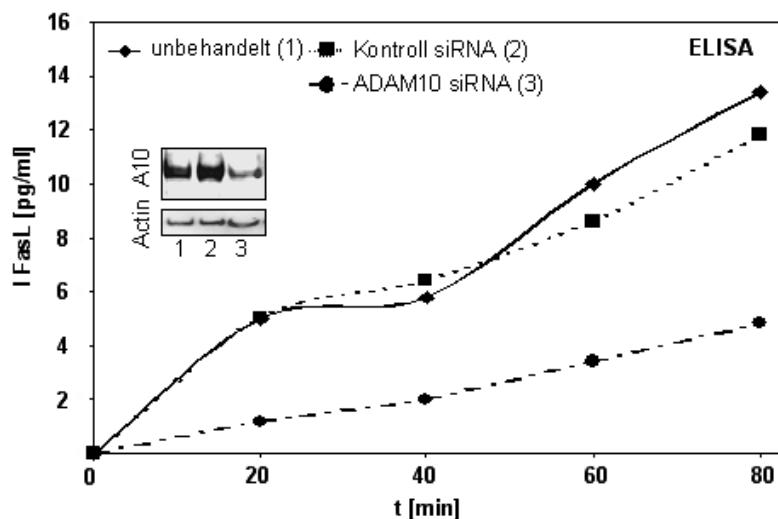
**Abb. 17: ADAM10-Expression in aktivierten und restimulierten T-Zellen**

Lysate von unstimulierten, PHA-aktivierten (5 ng/ml) sowie mit PMA (10 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) restimulierten T-Lymphozyten wurden mittels 10%iger SDS-PAGE aufgetrennt und die ADAM10-Expression mit dem ADAM10-spezifischen Antikörpern 42.2 im Immunoblot nachgewiesen. Durch die Aktivierung und Restimulation wurde die ADAM10-Expression nicht in signifikanter Weise beeinflusst.

P = Proform, M = mature Form

Eine spezifischere Eingrenzung von ADAM10 als die entscheidende Protease, welche in T-Zellen endogen exprimierten FasL prozessiert, sollte nun mittels ADAM10 spezifischer siRNA erfolgen. Hierzu wurde das stealth RNAi System der Firma Invitrogen verwendet. In diesem System werden kurze Oligonukleotide in die Zellen gebracht, wo sie unter Ausnutzung der Aktivität des Proteinkomplexes RISK (*RNA-induced silencing complex*) zur Degradation der entsprechenden mRNA führen (Elbashir *et al.*, 2001). Im Falle von T-Zellen erfolgte die Transfektion der Oligonukleotide mittels Elektroporation unter Verwendung von Transfektionsreagenz der Firma AMAXA. Nicht gezeigt ist die vorausgegangene Austestung der verwendeten drei unterschiedlichen Oligonukleotiden HSS100165, HSS100166 und HSS100167 (Invitrogen). In diesen Vorversuchen stellte sich heraus, dass eine äquimolare Mixtur aus drei unterschiedlichen Oligos die ADAM10-Expression noch weiter verringern

kann als die isolierte Verwendung der einzelnen Oligos. So konnte eine signifikante Herunterregulation der ADAM-Expression auf Proteinebene erreicht werden (Abb. 18, Inlet). Unter Umgehung des T-Zell-Rezeptors wurden die Zellen mit PMA/IO restimuliert. Die so ausgelöste Freisetzung des Fas-Liganden durch mit RNAi behandelten Zellen wurde mittels ELISA bestimmt. Während nicht-transfizierte Zellen sowie mit einem Kontroll Oligonukleotid transfizierte Zellen einen vergleichbaren Anstieg in der lFasL Konzentration im konditionierten Medium zeigten, stieg die lFasL-Konzentration im Überstand der mit RNAi gegen ADAM10 behandelten Zellen deutlich langsamer. Die Korrelation der verminderten FasL-Freisetzung mit der spezifisch herunterregulierten ADAM10-Expression spricht sehr stark für die essentielle Rolle von ADAM10 in der FasL-Prozessierung in T-Zellen.

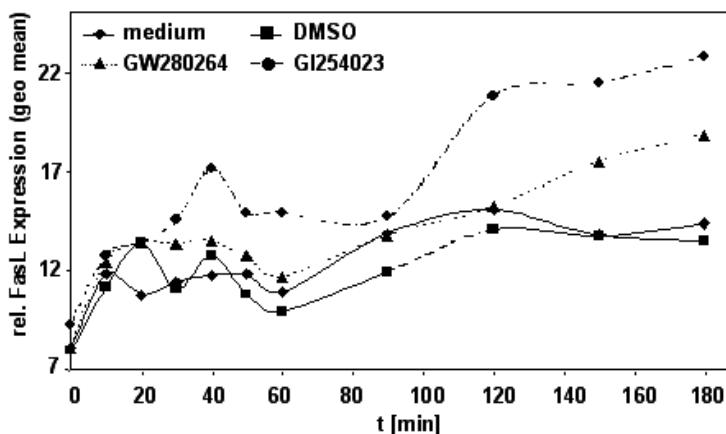


**Abb. 18: ADAM10 siRNA- Behandlung reduziert die Freisetzung von löslichem FasL in primären T-Zellen**

Das Medium von untransfizierten, mock- transfizierten oder ADAM10 siRNA transfizierten primären T-Zellen wurde 72 Stunden nach der Transfektion gewechselt. Die Zellen wurden dann mit Ionomycin (500ng/ml) und PMA (10ng/ml) stimuliert, die Überstände nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet und der lFasL-Gehalt im ELISA analysiert. Die ADAM10-Expression wurde mittels Immunoblot analysiert (Inlet). Die erfolgreiche Herunterregulation der ADAM10-Expression resultierte in einer verminderten Sekretion von löslichem FasL in den Zellkultur-Überstand.

Die Oberflächenexpression des FasL nach PMA/Ionomycin vermittelte Restimulation aktiver T-Zellen folgt einem biphasischen Muster (Lettau *et al.*, 2004): Ein erstes Maximum wird durch Degranulation (d.h. Verschmelzung der granulären Vesikel mit der Plasmamembran) erreicht, ein zweites Maximum ist dann aufgrund der FasL- Neusynthese zu beobachten. Um den Einfluß einer spezifischen Metalloprotease-Inhibition auf die

biphasische FasL-Oberflächenexpression in der klonalen CD4<sup>+</sup>-Zelllinie (Klon 12603, AG Jannssen, Immunologie CAU Kiel) zu untersuchen, wurden die Zellen mit den Inhibitoren GI254023 und GW280264 vorbehandelt und die FasL Oberflächenexpression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach PMA/IO Restimulation mittels FACS-Analyse bestimmt (Abb. 19). Hierbei war zu erkennen, dass eine GI254023-vermittelte spezifische ADAM10-Inhibition über den gesamten Untersuchungszeitraum die FasL-Oberflächenexpression stabilisieren konnte. Die bei den Kontrollansätzen beobachteten beiden Expressionsmaxima nach etwa 30 und 120 Minuten wurden aufgrund der inhibierten *Shedding*-Aktivität annähernd ausgeglichen. Es erfolgte hier zu keinem Zeitpunkt eine Abnahme der FasL Menge auf der Zelloberfläche. Allenfalls war eine Stagnation zwischen ca. 50 und 90 Minuten zu erkennen, denn hier erfolgte eine Herunterregulation der FasL Oberflächenexpression in den Kontrollansätzen. Über diesen Zeitraum vermochte es der Inhibitor GW280264 nicht, die Metalloprotease-vermittelte FasL Freisetzung zu inhibieren, ein Effekt dieses Inhibitors wurde erst durch die Stabilisation des zweiten Maximums der FasL Oberflächenexpression nach etwa 120 Minuten erkennbar. Diese Befunde deuten klar darauf hin, dass ADAM10 die FasL-Oberflächenexpression auch in diesem Zelltyp kontrolliert.



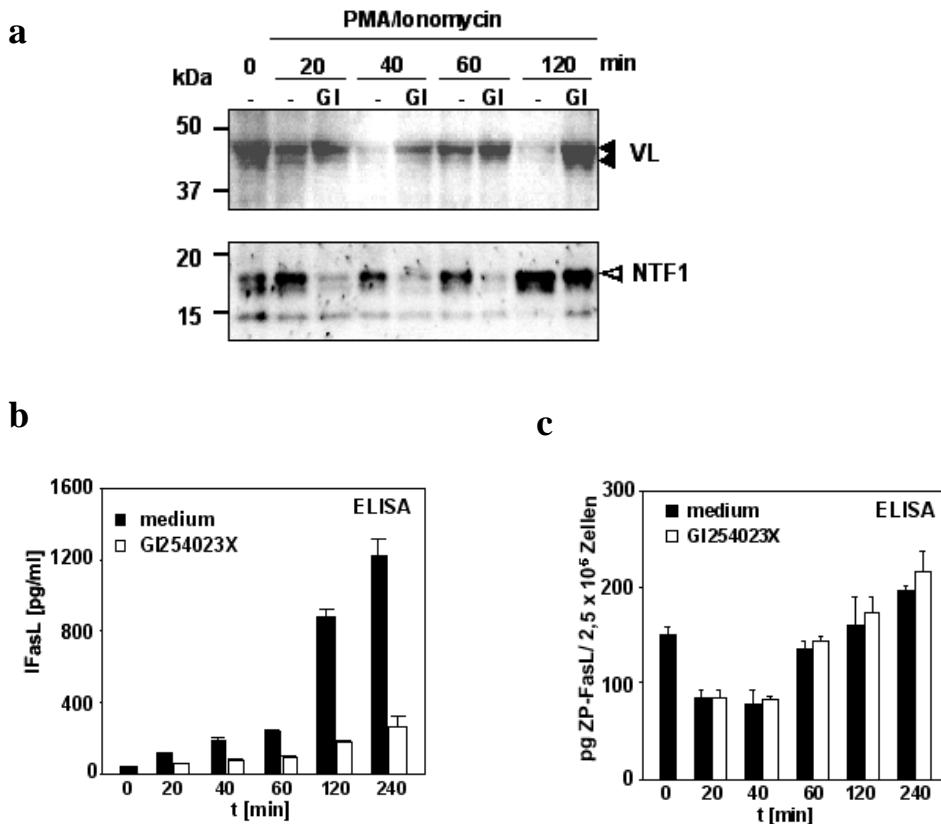
**Abb. 19: Biphasische FasL Oberflächenexpression in klonalen T-Zellen ist ADAM10 abhängig**

Stimulierte klonale T-Zellen (Klon12603) wurden für 30 min. mit den Inhibitoren für ADAM10 (GI254023) und ADAM10/17 (GW280264) vorinkubiert. Die FasL-Oberflächenexpression wurde dann durch Behandlung mit PMA (10 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) induziert und mittels FACS-Analyse mit unbehandelten Zellen über einen Zeitraum von 180 min verglichen. Die Detektion des auf der Oberfläche der Zellen exprimierte FasL erfolgte mittels Nok-1 Antikörper, der ein extrazelluläres Epitop des hFasL erkennt.

Die FasL-Prozessierung nach PMA/IO-Restimulation wurde in Gegenwart des ADAM10-Inhibitors GI254023 oder dem Lösungsmittel DMSO auch mittels Immunoblot untersucht (Abb 20a). Das Vollängenprotein wurde mit dem Antikörper G247-4 detektiert, die NTFs mit dem Antikörper Ab3. Durch Restimulation der FasL-exprimierenden Zellen mit PMA und Ionomycin fusionieren die sekretorischen Lysosomen mit der Plasmamembran, und der FasL wird auf der Zelloberfläche exprimiert, von wo er abgespalten werden kann. Dementsprechend kann für die Kontrollansätze, denen kein Metalloprotease-Inhibitor zugesetzt wurde, nach 20 Minuten eine Verstärkung von Signalen für 2 N-terminale Spaltfragmente gezeigt werden. Nach 40 Minuten besaßen diese Zellen keinen detektierbaren Vollängen-FasL mehr. Aufgrund der gleichzeitigen Induktion der FasL-Neusynthese war hier nach 60 Minuten wieder Vollängen-FasL nachweisbar, doch auch dieser wurde durch *Shedding* wieder abgebaut, wie aufgrund der Verstärkung der NTF-Signale nach 120 Minuten erkennbar ist. Dieser Abbau konnte durch den ADAM10-Inhibitor GI254023 nahezu vollständig inhibiert werden. Erst nach 120 Minuten traten in den so behandelten Zellen NTFs auf, und die Menge des Vollängen-FasL nahm in Gegenwart von GI254023 über den gesamten Beobachtungszeitraum zu.

Die Überstände der in Abb. 20a untersuchten Zellen wurden mittels ELISA auf ihren lFasL Gehalt hin untersucht. Auch hierbei zeigt sich die starke Inhibierung des FasL-*Shedding* durch GI254023 (Abb. 20b). Zusätzlich wurden auch die FasL-Mengen der Zelllysate mittels ELISA gemessen. Hierbei wurde interessanterweise deutlich, dass die Menge an Zellpellet-assoziiertem-FasL in den Ansätzen mit GI254023 nicht in dem Maße zunimmt, in dem die Generierung von lFasL durch Zugabe von GI254023 abnimmt. Lediglich eine schwache Zunahme des zellassoziiertem hFasL gegenüber nicht mit Metalloprotease-Inhibitor behandelten Ansätzen ist hier messbar.

Insgesamt liefern diese Experimente deutliche Hinweise, dass hauptsächlich ADAM10 für die Freisetzung des lFasL im endogen FasL- exprimierenden System verantwortlich ist.



**Abb. 20: FasL-Shedding in klonalen T-Zellen ist ADAM10-abhängig**

(a) Aktivierte klonale T-Zellen (Klon 12603) wurden mit PMA und Ionomycin restimuliert und das FasL-Shedding durch GI254023-behandelte Zellen mit unbehandelten Zellen (DMSO) verglichen. Das FasL-Shedding wurde über einen Zeitraum von 120 min zu 4 verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Zur Detektion der N-terminalen Fragmente des FasL wurde der Antikörper Ab3 verwendet, das Vollängenprotein wurde mit G247-4 nachgewiesen. (b) ELISA-Analyse der entsprechenden Überstände zu den im Immunoblot analysierten Zellen zeigte eine deutliche Reduktion der Menge an löslichem FasL in GI254023-behandelten Zellen. (c) Die Menge an Zell-assoziiertem FasL wurde ebenfalls mittels ELISA nachgewiesen.

Standardabweichungen in (b) und (c) wurden aus Triplikaten errechnet.

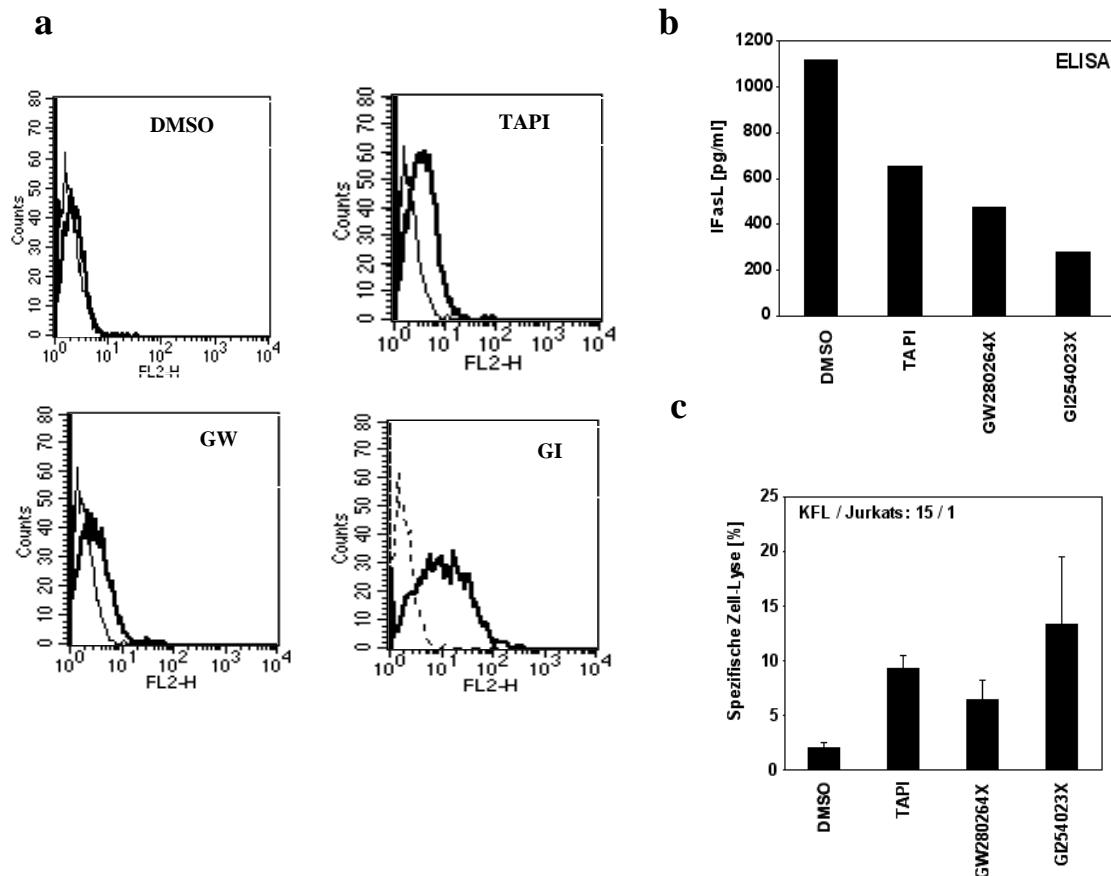
#### **4.1.4 Funktionelle Relevanz des ADAM10-vermittelten Fas Ligand-Shedding**

Nach der biochemischen, pharmakologischen und genetischen Charakterisierung von ADAM10 als vornehmlicher FasL-Sheddase sollte nun untersucht werden, in welcher Weise sich die ADAM10 vermittelte Prozessierung auf die biologische Aktivität des FasL auswirkt. Dabei wurde vor allem die Beeinflussung der zytotoxischen Aktivität des hFasL durch dessen *Shedding* untersucht.

##### **4.1.4.1 Regulation der apoptotischen Aktivität von Fas Ligand-exprimierenden KFL-Tumorzellen durch ADAM10**

Der FasL besitzt in seiner membrangebundenen Form eine weit höhere biologische Aktivität als der lösliche FasL. Eine Stabilisierung der FasL-Expression auf der Oberfläche von FasL-exprimierenden Zellen führt zu einer verstärkten zytotoxischen Wirkung auf Zellen, die durch die Expression des Fas-Rezeptors sensitiv für diesen ligandeninduzierten apoptotischen Signalweg sind (Tanaka, *et al.*, 1998).

Hier sollte nun untersucht werden, ob durch die Inhibierung von ADAM10 durch GI254023 eine FasL verminderte Abspaltung auch von stabil mit FasL transfizierten K562 Zellen (KFL-9) erreicht werden kann, und dies dann mit einer verstärkten Zytotoxizität auf Jurkat-Zielzellen einhergeht. Zunächst wurde, wie in Abb. 21a dargestellt, durch durchflusszytometrische Analyse nachgewiesen, dass die Behandlung der KFL-9 Zellen mit verschiedenen Metalloprotease-Inhibitoren zu einer deutlichen Verstärkung der FasL-Oberflächenexpression auf diesen Zellen führt. Auf den Zellen aus dem DMSO-Kontrollansatz konnte so gut wie kein FasL detektiert werden. Dabei zeigten TAPI und GW280264 einen vergleichbar deutlichen Effekt, GI254023 konnte sogar die FasL-Expression auf der Oberfläche der Zellen noch deutlicher steigern. Den durch FACS-Analysen ermittelten Daten entsprechen auch ELISA-Analysen der jeweiligen Zellkulturüberstände, denn es findet sich hier weniger löslicher FasL im konditionierten Medium der mit Metalloprotease Inhibitoren behandelten Zellen (Abb. 21b). Auch hier zeigte der präferentielle ADAM10-Inhibitor GI254023 den deutlichsten Effekt.



**Abb. 21: Erhöhte Zytotoxizität von KFL-9-Zellen durch Stabilisierung der FasL Oberflächen-Expression nach Inhibition von ADAM10**

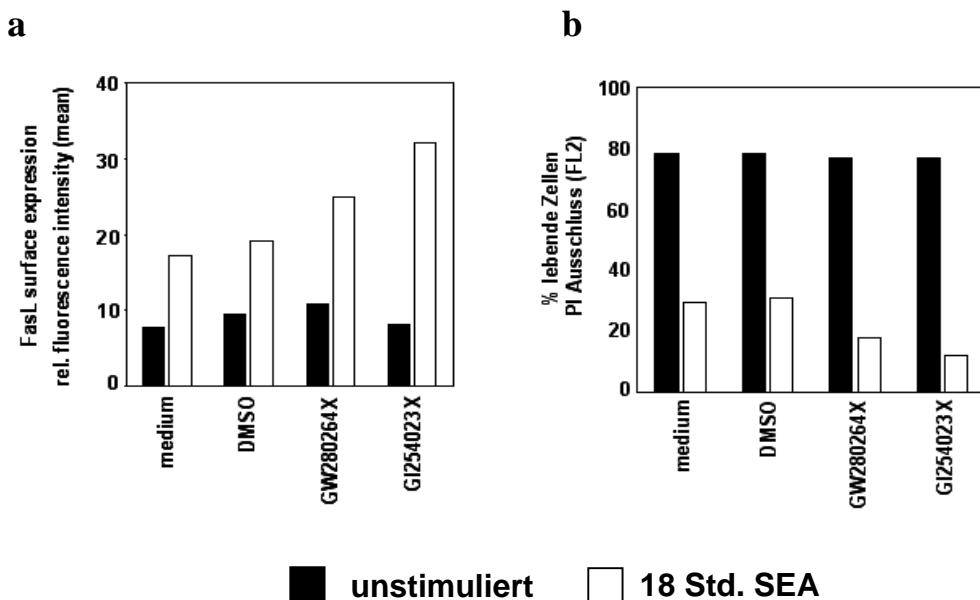
KFL-9-Zellen sind stabil mit FasL transfizierte K-562-Zellen (Erythroleukämie-Zelllinie). (a) Die Oberflächenexpression wurde nach einer 2-stündigen Behandlung mit DMSO oder den Inhibitoren TAPI-1, GI254023 und GW280264 mittels FACS-Analyse (Antikörper NOK-1) untersucht. (b) Die Freisetzung von löslichem FasL in die Überstände der behandelten Zellen wurden mittels ELISA untersucht. Die gezeigten Werte stammen aus einem Einzelexperiment, daher sind keine Standardabweichungen angegeben. (c) FasL-exprimierende KFL-9 Zellen wurden im Verhältnis 15:1 mit Chromium<sup>51</sup>- markierten, FasL- sensitiven Jurkat-Zellen gemischt und in Gegenwart von DMSO oder den Metalloprotease-Inhibitoren TAPI-1, GW280264 und GI254023 für 20 Stunden ko-inkubiert. Die durch FasL vermittelte Zytotoxizität wurde durch Freisetzung von Chromium aus den markierten Jurkat-Zellen ermittelt. Standardabweichungen wurden aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten berechnet.

Nachfolgend wurde die Zytotoxizität der KFL-9 Zellen auf FasL sensitive-Jurkat-Zellen in Gegenwart verschiedener Metalloprotease-Inhibitoren untersucht. Dazu wurden Jurkat-Zellen mit Cr<sup>51</sup> markiert, mit KFL-9 Zellen koinkubiert und die jeweilige FasL-vermittelte Lyse durch Messung der Menge an freigesetztem Cr<sup>51</sup> ermittelt. Wie in Abb.21c dargestellt, führte

eine Zugabe der Metalloprotease-Inhibitoren zu einer deutlichen Steigerung der FasL-vermittelten Zelllyse. Der durchschnittlich stärkste Anstieg der Zytotoxizität wurde hier bei dem Ansatz, dem GI254023 zugesetzt worden war, erreicht. Dieser Befund korreliert mit der stark erhöhten FasL-Oberflächenexpression auf den KFL-9 Zellen nach GI254023 Behandlung (Abb 14a).

### **4.1.4.2 ADAM10 vermitteltes FasL-*Shedding* beeinflusst den Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) von T-Zellen**

Die besondere physiologische Relevanz der FasL-Expression durch Zellen des Immunsystems ist in der Vermittlung des Aktivierungs-induzierten Zelltods zu sehen. Dieser immunregulatorische Prozess kann zellautonom ablaufen, was einem FasL-vermittelten Suizid einer aktivierte T-Zelle oder NK-Zelle entspricht. Es sollte untersucht werden, ob eine Zugabe von Metalloprotease Inhibitoren zu *in vitro* AICD-Versuchsansätzen zu einer beschleunigten/verstärkten Induktion des AICD in einer klonalen CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie (Klon 12603) führt. Dieser Versuch wurde in enger Zusammenarbeit mit Marcus Lettau (AG Jannssen, Immunologie, CAU Kiel) durchgeführt. Die aktivierte Zellen wurden zur AICD-Induktion für 18 Stunden mit SEA (*Staphylococcus Enterotoxin A*) restimuliert und der Anteil toter Zellen wurde mittels Propidium-Iodid Aufnahme ermittelt. In der graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse (Abb. 22) ist zu erkennen, dass hier die Zugabe von GI254023 oder GW280264 zur verstärkten FasL-Oberflächenexpression und damit korrelierend erhöhten AICD-Induktion führte. Dieses Ergebnis zeigt, dass ADAM10 auch im physiologisch besonders relevanten Kontext des AICD eine regulatorische Rolle spielt.



**Abb. 22: Verstärkter AICD in T-Zellen durch MP-Inhibitoren vermittelte Stabilisierung der FasL Oberflächenexpression**

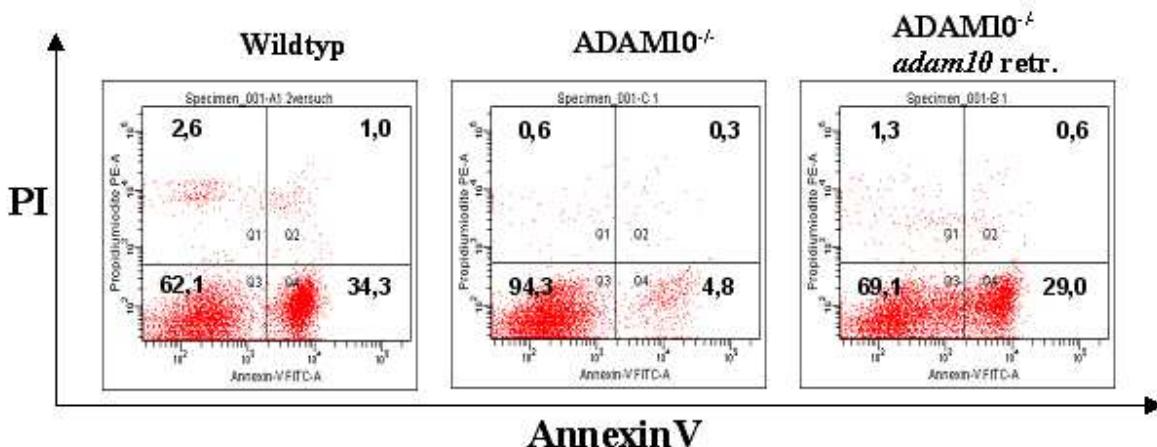
Aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Klon 12603) wurden zur Induktion des AICD für 18 Stunden mit Superantigen behandelt. Die Auswirkung des Zusatzes von DMSO bzw. der Metalloproteaseinhibitoren GI254023 und GI254023 auf die FasL-Oberflächenexpression von stimulierten und unstimulierten Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (a) Zur FasL-Färbung wurde der Antikörper NOK-1 verwendet. (b) Tote Zellen wurden mit Propidium-Iodid (PI) detektiert.

#### 4.1.4.3 ADAM10 setzt apoptotisch aktiven hFasL frei

In der Literatur sind widersprüchliche Angaben bezüglich der zytotoxischen Aktivität des löslichen hFasL zu finden. Während erste Untersuchungen der sezernierten Form eine Apoptose-auslösende Wirkung zuschrieben (Tanaka *et al.*, 1995, Powell *et al.*, 1999), zeigten andere Gruppen keine oder antiapoptotische Aktivitäten des löslichen FasL (Tanaka *et al.*, 1998, Schneider *et al.*, 1998). Die Trimerisierungsdomäne, welche für die Wirksamkeit des FasL essentiell ist, wird durch die beschriebenen, weiter membranproximal gelegenen potentiellen Spaltstellen des FasL nicht betroffen. Da die lösliche Form des hFasL auch tatsächlich trimerisiert (Schneider *et al.*, 1998), ist eine Apoptose-Aktivität der löslichen Form des FasL denkbar. Da aber dennoch die Zytotoxizität des löslichen FasL von der Spaltstelle und somit eventuell der FasL-prozessierenden Protease abhängig sein könnte (Hohlbaum *et al.*, 2000, Vargo-Gogola *et al.*, 2002a), wurde hier die Aktivität des exklusiv durch ADAM10 prozessierten hFasL untersucht.

Dazu wurden ADAM10-defizienten Zellen mit hFas alleine oder zusammen mit ADAM10 transfiziert und die zytotoxische Aktivität der konditionierten Medien verglichen. Hierbei wurden FasL-sensitive Jurkatzellen als Zielzellen benutzt und der Anteil an apoptotischen Zellen nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden mittels AnnexinV-Färbung durchflusszytometrisch quantifiziert.

In Abb. 23 ist das Ergebnis dieses Experiments dargestellt. Es wird durch den Anteil der AnnexinV-positiven Jurkatzellen deutlich, dass die Koexpression von hFasL mit ADAM10 in ADAM10<sup>-/-</sup> Zellen die Zytotoxizität des Zellkulturüberstands der MEFs auf ein mit dem Überstand von hFasL-transfizierten Wildtyp-MEFs vergleichbares Niveau steigt. Dieser Anteil beträgt im gezeigten Experiment 34,3 bzw. 29,0 Prozent. Der Überstand von ADAM10<sup>-/-</sup> Zellen zeigt mit lediglich 4,8 Prozent apoptotischer Jurkatzellen kaum zytotoxische Aktivität.



**Abb. 23: Durch ADAM10 freigesetzter löslicher FasL wirkt apoptotisch auf Jurkat-Zellen**

hFasL wurde in WT- und ADAM10<sup>-/-</sup> Maus-Fibroblasten transfiziert. Nach 30 Stunden wurde das konditionierte Medium ultrazentrifugiert, 10fach ankonzentriert und für 6 Stunden auf Fas-sensitive Jurkat-Zellen gegeben. Die Apoptoserate wurde durch Annexinfärbung und FACS-Analyse ermittelt. Lediglich im konditionierten Medium von WT-MEFs konnte deutliche apoptotische Aktivität ermittelt werden. Dagegen war diese Aktivität im konditionierten Medium von ADAM10<sup>-/-</sup> Zellen sehr gering. Die Retransfektion von ADAM10 in ADAM10<sup>-/-</sup>-MEFs stellte auch die apoptotische Aktivität im konditionierten Medium dieser Zellen wieder her.

#### 4.1.5 Regulatorische Aspekte des Fas Ligand-*Shedding* durch ADAM10

Durch die bisher beschriebenen Experimente konnte die kritische Rolle von ADAM10 in der Prozessierung des FasL für verschiedene Zelltypen klar gezeigt werden. Sowohl in den Experimenten, in denen der hFasL überexprimiert wurde, als auch in Versuchen mit Zellen, die den FasL endogen exprimieren, wurde ADAM10 als prinzipielle hFasL-*Sheddase* identifiziert. Die Bedeutung für die Regulation der zytotoxischen Aktivität wurde sowohl für T-Zellen als auch in einem Tumor-Modell nachgewiesen. Im folgenden Teil dieser Arbeit sind Experimente beschrieben, die darüber hinaus zum Verständnis der Regulation des FasL-*Shedding* durch ADAM10 beitragen soll.

##### 4.1.5.1 Wird der Fas Ligand bei Inhibition des *Shedding* endozytiert?

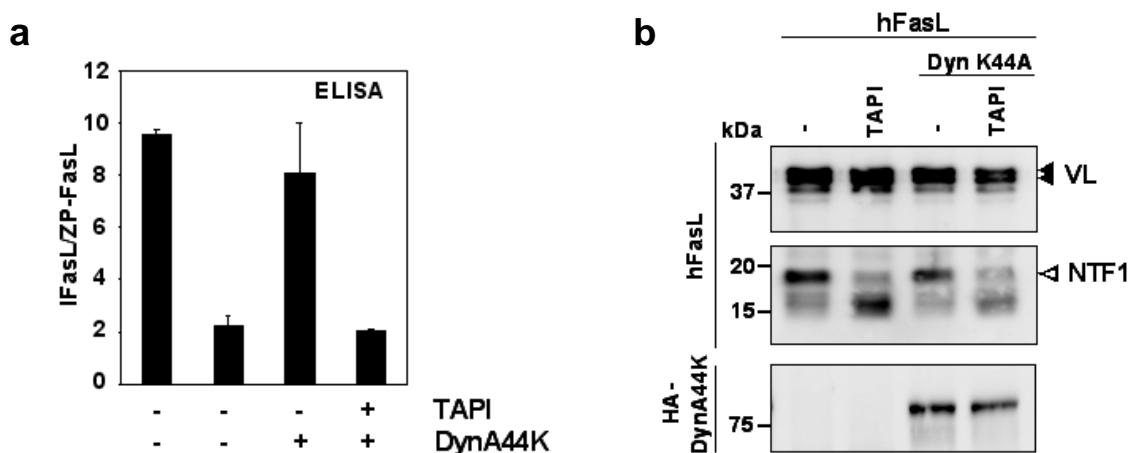
Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition des FasL-*Shedding* durch Metalloproteasen zu einer Verminderung der Menge an löslichem FasL im Überstand der Zellen führt. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass die Metalloprotease-Inhibition eine verstärkte Oberflächenexpression des FasL zur Folge hat. Dies wurde, wie unter 4.1.4 ausgeführt, sowohl für T-Zellen als auch für KFL-9 Zellen deutlich. Interessanterweise jedoch ergeben sowohl Immunoblot-Analysen, als auch quantitative ELISA-Analysen eine unklare Situation in Bezug auf den Verbleib eines großen Anteils des nicht abgespaltenen FasL nach Metalloprotease-Inhibition: Zum Beispiel wird in Abb.20 ersichtlich, dass durch die Inhibition der ADAM10-Aktivität aufgrund der Zugabe des Inibitors GI254023 zu der T-Zell Kultur die Menge an löslichem FasL im konditionierten Medium stark zurückgeht. Dennoch steigt die Menge an Zellpellet-assoziiertem FasL nicht im gleichen Ausmaß an. Es war lediglich eine leichte Zunahme an zellassoziiertem FasL nach GI254023-Zugabe im Vergleich zu den Ansätzen, denen kein Metalloprotease-Inhibitor zugegeben worden war, zu detektieren. Auch in anderen Versuchen wurde anhand der Immunoblot-Analyse mit dem Antikörper Ab3 und/oder G247-4 keinerlei Zunahme des Vollängen-FasL nach Inhibition deutlich (vergl. z.B. Abb. 11).

Insgesamt ist unklar, aus welchem Grund keine Akkumulation des zellassozierten FasL nach Metalloprotease-Inhibition festgestellt werden kann. Nguyen *et al.* untersuchten 2001 die Regulation der FasL-Expression durch T-Zellen während des Aktivierungs-induzierten

Zelltods. Sie zeigten, dass der FasL in großem Ausmaß von T-Lymphozyten endozytiert werden kann. Daher untersuchten wir, ob eine Inhibition der Endozytose bei gleichzeitiger Metalloprotease-Inhibition zu einer Zunahme der Menge an zellassoziiertem FasL führt.

Für dieses Experiment wurde eine dominant-negative Mutante der an der Clathrin-abhängigen Endozytose beteiligten GTPase Dynamin-2 verwendet. Der Austausch von Lysin<sup>44</sup> zu Alanin schaltet die GTPase-Aktivität von Dynamin-2 aus und verhindert so Clathrin-abhängige Endozytose (van der Bliek *et al.*, 1993).

Die Immunoblot- sowie ELISA-Analyse nach Koexpression von Dynamin-2 K44A mit hFasL in 293T-Zellen ist in Abb. 24 dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass sich keine signifikanten Änderungen in der hFasL-Prozessierung ergeben. Die Menge des Volllängen-FasL nimmt durch die Koexpression der Dynamin-2 K44A Mutante nicht zu (Abb. 24b), und auch die *Shedding*-Rate wird nicht in signifikanter Weise beeinflusst im Vergleich zu Zellen, die den hFasL alleine exprimieren (Abb 24a).



**Abb. 24: Nicht abgespaltener Fas Ligand unterliegt nicht der Dynamin-abhängigen Endozytose**

293T-Zellen wurden mit hFasL transfiziert. Zur Analyse einer möglichen FasL-Endozytose bei inhibierter *Shedding* wurden die Zellen mit der Dynamin-Mutante K44A kotransfiziert und/oder mit dem Breitband-Proteaseinhibitor TAPI behandelt. Das FasL *Shedding* wurde im Immunoblot analysiert und mittels ELISA quantifiziert. Die gewonnenen Daten deuten nicht auf einen Abbau durch Dynamin-abhängige Endozytose bei inhibierter Metalloprotease-Aktivität hin.

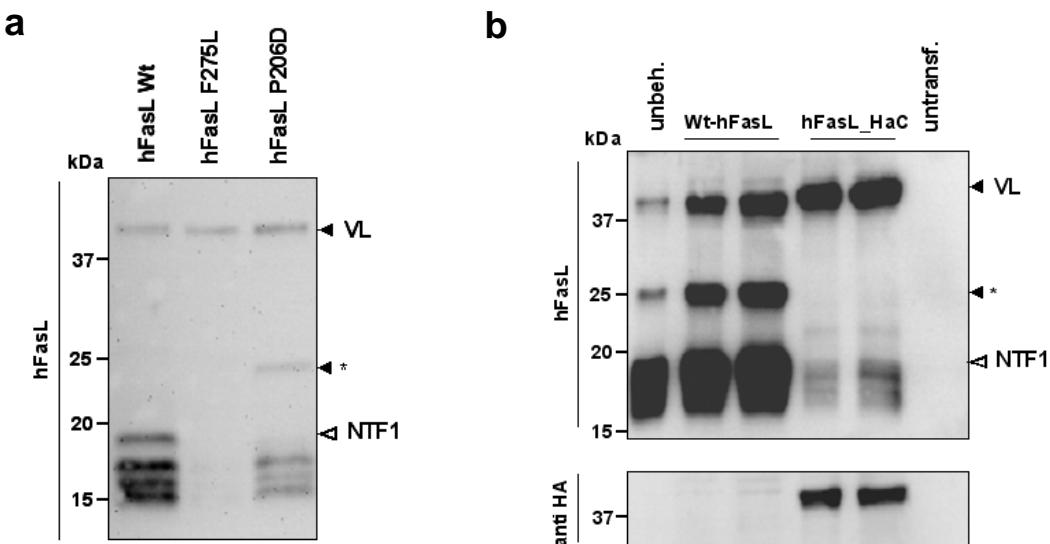
#### 4.1.5.2 Ist die Fas Ligand-Prozessierung abhängig von der Fas-Rezeptorbindung ?

Es sind in der Literatur einige Mutanten des humanen FasL beschrieben, die aufgrund von Punktmutationen in der extrazellulären Domäne nicht mehr an den Fas-Rezeptor binden können. Ein Austausch von Phenylalanin zu Leucin in der Position 275 (F275L) liegt dem *gld*-Phänotyp zugrunde (Schneider *et al.*, 1997). Der in dieser Weise mutierte FasL ist aufgrund seiner Unfähigkeit, den FasR zu binden, apoptotisch inaktiv. In ähnlicher Weise führt der Austausch von Prolin<sup>206</sup> zu Aspartat zu einer starken Verminderung der Rezeptorbindung und damit zur reduzierten apoptotischen Aktivität dieser Mutante.

Beide hFasL-Mutanten wurden durch PCR-basierende-Mutagenese generiert. Aus zwei Gründen sollten sie auf ihr *Shedding*-Verhalten hin analysiert werden: Zum einen ist für eine Reihe von Proteinen, z.B. für den IL-6-Rezeptor (Chalaris *et al.*, 2007), E-Cadherin (Steinhusen *et al.*, 2001), CD46 (Hakulinen *et al.*, 2006) oder L-Selektin (Walcheck *et al.*, 2006) beschrieben, dass eine Induktion der Apoptose ein verstärktes *Shedding* der verschiedenen ADAM-Substrate zur Folge hat. Im Falle von L-Selektin, CD46 und IL-6-R sind hierfür ADAM-Proteasen verantwortlich gemacht worden. Zum anderen sollte die Verwendung von apoptotisch inaktiven FasL-Mutanten eine mögliche Apoptose-vermittelte Beeinflussung der FasL-Prozessierung ausschließen und eine Verwendung des Apoptose-Inhibitors z-VAD in den Zellkultur-Ansätzen erübrigen.

Wildtyp hFasL und die hFasL-Mutanten F275L und P206D wurden in 293T-Zellen exprimiert und die entsprechenden Zelllysate im Immunoblot mit dem Antikörper Ab3 nach SDS-PAGE analysiert. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 25a dargestellt. Hier wird eine Korrelation der Fas-Bindungsfähigkeit der beiden Mutanten mit der Signalstärke der N-terminalen Spaltfragmente deutlich. Für die F275L-Mutante ist keinerlei NTF-Signal detektierbar, übereinstimmend mit der zerstörten Fas-Bindungsfähigkeit. Die P206D-Mutante, für die noch einer schwache Bindung an den FasR beschrieben worden war, zeigt auch noch ein schwaches Signal für die N-terminalen Fragmente im Immunoblot.

Ebenso führt die Anbringung eines Hämagglutinin-Tags (HA-Tag) an den C-Terminus des hFasL zu einer starken Reduktion der Generierung von NTFs, wie in Abb. 25b zu erkennen ist.



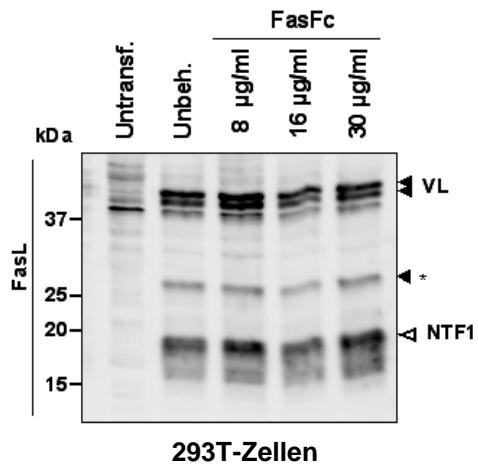
**Abb. 25: Reduziertes *Shedding* von humanen Fas Ligand Rezeptor-Bindungsmutanten**

(a) 293T Zellen wurden mit humanem Wildtyp-FasL sowie den FasR Bindungsmutanten F275L (*gld*-Mutante) und P206D transfiziert. Während für die drei Proteine eine vergleichbare Menge Volllängenprotein (VL) bei 40 kDa detektiert werden konnte, waren die N-terminale *Shedding*-Fragmente bei P206D stark reduziert und bei F275D abwesend. (b) Auch die Anbringung eines HA-Tags an das extrazelluläre Ende des FasL verminderte das FasL *Shedding*. \* = Bande mit unbekannter Identität; NTF = N-terminales Fragment.

Keine der hier verwendeten Varianten des hFasL konnte mittels ELISA-Analyse näher auf die Generierung von löslichen Spaltprodukten im konditionierten Medium untersucht werden, da sie vom verwendeten hFasL-spezifischen ELISA-System nicht erkannt werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte durch eine Zerstörung des entsprechenden Epitops innerhalb des nativen FasL-Moleküls für eine oder beide der im ELISA verwendeten Antikörper gegeben sein. Aufgrund der in den bisherigen Experimenten gezeigten Korrelation des NTF1 bei ca.18 kDa mit der Generierung von löslichem FasL kann jedoch angenommen werden, dass die hier verwendeten hFasL-Varianten ein verändertes Verhalten im *Shedding* aufweisen.

Nun sollte versucht werden, die Ursache für die *Shedding*-Defekte der hFasL-Mutanten, die den Fas-Rezeptor nicht binden, einzugrenzen. Zunächst wurde untersucht, ob durch die Zugabe einer rekombinanten löslichen Form des humanen Fas-Rezeptors, die um die Bindung des Wildtyp-hFasL an den zellgebundenen Fas-Rezeptor konkurrieren sollte, das *Shedding* dieser hFasL-Varianten beeinflusst werden kann. Während der Expression des hFasL in 293T-Zellen wurde löslicher Fas-Rezeptor, gekoppelt an einen Antikörper-Fc-Teil (FasFc), in verschiedenen Konzentrationen ins Kulturmedium gegeben. In Abb. 26 wird aufgrund der

gezeigten Immunoblot-Analyse mit dem Antikörper Ab3 ersichtlich, dass diese Behandlung keinen signifikanten Einfluss auf die FasL-Prozessierung zu haben scheint.



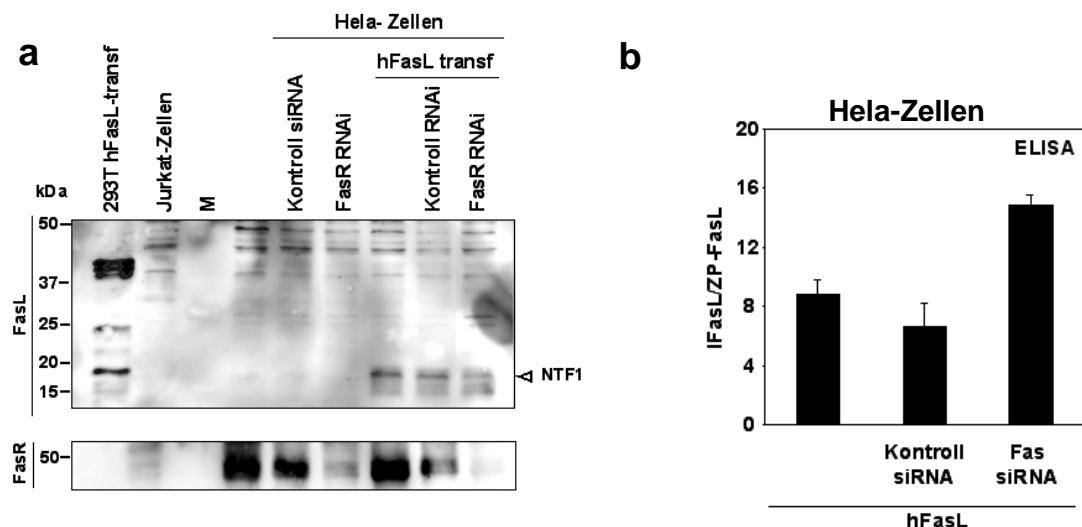
**Abb. 26: Keine Beeinflussung der FasL-Prozessierung durch Zugabe von FasFc**

8 Stunden nach der hFasL-Transfektion in 293T-Zellen wurde FasFc zur Blockierung der FasL-Bindung an membrangebundenen Fas-Rezeptor in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Die Zelllysate wurden im Immunoblot mit dem Antikörper Ab3 analysiert. Es konnte keine Beeinflussung des Prozessierungsmusters erkannt werden.

Zur genaueren Analyse, welchen Einflusses die Bindung des hFasL an seinen Rezeptor auf sein *Shedding* haben könnte, wurde der FasR in Hela-Zellen mittels RNAi-Technologie herunterreguliert. Nach Expression des hFasL wurde dessen Prozessierung in so behandelten Zellen mit der Prozessierung in unbehandelten Zellen oder Zellen, die mit einem Kontroll-Oligonukleotid transfiziert worden waren, verglichen. Sowohl die Immunoblot- als auch die ELISA-Analyse der Zelllysate und der konditionierten Medien sind in Abb. 27 dargestellt.

Obwohl die Herunterregulation der Fas-Rezeptor-Expression erfolgreich war, konnte keine Verminderung in der Freisetzungsraten von löslichem hFasL nachgewiesen werden. Die N-terminalen Spaltfragmente erschienen in der Immunoblot-Analyse der Zelllysate mit dem Antikörper Ab3 in dem Ansatz mit herunterreguliertem Fas-Rezeptor vermindert (Abb. 27a). Dennoch ergab die quantitative Analyse mittels FasL-spezifischem ELISA eine niedrigere Transfektionsrate für diesen Ansatz, i.e. weniger Zell-Pellet assoziierten FasL im Vergleich zu den zwei Kontrollansätzen. Diese Aussage lässt sich aus dem Immunoblot nicht ablesen, da hier kein Signal für das Vollängen-Protein detektiert werden konnte.

Die Berechnung der *Shedding*-Rate ergab sogar eine Erhöhung der Menge an löslichem FasL im konditionierten Medium im Verhältnis zum zellassozierten FasL (Abb. 27b). Dies ist ein Hinweis darauf, dass das FasL-*Shedding* nicht durch dessen Bindung an seinen Rezeptor vermittelt sein könnte.

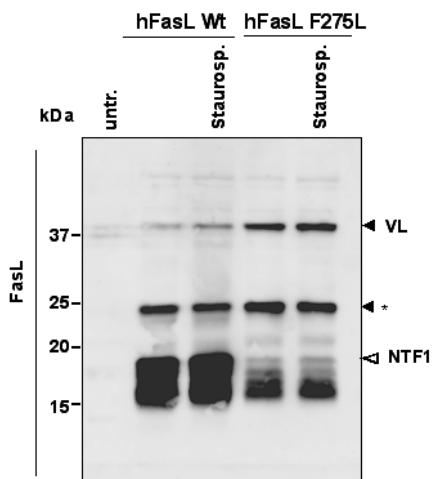


**Abb 27: Die Herunterregulation des Fas-Rezeptors führt nicht zu einem verminderter Fas Ligand-Shedding**

HeLa-Zellen wurden mit gegen den Fas-Rezeptor gerichtete RNAi oder Kontroll-RNAi behandelt und nach 48 Stunden mit hFasL transfiziert. Nach weiteren 12 Stunden wurde das Medium gewechselt und Rate der FasL Prozessierung über eine Zeitraum von 12 Stunden durch (a) ELISA-Analyse ermittelt. (b) Die Generierung des NTF1 wurden mit dem Antikörper Ab3 im Immunoblot nachgewiesen. Im gleichen Immunoblot wurde die FasR-Expression in den verschiedenen Proben analysiert. Durch die erfolgreiche Herunterregulation der FasR-Expression konnte keine negative Beeinflussung des FasL-*Shedding* erreicht werden,

Nachdem die Rezeptorbindung des hFasL an den Fas-Rezeptor nicht als Voraussetzung für das *Shedding* des FasL ausgemacht werden konnte, wurde untersucht, ob die durch FasL-Bindung vermittelte Auslösung der Apoptose in den Fas-tragenden Zellen im Zusammenhang mit dem *Shedding* des hFasL stehen könnte. Für diese Analysen wurden der Wildtyp-hFasL und die hFasL-Variation F275L in 293T-Zellen transfiziert. Durch Behandlung mit dem Alkaloid Staurosporin, das die Bindung von ATP an verschiedene Kininasen hemmt, wurde in den Zellen Apoptose induziert (Ruegg *et al.*, 1998). Unter anderem für N-Cadherin wurde eine Staurosporin-vermittelte Induktion des ADAM10-abhängigen *Sheddings* von N-Cadherin gezeigt (Reiss *et al.*, 2005)

Die Immunoblot-Analyse, dargestellt in Abb. 28, zeigte allerdings keine Unterschiede in dem Muster der hFasL-Prozessierung durch apoptotische oder nicht-apoptotische 293T-Zellen. Dies könnte bedeuten, dass die Regulation des hFasL-*Shedding* nicht an Signaltranduktionswege gekoppelt ist, die durch die Staurosporin-vermittelte Apoptose beeinflusst werden.



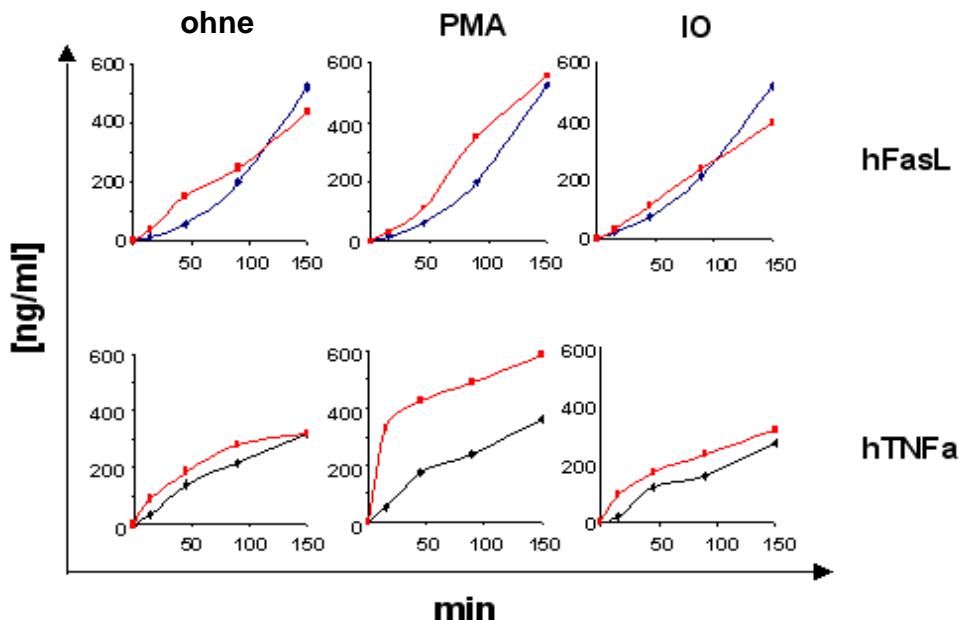
**Abb. 28: Untersuchung einer möglichen Apoptose-Abhängigkeit der Fas Ligand-Prozessierung**

293T-Zellen wurden mit WT-hFasL oder der F275L-Mutante transfiziert. Die Zellen wurden nach 14 Stunden Expressionszeit mit  $1\mu\text{M}$  Staurosporin behandelt. Nach weiteren 6 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Prozessierung des FasL mittels Immunoblot-Analyse mit dem Antikörper Ab3 analysiert. Dabei konnten keine Unterschiede in der Art der Prozessierung festgestellt werden.

#### 4.1.5.3 Untersuchung der Stimulierbarkeit des Fas Ligand-*Shedding*

Für eine große Anzahl von Proteinen, die von ADAM-Proteasen prozessiert werden, wurden unterschiedliche Substanzen gefunden, die das *Shedding* stimulieren können. Klassischerweise werden dabei vor allem Phorbolester wie PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) und Ionophore wie Ionomycin verwendet. Für ADAM17-Substrate ist in vielen Zusammenhängen eine Stimulierbarkeit durch PMA gezeigt worden. So ist zum Beispiel das ADAM17-vermittelte *Shedding* von hTNF- $\alpha$  oder L1 in häufig starkem Ausmaß durch PMA induzierbar. Das *Shedding* einer Reihe von Substraten wie EGF (*Epidermal Growth Factor*), Betacellulin (Blobel *et al.*, 2005) oder E- und N-Cadherin (Reiss *et al.*, 2005; Maretzky *et al.*, 2005a durch ADAM10 kann dagegen mittels Ionomycin stimuliert werden.

Hier wurde die Stimulierbarkeit der FasL-Spaltung in verschiedenen Zellsystemen untersucht. Dazu wurde zunächst eine genaue zeitkinetische Analyse des hFasL-*Shedding* unter Zusatz von PMA und Ionomycin durchgeführt. Die Abb. 29 gezeigte Auswertung dieser Untersuchung zeigt, dass das hFasL-*Shedding* in schwacher Weise durch PMA stimulierbar sein könnte. Allerdings ist die Menge des durch PMA-Zugabe zusätzlich freigesetzten löslichen hFasL lediglich leicht erhöht, während im Vergleich die PMA-Stimulation des hTNF- $\alpha$ -*Shedding* weit deutlicher ausfällt. Besonders wird hier die sehr schnelle Reaktion bereits in einem Zeitraum von 20 Minuten nach PMA-Zugabe deutlich, wohingegen die leichte Stimulation des FasL-*Shedding* erst etwa ab Minute 70 deutlich wurde.

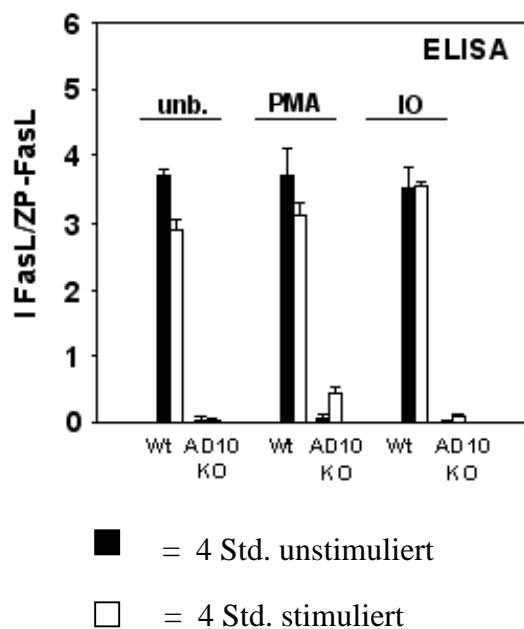


**Abb. 29: hFasL-Shedding ist in Cos7-Zellen nicht signifikant stimulierbar**

(a) 14 Stunden nach der Transfektion von hFasL in 293T-Zellen wurde das Medium gewechselt und die *Shedding*-Rate über einen Zeitraum von 3 Stunden ermittelt. Dazu wurden nach 15, 45, 90 und 150 Minuten Aliquots entnommen und die *Shedding*-Rate zu den verschiedenen Zeitpunkten durch ELISA-Analyse ermittelt. Nach erneutem Mediumwechsel wurde je ein Ansatz mit PMA 500ng/ml oder Ionomycin (5 $\mu$ M) versetzt und die *Shedding*-Rate in gleicher Weise ermittelt. Es ist kein signifikanter Unterschied in der Generierung von sFasL zwischen unbehandelten und stimulierten Zellen erkennbar. (b) Als Kontrolle im Stimulationsexperiment wurde die Generierung von löslichem hTNF- $\alpha$  in gleicher Weise untersucht. Hier wird eine Stimulierbarkeit durch PMA deutlich.

Nachfolgend wurde untersucht, ob der leichten PMA-Stimulierbarkeit des hFasL-*Shedding* eine Aktivierung von ADAM10 oder einer anderen Protease zugrunde liegt. Dazu wurden hFasL- transfizierte Wildtyp- bzw. ADAM10-defiziente Mausfibroblasten mit PMA behandelt. Die Menge an freigesetztem löslichen hFasL im Verhältnis zum zellassoziierten hFasL wurde mittels hFasL-spezifischer ELISA-Analyse bestimmt. Wie in Abb. 30 zu erkennen, konnte das FasL-*Shedding* in ADAM10-defizienten Zellen durch PMA in geringer Weise stimuliert werden. Daher muss die beobachtete leichte PMA-Stimulierbarkeit des hFasL-*Shedding* auf der Aktivität einer anderen Protease als ADAM10 beruhen.

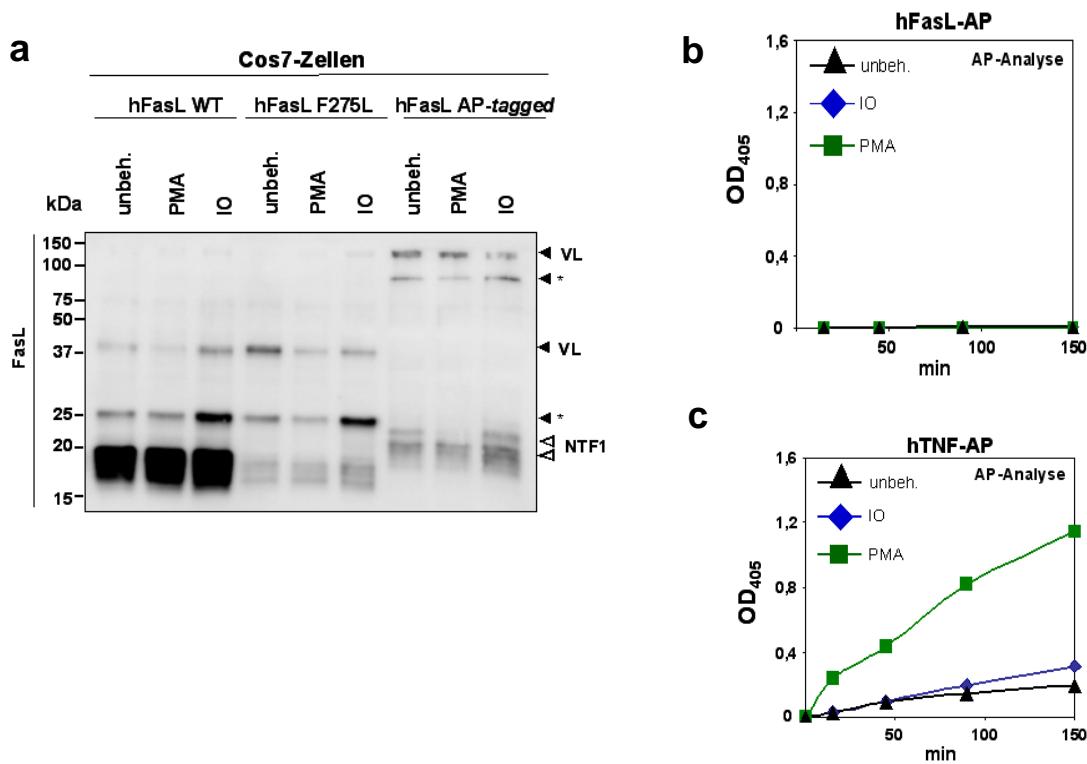
Aufgrund des äußerst geringen Ausmaßes der PMA-Stimulierbarkeit des hFasL-*Shedding* wurden in diesem Zusammenhang keine weiteren Untersuchungen, etwa zur Identität der zugrundeliegenden Protease, unternommen.



**Abb 30: Stimulation der FasL-Prozessierung in Wt- und ADAM-/-Mausfibroblasten**

Wildtyp und ADAM10-defiziente embryonale Mausfibroblasten wurden mit hFasL transfiziert. 16 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Bildung von löslichem FasL im Zellkulturüberstand über einen Zeitraum von drei Stunden mittels ELISA-Analyse vermessen. Danach wurde das Medium wiederum gewechselt, und der lFasL-Gehalt in unstimulierten oder PMA-bzw. Ionomycin-stimulierten Ansätzen bestimmt. Die Freisetzungsraten des lFasL wurde aus dem Quotient von lFasL und Zellpellet-assoziiertem hFasL (ZP-FasL) berechnet.

Allerdings war es von Interesse, ob eine Stimulation des *Shedding* der Fas-Bindungsmutanten möglich ist. Theoretisch könnten andere Signale, abseits des durch FasL ausgelösten apoptotischen Signalwegs, durch die Bindung von FasL an den Fas-Rezeptor die Abspaltung der FasL-Ektodomäne auslösen. Da sowohl PMA als auch Ionomycin stark in eine Vielzahl von zellulären Signalwegen eingreifen, wurde versucht, mit diesen beiden Substanzen eine Stimulation des *Shedding* der hFasL-Varianten zu erreichen, die unter normalen Bedingungen sehr wahrscheinlich nicht abgespaltenen werden. Hier wurde neben der oben beschriebenen F275L-Variante ein Konstrukt des Wildtyp-hFasL mit einer an den C-Terminus fusionierten Alkalischen Phosphatase verwendet. Auch durch diesen Tag wird die Generierung von N-terminalen Spaltfragmenten, wie auch vorher durch die Anbringung eines HA-Tags (siehe Abb. 25b) sehr stark reduziert.



**Abb. 31: Untersuchung einer möglichen Induzierbarkeit des *Shedding* der hFas Ligand Rezeptor-Bindungsmutanten**

Hier wurde untersucht, ob die Prozessierung der FasL-Mutanten, die ein verringertes Ausmaß an *Shedding*-Aktivität zeigen, induziert werden kann. Dabei kam zum einen Staurosporin als Apoptose-induzierendes Agens als auch PMA (PKC-Aktivierung) und Ionomycin (Calcium-Influx) zum Einsatz.

WT-hFasL sowie die Rezeptor-Bindungsmutante F275L wurden in Cos7-Zellen exprimiert und das *Shedding* nach Behandlung mit Staurosporin (1 $\mu$ M) für 6 Stunden im Immunoblot untersucht. b) Cos-7 Zellen wurden mit WT-hFasL, der Fas-Bindungsmutante F275L sowie einem extrazellulär AP-markierten hFasL-Konstrukt transfiziert. Im Immunoblot wurde das FasL *Shedding* nach Behandlung mit PMA (200 ng/ml) oder Ionomycin (5 $\mu$ M) analysiert. In beiden Experimenten wurden keine Anzeichen für eine Induktion der FasL-Prozessierung durch die verschiedenen Substanzen gefunden. (c) Als Kontrolle für die AP-Analyse wurde das stimulierbare *Shedding* eines hTNF- $\alpha$  AP-Konstrukts vermessen.

In Abb. 31a ist die Immunoblot-Analyse der im SDS-Gel aufgetrennten Zelllysate von unbehandelten oder stimulierten 293T-Zellen gezeigt, die den Wt-FasL oder eine entsprechende Variante exprimieren. Es sind keine signifikante Unterschiede in der Signalstärke der generierten N-terminalen Fragmente aufgrund der Stimulation zu erkennen. Für das Konstrukt hFasL-AP konnte zudem unter Ausnutzung der Phosphatase-Aktivität der C-terminal an den FasL fusionierten AP eine eventuelle Freisetzung der extrazellulären Domäne des hFasL unter Stimulationsbedingungen in den Zellüberstand untersucht werden.

Dazu wurde den abgenommenen Zellkulturüberständen 4-Nitrophenyphosphat zugesetzt und das gebildete Reaktionsprodukt bei 405nm photometrisch quantifiziert (Zheng *et al.*, 2002).

In Abb. 31b wird deutlich, dass kein löslicher, mit Alkalischer Phosphatase fusionierter hFasL im Überstand durch Messung der AP-Aktivität detektiert werden konnte. Zur Kontrolle wurde der gleiche Experiment mit einem hTNF- $\alpha$ -Konstrukt durchgeführt, das ebenso einen C-terminalen AP-Tag aufweist. Die bekannte PMA-Stimulierbarkeit des *Shedding* dieses Konstrukts durch PMA konnte dagegen, wie in Abb.31c dargestellt, deutlich gezeigt werden.

## 4.2 Chimärenanalysen zum humanen Fas Ligand- und humanem TNF- $\alpha$ -Shedding

Es sind durch einige Gruppen Untersuchungen durchgeführt worden, die zur Identifizierung von strukturellen Bereichen, die funktionell an der proteolytischen Aktivität der ADAM Proteasen beteiligt sind, führten. Häufig wurden hierfür chimäre ADAM-Proteasen und/oder chimäre ADAM-Substrate erzeugt (u.a. Reddy *et al.*, 2000, Smith *et al.*, 2002; Horiuchi *et al.*, 2006, Fors *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 1995). Durch den systematischen Austausch einer oder mehrerer Domänen einer bestimmten Protease gegen entsprechende Domänen einer homologen Protease, die ein bestimmtes Substrat nicht prozessiert, konnten so Bereiche bestimmt werden, die für Spaltung des betrachteten Substrat hinreichend und/oder notwendig sind. Analog dazu wurden auch das *Shedding* chimärer Substratmoleküle analysiert.

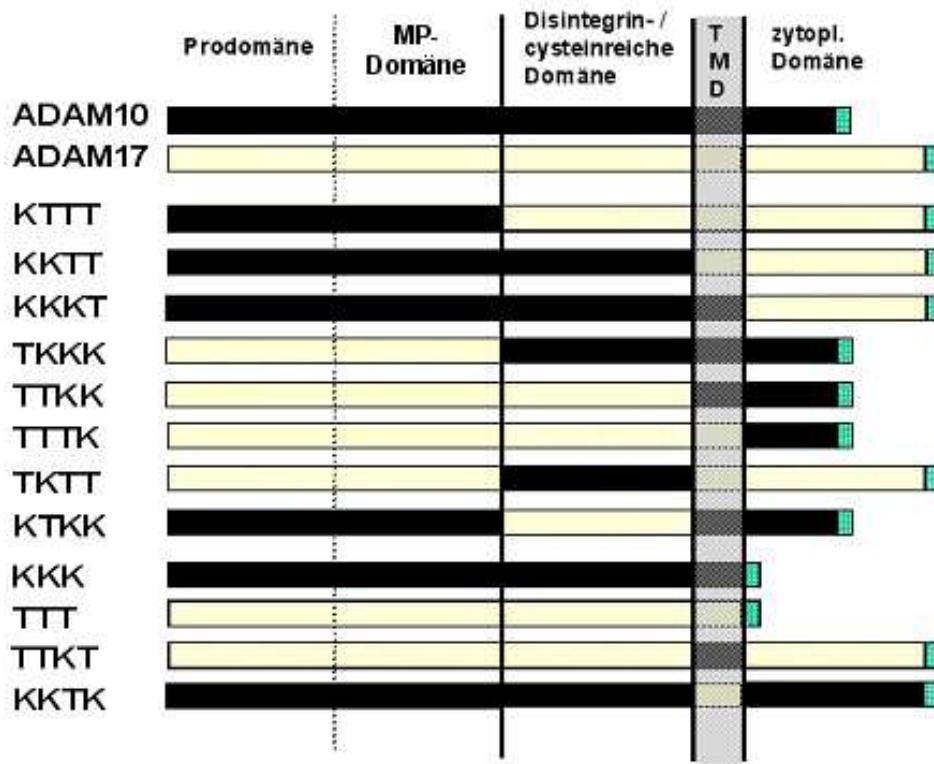
### 4.2.1 Herstellung und Charakterisierung der ADAM10/ADAM17-Chimären

Im folgenden sind Experimente beschrieben, die zum Verständnis der Regulation des Substrat-*Sheddings* durch ADAM-Proteasen beitragen sollen. Für diese Analysen wurden chimäre Konstrukte aus ADAM10 und ADAM17 hergestellt. Mittels Fusions-PCR wurden, wie unter Material und Methoden beschrieben, DNA-Abschnitte ausgetauscht, die für die unterschiedlichen Domänen der beiden Proteasen (Metalloprotease-Domäne (MP-Domäne), Disintegrin-/cysteinreiche Domäne, Transmembrandomäne (TMD) sowie zytoplasmatische Domäne) kodieren.

Dabei sollte das *Shedding* des FasL im Mittelpunkt stehen. Darüber hinaus wurde das *Shedding* von hTNF- $\alpha$  näher analysiert, da er einige Homologien mit dem FasL aufweist, jedoch auch durch ADAM17 prozessiert werden kann. Von besonderem Interesse war in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass der hTNF- $\alpha$  neben dem konstitutiven *Shedding* einem PMA-stimulierbaren *Shedding* unterliegt (Unglaub *et al.*; 1987). Die molekularen Grundlagen dieser Stimulation sind in weiten Teilen unverstanden, und sollten daher in dieser Arbeit näher untersucht werden.

In Abb. 31 sind die auf diese Weise hergestellten Mischproteine schematisch dargestellt. Die Bezeichnung der Konstrukte benutzt die Buchstaben K (ADAM10, Kuzbanian) und T

(ADAM17, TACE), in der Reihenfolge Metalloprotease-Domäne, Disintegrin-/cysteinreiche Domäne, Transmembrandomäne und zytoplasmatische Domäne. Alle Konstrukte wurden am C-Terminus mit einem HA-Tag fusioniert.



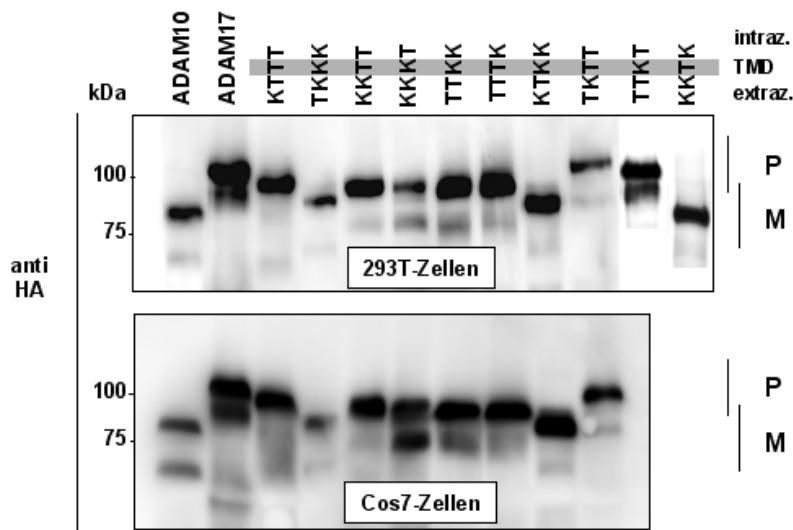
**Abb. 32: Schematische Darstellung der ADAM/ADAM17 Chimären**

Die verschiedenen hier schematisch dargestellten Chimären aus ADAM10 und ADAM17 wurden durch Fusions-PCR hergestellt. Intrazellulär ist ein HA-Tag fusioniert (grün dargestellt). Die Bezeichnungen mit den Buchstaben T und K lehnen sich an die alternativen Namen für ADAM10 und ADAM17 an: Kuzbanian und TACE. Sie sind in der Reihenfolge Prodomäne/Metalloprotease-Domäne, Disintegrin-/cysteinreiche Domäne, Transmembrandomäne (TMD), zytoplasmatische Domäne geschrieben. Zur leichteren Orientierung sind die Transmembrandomänen sowohl im Buchstabencode als auch im Schema grau hinterlegt.

Zunächst wurde die Expression sowie die Maturierung der chimären Proteasen durch Immunoblot-Analyse mit dem gegen den HA-Tag gerichteten monoklonalen Antikörper 3F10 analysiert. Es stellte sich hierbei heraus, dass diejenigen Konstrukte, die die Metalloprotease-Domäne von ADAM17 besitzen, etwa zehnfach stärker exprimiert werden als Konstrukte, die die ADAM10-Metalloprotease-Domäne aufweisen (Daten nicht gezeigt). Um eine Vergleichbarkeit der Aktivitäten der Chimären beim hFasL- oder hTNF- $\alpha$ -*Shedding* zu gewährleisten, wurde in den Experimenten, in denen die ADAM10/17-Chimären mit hTNF- $\alpha$  oder hFasL koexprimiert wurden, die transfizierte DNA-Menge entsprechend angepasst.

Auch die Zellen, deren Lysate im dargestellten Immunoblot analysiert wurden, waren in dieser Weise transfiziert worden (Abb. 33). Hier ist neben der so erreichten vergleichbaren Transfektionsstärke zu erkennen, dass die chimären ADAM10/ADAM17-Proteasen eine leicht unterschiedliche Maturierung zeigen. Dies wird durch ein quantitativ unterschiedliches Verhältnis von der größeren Proform zu der kleineren maturen Form bei verschiedenen Chimären ersichtlich. Daraüber hinaus war eine leichte Varianz im Verhältnis von Proform zu maturer Form bei der Expression der Chimären in Cos7- und 293T-Zellen zu beobachten. Aus diesem Grund sind zwei repräsentative Immunoblots gezeigt.

Für alle chimären Proteasen konnte eine mature Form detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass alle Konstrukte vom Golgiapparat/Transgolgi-Netzwerk an die Zelloberfläche transportiert werden, denn dieser Translokationsschritt geht mit der durch die Abspaltung der Prodomäne charakterisierten Maturierung der ADAM-Proteasen einher (Anders *et al.*, 2001). Dies weist darauf hin, dass alle Proteasen potentiell mit zu untersuchenden Substraten auf der Zelloberfläche interagieren können.

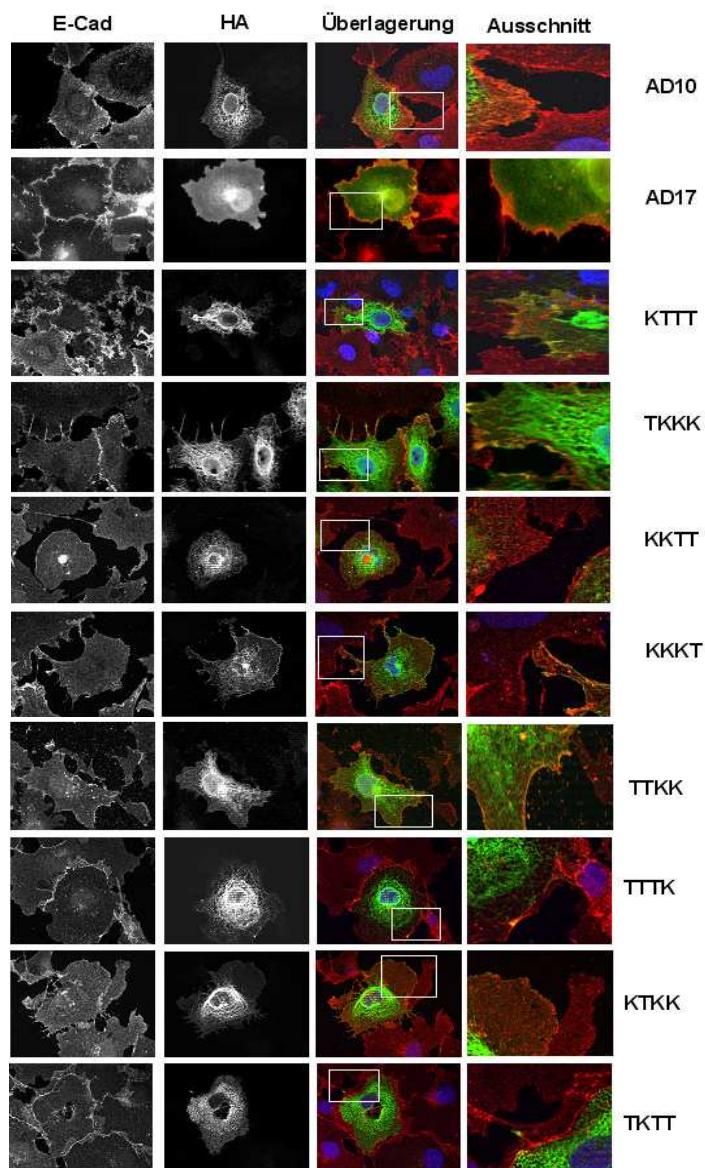


**Abb. 33: Immunoblot-Analyse der ADAM10/17-Chimären-Expression in Cos7- und 293T-Zellen**

Cos7- und 293T-Zellen wurden mit den chimären ADAM10/ADAM17-Konstrukten transfiziert. Nach 72 Stunden wurde die Expression der HA-getaggten chimären Proteasen im Immunoblot nach SDS-PAGE mit dem HA-spezifischen monoklonalen Antikörper 3F10 (Roche) kontrolliert. Die unterschiedlichen Größen der Chimären sind in erster Linie mit der größeren zytoplasmatischen Domäne von ADAM17 gegenüber ADAM10 zu erklären. Insgesamt konnte für jedes chimäre Enzymprotein eine mature Form gezeigt werden. Im Buchstabencode für die verschiedenen Chimären ist zur leichteren Orientierung die Transmembrandomäne grau hinterlegt. P= Proform; M= mature Form

## Ergebnisse

Die subzelluläre Lokalisation der ADAM10/ADAM17-Chimären wurde mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Von besonderem Interesse war, ob die chimären Proteasen zur Zelloberfläche gelangen können, oder offensichtliche Defekte in ihrer Sortierung und Lokalisation aufweisen. Dies würde auf eine mögliche Inaktivität einer bestimmten chimären Protease hinweisen.



**Abb. 34: Immunfluoreszenz-Analyse der ADAM10/ADAM17-Chimären Lokalisation in Cos7-Zellen**

Cos7-Zellen wurden mit den chimären ADAM10/ADAM17-Konstrukten transfiziert. Nach 72 Stunden wurde die Lokalisation der überexprimierten Proteine durch Immunfloureszenz-Analysen nachgewiesen. Zur Anfärbung des Oberflächenmarkers E-Cadherin wurde ein Antikörper der Firma BD Bioscience (Klon36) verwendet. Die HA-getagten Chimäre wurden mit dem HA-spezifischen Antikörper 3F10 detektiert. Als Zweitantikörper kam der AF594-gekoppelte Ziege- $\alpha$ Kaninchen IgG-Antikörper (rot) bzw. der AF488-gekoppelte Ziege- $\alpha$ Ratte IgG Antikörper (grün) zum Einsatz. Für die Chimären KKTK und TTKT sind keine Abbildungen gezeigt.

Abb. 34 zeigt die Immunfluoreszenz-Analyse der chimären Proteasen in Cos7-Zellen drei Tage nach Transfektion der entsprechenden Konstrukte. Eine verbesserte Erkennung der Zellgrenzen wurde durch die gleichzeitige Anfärbung von E-Cadherin, das zu einem großen Teil auf der Zelloberfläche lokalisiert ist, erreicht.

Insgesamt konnte für die meisten Chimären eine mit den Wildtypproteasen vergleichbare Lokalisation ermittelt werden. Die Chimären TTTK und KTKK lokalisierten in etwas anderer Form als die Wildtyp-ADAMs. Sie zeigten eine intrazelluläre Verteilung, die eine verstärkte Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum andeutet. Doch auch hier ist zu erkennen, dass ein Teil der exprimierten chimären Protease an der Zelloberfläche lokalisiert ist.

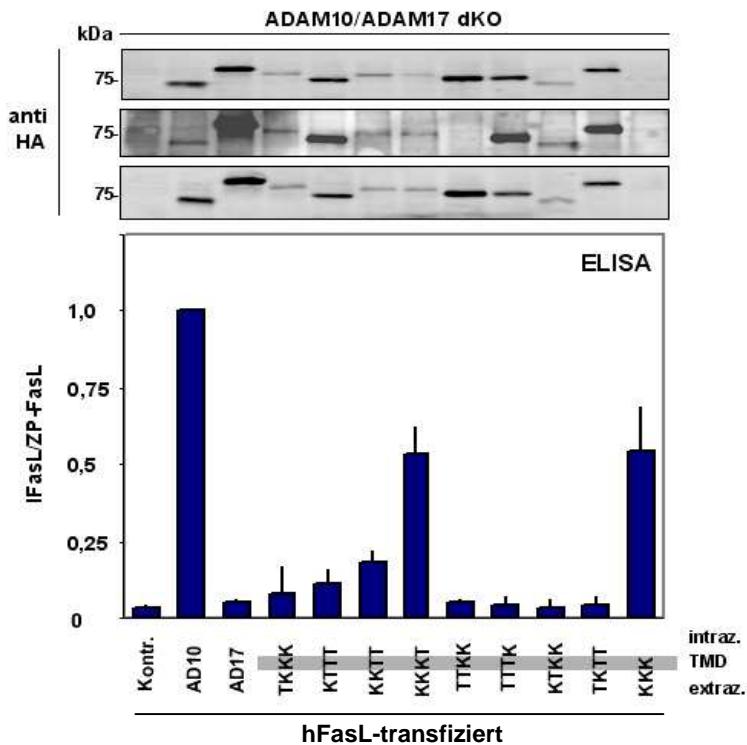
### 4.2.2 Chimärenanalysen zum Fas Ligand-*Shedding*

Die Analysen zu der Frage, welche chimären Proteasen den FasL prozessieren können, wurde analog zu dem in Abb. 15 gezeigten Experiment durchgeführt. Hier wurde bereits nachgewiesen, dass ADAM10-defiziente Mausfibroblasten keinen löslichen FasL in den Zellkulturüberstand abgeben. Eine Retransfektion von ADAM10, nicht jedoch ADAM17, führte hier zu einer Wiederherstellung der Fähigkeit dieser Zellen, löslichen hFasL zu generieren.

Durch den Austausch verschiedener Domänen von ADAM10 gegen die entsprechenden Domänen von ADAM17 sollte die Bedeutung der jeweiligen Domänen von ADAM10 für das FasL-*Shedding* ermittelt werden. Dazu wurden ADAM10-defiziente Mausfibroblasten mit Wildtyp FasL und den verschiedenen Chimären transfiziert. 18-20 Stunden nach der Transfektion wurden Zellen und Überstand geerntet und die FasL-Menge mittels hFasL-spezifischem ELISA bestimmt. Um Unterschiede in der Transfektionseffizienz des hFasL-Konstrukts auszugleichen, wurde die hFasL *Shedding*-Rate aus dem Verhältnis von löslichem zu Zellpellet-assoziiertem hFasL berechnet. Die Expression der unterschiedlichen chimären Proteasen in den drei voneinander unabhängigen Experimenten, die den *Shedding*-Daten zugrundeliegenden, ist im Immunoblot mittels HA-spezifischem monoklonalem Antikörper kontrolliert worden.

Die Auswertung von drei unabhängig voneinander durchgeföhrten Experimenten ist in Abb. 35 dargestellt. Sowohl die Gesamtauswerfung der ELISA-Analysen als auch die Expression der ADAM10/ADAM17-Chimären ist gezeigt. Zur besseren Vergleichbarkeit der

unterschiedlichen Experimente wurde jeweils die *Shedding*-Rate des Ansatzes als Bezugsgröße verwendet, in dem Wildtyp-ADAM10 mit dem hFasL koexprimiert worden war.



**Abb. 35: Wiederherstellung des konstitutiven FasL *Shedding* in ADAM10-defizienten Mausfibroblasten**

ADAM10-defiziente Mausfibroblasten wurden mit FasL oder FasL zusammen mit den hergestellten ADAM10/ADAM17 Chimären für etwa 18-20 Stunden koexprimiert. Die hFasL *Shedding*-Rate wurde mittels einer ELISA-Quantifizierung des löslichen (IFasL) sowie des Zellpellet-assozierten hFasL-Proteins (ZP-FasL) ermittelt. Mittelwerte wurden aus drei voneinander unabhängigen Experimenten gewonnen. Die jeweilige Expression der Chimären in den drei zugrundeliegenden Experimenten wurde durch Immunoblot Analyse mittels dem gegen den HA-Tag gerichteten monoklonalen Antikörper 3F10 (Roche) nachgewiesen (obere drei Panels). Es zeigte sich nur bei der Koexpression einiger Konstrukte eine Wiederherstellung der hFasL-Freisetzung (siehe Text). Zur leichteren Orientierung ist im Buchstabencode die Transmembrandomäne grau unterlegt.

IFasL = löslicher FasL; ZP-FasL = Zellpellet-assoziierter FasL; HA = Hämagglutinin

Insgesamt wird aus den Untersuchungen deutlich, dass vor allem durch die Koexpression der Konstrukte KKTT und KKK eine signifikante Wiederherstellung des hFasL *Shedding* erreichbar ist. Dennoch konnten auch diese chimären Proteasen, die einen Austausch bzw. eine Deletion der zytoplasmatischen Domäne aufweisen, lediglich etwa 50 Prozent des durch Wildtyp-ADAM10 vermittelten hFasL-*Shedding* erreichen. Des Weiteren konnte eine sehr geringe Wiederherstellung des FasL-*Shedding* durch die Koexpression von hFasL mit den

Konstrukten TKKK, KTTT und KKKT gemessen werden. Die anderen ADAM10/ADAM17-Chimäre zeigten keine deutliche Wiederherstellung des FasL-*Shedding*.

Durch den Vergleich der hFasL-*Shedding*-Aktivität der Konstrukte KKTT und KKKT wird des Weiteren eine mögliche Beteiligung der ADAM10-Transmembrandomäne am hFasL-*Shedding* angedeutet. Während die Koexpression der Chimäre KKTT das hFasL-*Shedding* lediglich in geringem Umfang wiederherzustellen vermochte, führte die zusätzliche Anwesenheit der ADAM10-Transmembrandomäne im Konstrukt KKKT zu einem effizienten hFasL-*Shedding* in ADAM10-defizienten Mausfibroblasten. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der ADAM10-Transmembrandomäne eine kritische Bedeutung im hFasL-*Shedding* zukommt.

Der aus diesen Befunden ableitbaren Hypothese, die zytoplasmatische sowie die Transmembrandomäne könnten einen Beitrag zur Spezifität des hFasL-*Shedding* leisten, wurde weiter nachgegangen, indem untersucht wurde, ob auch die zytoplasmatische Domäne bzw. die Transmembrandomäne des hFasL in gleicher Weise für die Vermittlung eines effizienten FasL notwendig sein könnten. Hierzu wurden verschiedene hFasL-Konstrukte hergestellt. Zum einen wurde die Sequenz für die zytoplasmatische Domäne von hFasL, bzw. die Sequenz für die Aminosäuren 40-80, die die prolinreiche Domäne des hFasL beschreiben, deletiert.

Des Weiteren wurden chimäre Proteine aus hFasL und hTNF- $\alpha$  hergestellt, in denen die zytoplasmatische Domäne bzw. die Transmembrandomäne des hFasL gegen die entsprechende Domäne des humanen hTNF- $\alpha$  ausgetauscht wurde. Mithilfe dieser Mischproteine sollte in erster Linie der Beitrag der Transmembrandomäne des hFasL zur Spezifität des hFasL-*Shedding* untersucht werden.

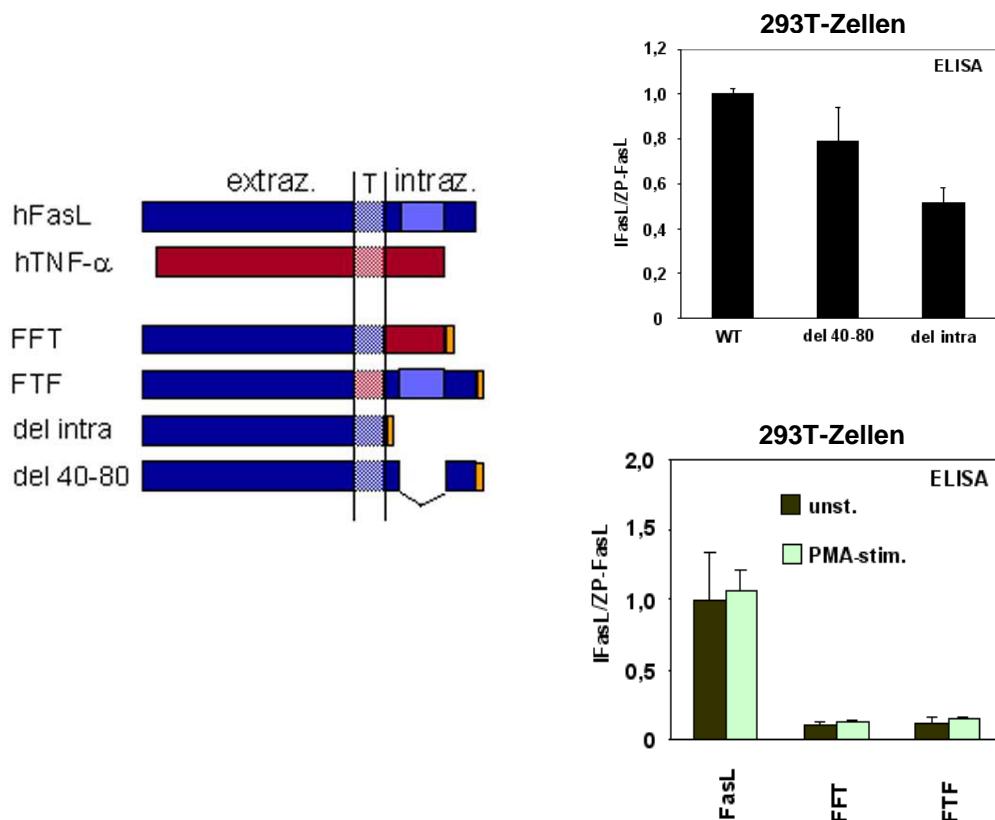
Auch das *Shedding* dieser Konstrukte wurde mittels hFasL-spezifischer ELISA-Analyse nach Expression in 293T-Zellen untersucht.

In Abb. 36a ist zu erkennen, dass eine vollständige Deletion der zytoplasmatischen Domäne des hFasL zu einer Reduktion der hFasL *Shedding*-Rate um etwa 50 Prozent führte. Interessanterweise hatte die Deletion der prolinreichen Domäne lediglich eine schwache Auswirkung auf das hFasL-*Shedding*. Dies deutet auf eine Funktion der Aminosäuren 1-40 der zytoplasmatischen Domäne des hFasL in der Vermittlung eines effektiven hFasL-*Shedding* hin.

Die Analyse des *Shedding*-Verhaltens der hTNF- $\alpha$ /hFasL Chimäre in 293T Zellen ist in Abb. 36b dargestellt. Es zeigt sich eine sehr starke Beeinträchtigung der Freisetzung der löslichen Ektodomäne des hFasL, wenn die zytoplasmatische Domäne oder die

Transmembrandomäne des hFasL gegen die entsprechenden Domänen von hTNF- $\alpha$  ausgetauscht sind. Dies zeigt, dass auch die Transmembrandomäne des hFasL eine Bedeutung für das *Shedding* durch ADAM10 haben könnte. Die Reduktion des *Sheddings* durch den Austausch der zytoplasmatischen Domäne des hFasL gegen die des hTNF- $\alpha$  fiel weit deutlicher aus als die einfache Deletion der zytoplasmatischen Domäne des hFasL.

Für keines der beiden hFasL/hTNF- $\alpha$  Mischproteine konnte ein PMA-stimuliertes *Shedding* ermittelt werden. Dies hätte eventuell erwartet werden können, da der hTNF- $\alpha$  selbst in PMA-stimulierbarer Weise gesheddet wird.



**Abb. 36: ELISA-Analyse des *Shedding* von hFasL-Mutanten mit Deletionen in der zytoplasmatischen Domäne**

(a) Schematische Darstellung der hergestellten hFasL-Konstrukte bzw. die hTNF- $\alpha$ /hFasL Chimäre. Die trunkierte hFasL-Variante (del intra) wurde mittels PCR hergestellt. Die DNA-Konstrukte für del40-80 bzw. für die hFasL/hTNF- $\alpha$ -Chimären wurden mittels Fusions-PCR hergestellt. Für die chimären Konstrukte wurden die für die extrazelluläre, die Transmembran- oder die zytoplasmatische Domäne vom hFasL (blau) bzw. dem hTNF- $\alpha$  (rot) codierenden DNA-Abschnitte gegeneinander ausgetauscht. Alle hergestellten Konstrukte wurden am 3'-Ende mit einer Sequenz, die für einen Myc-Tag codiert, fusioniert (orange dargestellt).

(b) 293T Zellen wurden mit WT-hFasL oder hFasL-Mutanten transfiziert, die eine Deletion der Prolinreichen Domäne (del 40-80) oder eine Deletion der intrazellulären Domäne (del intra) aufweisen. Nach 20 Stunden wurden Zellen und Überstände geerntet. Die *Shedding*-Rate dieser Mutanten wurde mittels hFasL-spezifischer ELISA-Analyse bestimmt.

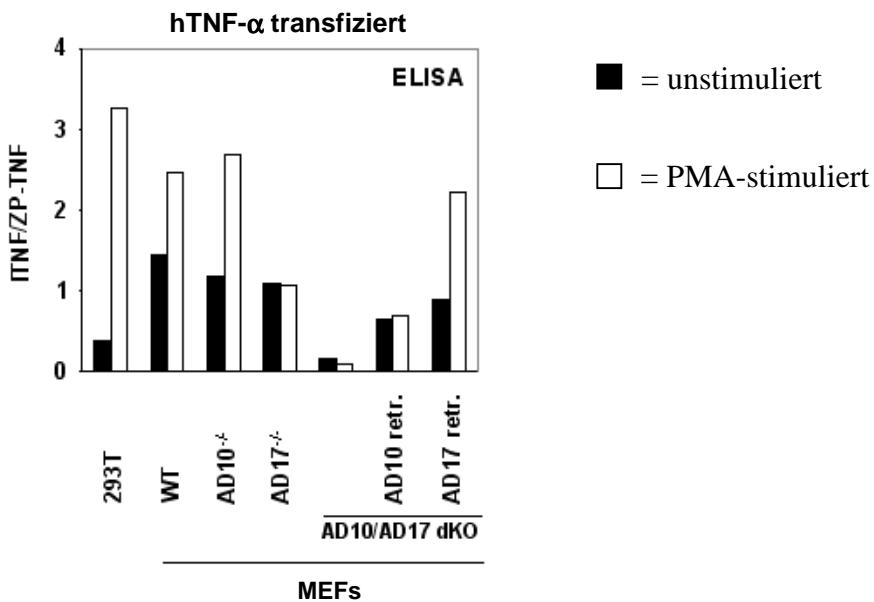
#### 4.2.3 Chimärenanalysen zum humanen TNF- $\alpha$ -Shedding

Nachdem die unterschiedlichen ADAM10/ADAM17-Chimäre auf ihre Fähigkeit getestet wurden, das hFasL-*Shedding* in ADAM10-defizienten Zellen wiederherzustellen, wurde ihre Aktivität gegenüber dem humanen hTNF- $\alpha$  analysiert. Der hTNF- $\alpha$  wird durch ADAM17 konstitutiv und in PMA-stimulierbarer Weise prozessiert. Bisher wurde beschrieben, dass ADAM10 den hTNF- $\alpha$  *in vitro* spalten kann (Rosendahl *et al.*, 1997). Ein ADAM10-vermitteltes *Shedding* konnte in zellbasierten Untersuchungen nicht festgestellt werden (Zheng *et al.*, 2004).

In einem Vorversuch wurde die konstitutive sowie die PMA-stimulierte Freisetzung von löslichem hTNF- $\alpha$  durch Cos7-Zellen, 293T-Zellen, Wildtyp-Mausfibroblasten sowie Mausfibroblasten, die für ADAM10, ADAM17 oder beide Proteasen defizient sind, untersucht.

Wie in Abb. 37 dargestellt, führte eine Defizienz von ADAM17 zu einem vollständigen Verlust des durch PMA stimulierten hTNF- $\alpha$ -*Shedding*s und einer Verminderung der konstitutiven hTNF- $\alpha$ -Freisetzung. Dagegen erscheint in ADAM10-defizienten Zellen das hTNF- $\alpha$ -*Shedding* nicht beeinträchtigt. ADAM10/ADAM17-doppeldefiziente Mausfibroblasten setzen weder konstitutiv noch nach PMA-Stimulation löslichen hTNF- $\alpha$  frei, was die ausschließliche Bedeutung der beiden in diesem System untersuchten ADAM-Proteasen im hTNF- $\alpha$ -*Shedding* unterstreicht.

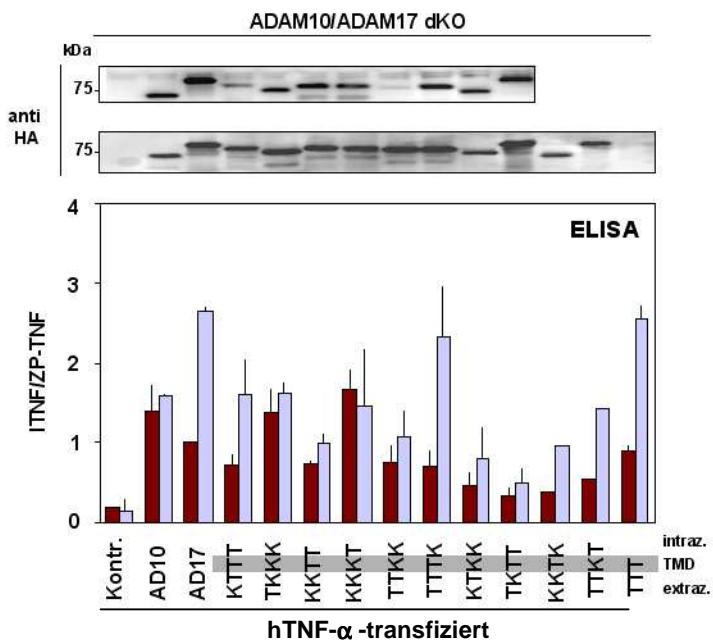
Die Retransfektion von ADAM10 in ADAM10/ADAM17-doppeldefiziente Mausfibroblasten stellte die Fähigkeit zum konstitutiven hTNF- $\alpha$ -*Shedding* wieder her, während durch Retransfektion von ADAM17 beide *Shedding*-Arten, konstitutiv und PMA-stimuliert, wiederhergestellt werden konnte (Abb. 37). Daher konnten mit diesen Zellen die Struktur-Funktionsanalysen zum hTNF- $\alpha$ -*Shedding*, die auf chimären ADAM10/ADAM17-Proteasen beruhen, durchgeführt werden.



**Abb. 37: ELISA-Analyse der hTNF- $\alpha$  Freisetzung in verschiedenen Zellen**

Verlust des konstitutiven und stimulierten hTNF- $\alpha$  -*Sheddings* in ADAM10/ADAM17-doppeldefizienten Mausfibroblasten. 293T-Zellen, Cos7-Zellen sowie verschiedene Mausfibroblasten-Zelllinien (Wildty (WT), ADAM10-, ADAM17- und ADAM10/ADAM17-doppeldefiziente MEFs) wurden mit hTNF- $\alpha$  oder hTNF- $\alpha$  und den verschiedenen ADAM10/ADAM17-Chimären transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Nach weiteren zwei Stunden wurde das Medium wiederum gewechselt und 500ng/ml PMA zugesetzt. Die hTNF- $\alpha$ -Freisetzung über zwei Stunden unter konstitutiven und PMA-stimulierten Bedingungen wurde mittels hTNF- $\alpha$ -spezifischem ELISA ermittelt. Die *Shedding*-Rate ist als Verhältnis von löslichem zu Zellpellet-assoziiertem hTNF- $\alpha$  ausgedrückt (lhTNF- $\alpha$ /ZPhTNF- $\alpha$ ). (b) Retransfektion von ADAM10 und ADAM17 in ADAM10/ADAM17 doppeldefizienten Mausfibroblasten stellt das konstitutive bzw. stimulierte hTNF- $\alpha$  *Shedding* wieder her. In gleicher Weise wie unter a beschrieben wurde mittels hTNF- $\alpha$ -ELISA der Effekt der Retransfektion von ADAM10 oder ADAM17 in ADAM10/ADAM17-doppeldefiziente Mausfibroblasten analysiert. AD10/AD17 dKO = ADAM10/ADAM17-doppeldefizient; retr. = retransfiziert

Zur Struktur-/Funktionsanalyse wurde das hTNF- $\alpha$  alleine oder zusammen mit den chimären Proteasekonstrukten in ADAM10/ADAM17-doppeldefizienten Zellen exprimiert. Etwa 20 Stunden nach der Transfektion wurde das konstitutive sowie das PMA-induzierte hTNF- $\alpha$ -*Shedding* über einen Zeitraum von jeweils 2 Stunden mittels hTNF- $\alpha$ -spezifischem ELISA analysiert. In Abb. 38 ist das Ergebnis von zwei voneinander unabhängigen Experimenten dargestellt.



**Abb. 38: Wiederherstellung des konstitutiven und stimulierten hTNF- $\alpha$ -Shedding in ADAM10/ADAM17-doppeldefizienten Mausfibroblasten**

ADAM10/ADAM17-doppeldefiziente Mausfibroblasten wurden mit hTNF- $\alpha$  oder hTNF- $\alpha$  zusammen mit den hergestellten ADAM10/ADAM17-Chimären für etwa 24 Stunden koexprimiert. Zur Bestimmung der hTNF- $\alpha$  *Shedding*-Rate wurde dann die Freisetzung von löslichem hTNF- $\alpha$  über einen Zeitraum von jeweils zwei Stunden unter konstitutiven oder PMA-stimulierten Bedingungen analysiert. Dazu wurde die Menge an löslichem in Bezug zu Zellpellet-assoziiertem hTNF- $\alpha$  mittels ELISA quantifiziert. Die Analyse ergab, dass nur bestimmte Chimäre das konstitutive und/oder PMA-stimulierte hTNF- $\alpha$ -*Shedding* in den ADAM10/ADAM17-defizienten Mausfibroblasten wiederherstellen konnten (siehe Text). Mittelwerte wurden aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten gewonnen (Versuche mit TTKT und KKTK nur einmal durchgeführt). Die Transmembrandomäne ist im Buchstabencode grau unterlegt.

Die dargestellten Immunoblots (obere zwei Panels) dokumentieren die Expression der ADAM10/ADAM17-Chimäre in den beiden Experimenten, die den gezeigten ELISA-Daten zugrunde liegen.

In den durchgeführten Experimenten zur Wiederherstellung der hTNF- $\alpha$ -Freisetzung in ADAM10/ADAM17-doppeldefizienten Mausfibroblasten wurde die Expression der Chimäre durch Immunoblot-Analyse mittels dem gegen den HA-Tag gerichteten Antikörper 3F10 (Roche) nachgewiesen. Hierbei wird eine vergleichbare Expressionsrate der verschiedenen ADAM10/ADAM17-Chimären in den dargestellten Experimenten deutlich (Abb. 38).

Durch Ermittlung der *Shedding*-Rate in den jeweiligen Versuchsanordnungen wird erkennbar, dass die einzelnen chimären ADAM10/ADAM17 Proteasen in unterschiedlichem Maße fähig waren, das hTNF- $\alpha$ -*Shedding* wiederherzustellen.

Zunächst scheint es für das hTNF- $\alpha$ -*Shedding* unerheblich zu sein, ob die MP-Domäne von ADAM10 oder ADAM17 stammt. Darüber hinaus wird deutlich, dass der Austausch sowie die Deletion der zytoplasmatischen Domäne von ADAM17 keinerlei Auswirkung auf das konstitutive oder PMA-stimulierte *Shedding* von hTNF- $\alpha$  hat.

Differenzierter als im FasL-*Shedding* erscheint die Bedeutung der Transmembrandomäne sowie der Disintegrin-/cysteinreichen Domäne, da hier unterschiedliche Bedeutungen dieser Domänen für das konstitutive bzw. das PMA-stimulierbare *Shedding* zu beobachten sind. So kann durch Koexpression des Konstrukts TTKK, das die Transmembrandomäne von ADAM10 aufweist, lediglich das konstitutive hTNF- $\alpha$ -*Shedding* vermittelt werden. Demgegenüber wurde durch TTTK, in dem lediglich die zytoplasmatische Domäne von ADAM17 gegen die entsprechende Domäne von ADAM10 ausgetauscht ist, der hTNF- $\alpha$  sowohl in konstitutiver als auch in PMA-stimulierter Weise prozessiert. Zusammengenommen zeigt dies, dass durch die Kombination von ADAM17-Transmembrandomäne mit ADAM17-Disintegrin-/cysteinreicher Domäne das PMA-stimulierbare *Shedding* von hTNF- $\alpha$  vermittelt werden könnte.

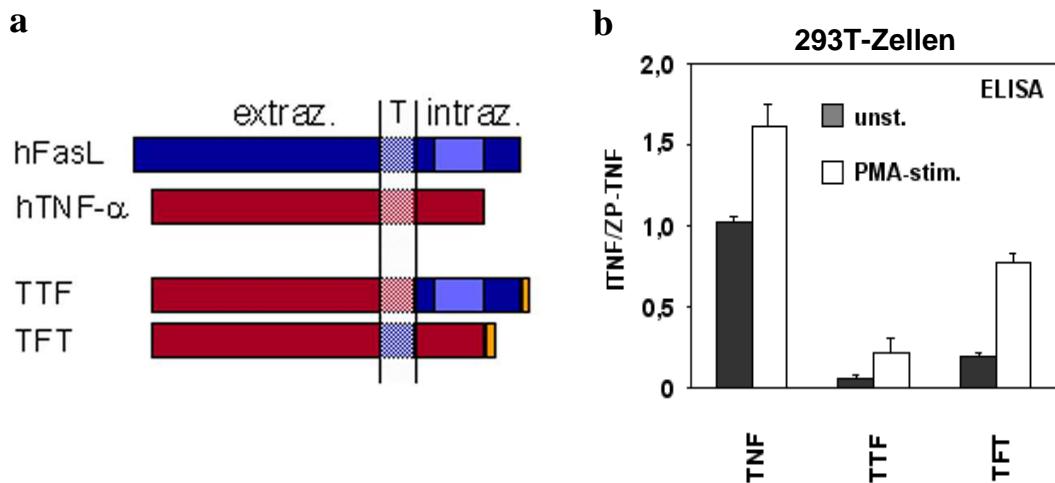
Die Spezifität und Regulation des ADAM10- und ADAM17-vermittelten *Sheddings* von hTNF- $\alpha$  könnte daher teilweise durch die Transmembrandomäne von ADAM17 vermittelt sein. Wie oben beschrieben, kann ADAM17 den hFasL in Mausfibroblasten nicht konstitutiv und lediglich in geringem Ausmaß PMA-stimuliert proteolytisch freisetzen. Daher wurden zur Analyse, ob auch die Transmembrandomäne von hTNF- $\alpha$  sowie dessen zytoplasmatische Domäne zur Regulation des hTNF- $\alpha$ -*Shedding* beitragen, chimäre hTNF- $\alpha$ /hFasL-Konstrukte mittels Fusions-PCR hergestellt. In Abb. 39a sind die N-terminal mit einem myc-Tag fusionierten Konstrukte schematisch dargestellt.

Nach Transfektion in 293T-Zellen wurden die Konstrukte für etwa 24 Stunden exprimiert, wonach das konstitutive sowie das stimulierte *Shedding* über einen Zeitraum von jeweils 2 Stunden mittels hTNF- $\alpha$ -spezifischem ELISA analysiert wurde.

In Abb. 39b ist zu erkennen, dass durch den Austausch der Transmembrandomäne von hTNF- $\alpha$  gegen die des hFasL (TFT) das *Shedding* des hTNF- $\alpha$  stark beeinträchtigt wird. Dabei sind sowohl das PMA-stimulierte als auch das konstitutive *Shedding* betroffen, welches um etwa 75% bzw. 50% zurückgeht.

Das Konstrukt TTF, in dem die zytoplasmatische Domäne von hTNF- $\alpha$  gegen die zytoplasmatische Domäne des hFasL ausgetauscht ist, wurde durch 293T-Zellen allerdings kaum noch, weder konstitutiv noch PMA-stimuliert, proteolytisch in den Überstand freigesetzt. Dies könnte darauf hindeuten, dass auch der zytoplasmatische Domäne von

hTNF- $\alpha$  eine Funktion in der Vermittlung der Spezifität und eventuell auch der Regulation des hTNF- $\alpha$ -*Shedding* zukommt.



**Abb. 39: Analyse des *Shedding* von chimären hFasL/ hTNF- $\alpha$ - Proteinen durch 293T-Zellen**

293T-Zellen wurden mit Wildtyp-FasL, Wildtyp-hTNF- $\alpha$  oder den chimären hTNF- $\alpha$ /FasL-Konstrukten transfiziert. Durch Quantifizierung der Zellpellet-assozierten bzw. löslichen Moleküle mittels gegen die jeweiligen Ektodomänen gerichtete ELISAs wurde die jeweilige *Shedding*-Rate bestimmt. Dabei wurde sowohl das konstitutive als auch das PMA-induzierte *Shedding* über einen Zeitraum von 2 Stunden verfolgt. Auf diese Weise konnte der unterschiedliche Einfluss der Domänenzusammensetzung auf die Freisetzung der Ektodomänen verfolgt werden (Details siehe Text).

## 5 Diskussion

### 5.1 Charakterisierung des *Shedding* des humanen Fas Liganden

Der Fas Ligand (FasL) ist durch sein Potential, in Fas-tragenden Zellen Apoptose auszulösen, von entscheidender Bedeutung in einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen.

Seit längerem ist bekannt, dass der FasL durch Metalloproteasen prozessiert wird (Kayagaki *et al.*, 1995). Obwohl die apoptotische Aktivität des löslichen FasL seitdem nicht sicher geklärt werden konnte, hat sich herausgestellt, dass eine proteolytische Abspaltung des FasL von der Zelloberfläche mit dem Fas/FasL-System interferiert (Ethell *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 1998). Dabei wird die Abspaltung des FasL von der Zelloberfläche in erster Linie als Mechanismus angesehen, der zur Herunterregulation der zellulären FasL-Zytotoxizität beiträgt.

Das Serumlevel von löslichem FasL ist positiv korreliert mit der asymptomatischen Phase einer HIV-Infektion (Hosaka *et al.*, 1998), Rheumatoider Arthritis (Nozawa *et al.*, 1997), Leukämie (Tanaka *et al.*, 1996), Myokarditis (Toyozaki *et al.*, 1998) sowie einer Reihe von malignen Krebserkrankungen (unter anderem: Kaizu *et al.*, 2004, Tanaka *et al.*, 1996, Sato *et al.*, 1996, Owen-Schaub *et al.*, 2000). Dennoch konnte die FasL-prozessierende Protease bisher nur in speziellen Zelltypen identifiziert werden (Matsuno *et al.*, 2001; Mitsiades *et al.*, 2001; Powell *et al.*, 1999; Vargo-Gogola *et al.*, 2002b). In diesen Studien wurden, hauptsächlich durch *in vitro* Analysen, Mitglieder der Matrix-Metalloproteasen identifiziert. Da jedoch verschiedene TIMPs (tissue inhibitors of Metalloproteases) keinen Effekt auf das FasL *Shedding* zeigten, wurde ein Mitglied der ADAM-Familie als möglicherweise entscheidende Protease diskutiert (Ethell *et al.*, 2002).

### **5.1.1 Prozessierung potentieller Spaltungsmutanten des humanen Fas-Liganden in verschiedenen Zelltypen**

In dieser Arbeit sollten die molekularen Aspekte der Freisetzung des löslichen FasL analysiert und die FasL-spaltende Protease für relevante Zelltypen identifiziert werden.

Durch Immunoblot-Analyse mit dem Antikörper Ab3, der ein intrazelluläres Epitop des humanen FasL (hFasL) erkennt, konnte das Prozessierungsmuster des hFasL analysiert werden. Dieser Antikörper detektiert neben dem Vollängenprotein vier N-terminale Spaltfragmente des hFasL.

Allerdings wird durch den Antikörper G247-4, der die Ektodomäne des hFasL erkennt, lediglich eine Bande bei ca. 28 kDa nachgewiesen, die den löslichen hFasL repräsentiert. Dies spricht dafür, dass der membrangebundene hFasL an nur einer Spaltstelle prozessiert wird. Die drei übrigen durch den Antikörper Ab3 detektierten Banden könnten gleichermaßen mit einer weiteren proteolytischen Degradierung des initialen N-terminalen Fragments (NTF1) oder auch einer unterschiedlichen posttranslationalen Modifikation ein und desselben N-terminalen Fragments erklärbar sein. Durch das Vorhandensein einer Phosphorylierungsstelle für eine Casein-Kinase am N-Terminus der zytoplasmatischen Domäne des hFasL wäre in diesem Zusammenhang eine Phosphorylierung möglich. Allerdings führte hier eine ausgedehnte Inkubation der Zelllysate mit Alkalischer Phosphatase auch nach mehreren Stunden zu keiner Veränderung im Bandenmuster der N-terminalen Fragmente (Daten nicht gezeigt). Dies stimmt mit der in einer anderen Arbeit veröffentlichten Beobachtung überein, in der keine Phosphorylierung von hFasL nach Überexpression in 293T-Zellen oder Cos7-Zellen detektiert werden konnte (Baum *et al.*, 2005). Daher ist eine weitere sequentielle proteolytischen Prozessierung des initialen N-terminalen Fragments anzunehmen (siehe unten).

Auch durch die Verwendung eines hFasL-spezifischen ELISA-Systems konnte die FasL-Prozessierung unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen detailliert analysiert werden. Daneben mussten zunächst auch die verwendeten Zellsysteme auf ihre Vergleichbarkeit bei der FasL-Prozessierung untersucht werden.

Die Analysen von Schnittstellenmutanten zeigen die Theorie zu widerlegen, dass der hFasL durch Mauszellen und humane Zellen an unterschiedlichen Stellen geschnitten wird (Schneider *et al.*, 1998). Die Spaltungsmutante S126E/L127E, die durch Schneider *et al.*, in humanen Zellen als nicht spaltbar beschrieben worden ist, eine reduzierte *Shedding*-Rate in humanen als auch murinen Zellen. Für eine durch Tanaka *et al.* 1998 als ebenfalls nicht

spaltbar beschriebene Deletionsmutante (del128-131) wurde dagegen in dieser Arbeit eine normale, mit dem Wildtyp hFasL vergleichbare *Shedding*-Rate ermittelt.

So konnte zunächst geklärt werden, dass der hFasL in murinen und humanen Zellen in vergleichbarer Weise, wahrscheinlich zwischen den Aminosäuren 126 und 127, prozessiert wird. Dies könnte auf die Spaltung des FasL durch eine homologe, hochkonservierte Metalloprotease hinweisen. Die Adamalysin-Metalloprotease ADAM10 wurde im Verlauf dieser Arbeit als die Protease identifiziert, die die Generierung des löslichen FasL sowohl in murinen als auch humanen Zellen in kritischer Weise vermittelt. ADAM10 zeigt mit einer Sequenzhomologie von 96 Prozent auf der Ebene der Aminosäuren zwischen der murinen und der humanen Form eine sehr starke Konservierung. Dies spricht zusätzlich dafür, dass in Zellen aus verschiedenen Säugerorganismen der FasL in gleicher Weise prozessiert wird.

### 5.1.2 Identifizierung von ADAM10 als Fas Ligand spaltende Protease

Im Verlauf dieser Arbeit konnten durch verschiedene methodische Ansätze ADAM10 sowohl in murinen als auch humanen Zellen als FasL-prozessierende Protease identifiziert werden. Auch und im Besonderen konnte eine kritische Funktion von ADAM10 bei der Freisetzung von löslichem FasL durch Lymphocyten, die den Fas-Liganden endogen exprimieren, nachgewiesen werden.

Metalloprotease-Inhibitoren zeigten eine starke inhibitorische Wirkung auf das FasL-*Shedding* in hFasL-transfizierten 293T-Zellen und auch primären T-Lymphozyten. Dies konnte sowohl durch eine ELISA-Analyse als auch durch Immunoblot-Analysen mit dem Antikörper Ab3 gezeigt werden. Da auch der preferentielle ADAM10-Inhibitor GI254023 die Generierung von löslichem hFasL einschränken konnte, wurde durch diese Experimente ein Hinweis auf ADAM10 als FasL *Sheddase* gewonnen.

Analog zu der Inhibition des *Sheddings* von humanem TNF-a (hTNF-a) bei Koexpression einer dominant-negativen Mutante von ADAM17 (Itai *et al.*, 2001; Solomon *et al.*, 1999) konnte dominant-negatives ADAM10, das in 293T-Zellen mit dem hFasL koexprimiert wurde, die Freisetzung von löslichem hFasL hemmen. Der zugrundeliegende Mechanismus ist hierbei unklar; eine inhibitorisch wirkende Interaktion der ADAM10-Mutante sowohl mit endogener Protease als auch mit dem Fas Liganden könnte zur Reduktion des FasL *Shedding* führen.

Eine Interaktion des hFasL mit Wildtyp-ADAM10 oder der dominant-negativen ADAM10-Mutante konnte mittels Koimmunpräzipitation nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Dennoch kann durch direkte und transiente Interaktion von ADAM10 mit dem FasL dessen Spaltung erreicht werden. Dies konnte durch *in vitro* Spaltungsexperimente, in denen rekombinantes ADAM10 mit der rekombinanten Ektodomäne des hFasL koinkubiert wurde, gezeigt werden. Dabei treten nach 14 Stunden Koinkubation zwei Spaltfragmente auf. Dies ist auch in Übereinstimmung mit den pharmakologischen Untersuchungen, in denen im Zellbasierten System Protease-Inhibitoren zu hFasL-transfizierten 293T-Zellen gegeben wurden. Die Intensität der durch Immunoblot-Analyse detektierten Banden der N-terminalen Spaltfragmente wurde hier durch Metallorotease-Inhibitoren reduziert. Die Zugabe des preferentiellen ADAM10-Inhibitors GI254023 führte dabei zu einem nahezu vollständigen Verlust aller vier Banden. Daher wurde angenommen, dass ADAM10 den hFasL an verschiedenen Stellen schneidet. Es liegt nahe, dass es sich um eine sequentielle Prozessierung handelt, da für den löslichen hFasL nur eine Bande detektiert werden konnte. Die herausragende Bedeutung von ADAM10 für das FasL *Shedding* wird besonders in Experimenten deutlich, in denen genetisch definierte Zelllinien von Mausfibroblasten Verwendung finden, die für jeweils eine bestimmte ADAM-Protease defizient sind. Lediglich Zellen, in denen ADAM10 ausgeschaltet ist, geben keinerlei löslichen Fas-Ligand in den Zellkulturüberstand ab. Eine Retransfektion von ADAM10 cDNA, nicht aber von ADAM17, stellt auch die Fähigkeit der Zellen wieder her, löslichen Fas-Ligand freizusetzen. Dies beweist die entscheidende Bedeutung von ADAM10 in der Freisetzung von löslichem FasL. Weder die Deletion von ADAM17 noch von ADAM9 oder ADAM15 reduzieren die Menge an löslichem FasL. Im Falle von ADAM9- und ADAM15-defizienten Zellen erscheint die *Shedding*-Rate sogar noch heraufgesetzt. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnten Untersuchungen von Cisse *et al.* liefern: Sie zeigten eine Beeinflussung der Prozessierung des Prion-Proteins durch ADAM10 bei Überexpression von ADAM9 (Cisse *et al.*, 2005). Hier wird, im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erhaltenen Befunden, dessen *Shedding*-Rate heraufgesetzt. Der Grund hierfür liegt in der Beobachtung, dass durch ADAM9-Expression im verstärkten Maße ADAM10 geschreddert wird, und diese lösliche Form von ADAM10 das ebenfalls lösliche Prion-Protein spalten kann. Für die Prozessierung von membrangebundenem TNF- $\alpha$  muss ADAM17 auch membrangebunden vorliegen, die Expression der löslichen Form hat wahrscheinlich keine Bedeutung für das TNF- $\alpha$ -*Shedding* (Itai *et al.*, 2001; und Reddy *et al.*, 2000). Dies ist in Analogie mit in dieser Arbeit gewonnenen Daten aus Experimenten, in denen die Koexpression des FasL zusammen mit einer löslichen

Form von ADAM10 nicht zur Generierung von löslichem hFasL führte (nicht gezeigt). Im *in vitro* Spaltungsexperiment mit rekombinanten Proteinen konnte lösliches ADAM10 den rekombinanten hFasL spalten. Allerdings war selbst nach 14 Stunden Koinkubation nur ein kleiner Teil des hFasL gespalten, was darauf hindeutet, dass im zellulären System mit membrangebundenem Enzym/Substrat-Paar eine weit schnellere Spaltungskinetik vermittelt wird. Daher kann angenommen werden, dass eine verringerte Abspaltung von ADAM10 in ADAM9-defizienten Zellen gegeben ist, und daher mehr ADAM10 für die Prozessierung von FasL zur Verfügung steht. Diese Annahme wird durch Untersuchungen gestützt, die eine proteolytische Prozessierung von ADAM10 durch die Aktivität von ADAM9 und ADAM15 beschreibt (Dieter Hartmann, Karina Reiss, Paul Saftig; persönliche Mitteilung).

### 5.1.3 ADAM10 vermittelt die Freisetzung von löslichem Fas Ligand in T-Zellen

Endogen wird der FasL von NK-Zellen (*natural killer cells*) (Bossi *et al.*, 1999), Monozyten (Kiener *et al.*, 1997) sowie verschiedenen Krebszellen exprimiert. Im physiologischen Kontext von besonderer Bedeutung ist die FasL-Expression allerdings in aktivierten T-Zellen. Hier wird der FasL sowohl von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Th1-Zellen) als auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) exprimiert.

Es konnte durch Elektroporation primärer T-Lymphozyten mit ADAM10 spezifischen siRNA-Oligonukleotiden die ADAM10-Expression stark herunterreguliert werden. Die so behandelten Zellen zeigten nach Restimulation ein verminderteres hFasL-*Shedding*. Somit konnte die essentielle Bedeutung von ADAM10 dieser Protease in der Freisetzung von löslichem hFasL aus T-Zellen nachgewiesen werden.

Genauere kinetische Untersuchungen der FasL Prozessierung in einer klonalen CD4<sup>+</sup>-T-Zelllinie bauten auf veröffentlichten Untersuchungen von Lettau *et al.*, (2004) auf. Dort wird erstmals eine biphasische Oberflächenexpression des Fas-Liganden auf verschiedenen T- und NK-Zellen beschrieben. Unter Umgehung des T-Zell-Rezeptors mit PMA und Ionomycin restimulierte Zellen zeigen bereits nach wenigen Minuten eine starke Zunahme der FasL Oberflächenexpression, wie mittels durchflusszytometrischer Analysen bestimmt werden konnte. Nach der Abnahme dieses hohen FasL-Levels folgt ab ca. 40-60 Minuten wieder ein Anstieg der FasL-Oberflächenexpression, die in einem zweiten Maximum mündet. Dies wird

nach etwa 120 Minuten erreicht, wiederum gefolgt von einer Reduktion der FasL-Oberflächenmenge.

Die zugrundeliegenden Mechanismen dieses Expressionsmusters wurden durch Lettau *et al.* mithilfe von pharmakologischen Substanzen untersucht, die in den intrazellulären Vesikeltransport und in die Proteinbiosynthese eingreifen (Lettau *et al.*, 2004). Dadurch konnte dem ersten Maximum eine Abhängigkeit von der Aktinpolymerisation und somit von oben beschriebenen Degranulationsprozessen nachgewiesen werden. Diese Prozesse sind durch Zugabe von Cytochalasin D und Latrunculin A inhibierbar. Zur Ausbildung des zweiten Maximums wird dagegen eine intakte Proteinsynthese-Maschinerie und der unbeeinträchtigte Proteintransport vom Endoplasmatischen Reticulum zum Golgi-Apparat benötigt, wie durch Inhibition dieser Prozesse mit Cycloheximid bzw. Brefeldin A gezeigt werden konnte. Neben Degranulationsprozessen scheint zur Ausbildung dieses zweiten Maximums auch der direkte Transport zur Zelloberfläche eine Rolle zu spielen. Der neu synthetisierte FasL vermittelt zusammen mit den anderen zytotoxisch Effektorproteinen die Eliminierung benachbarter Zellen (*bystander killing*) (Isaaz, *et al.*, 1995). Diese zeitliche und räumliche FasL-Expressionskontrolle könnte zur selektiven Ausschaltung bestimmter Zelltypen beitragen.

In enger Kooperation mit Marcus Lettau (AG Jannssen, Immunologie, CAU Kiel) wurde in dieser Arbeit der Effekt von Metalloprotease-Inhibitoren auf die biphasische FasL-Oberflächenexpression analysiert. Durch Zugabe von Metalloprotease-Inhibitoren, auch des preferentiellen ADAM10-Inhibitors GI254023, wurde eine Stabilisierung beider Maxima der FasL-Oberflächenexpression erreicht. Besonders in der zweiten Phase der Oberflächenexpression wurde dieser stabilisierende Effekt deutlich.

Zu einem hiermit übereinstimmenden Ergebnis führten auch die Immunoblot- und ELISA-Analysen von aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach PMA/Ionomycin-Stimulation. Der Inhibitor GI254023 verringerte hier, analog zur erhöhten Oberflächenexpression, die Freisetzung von löslichem FasL. Dies deutete darauf hin, dass die Ausbildung beider Maxima der FasL Oberflächenexpression in T-Zellen durch die Aktivität von ADAM10 herunterreguliert wird. Somit besitzt ADAM10 eine wichtige regulatorische Funktion in der FasL-Oberflächenexpression in restimulierten T-Lymphocyten.

Obwohl keine detaillierten Untersuchungen zur Stabilität der N-terminalen Fragmenten durchgeführt wurden, deutete sich an, dass diese relativ schnell abgebaut werden: bereits nach 20 Minuten waren die N-terminalen Fragmente, verhinderte man durch Zugabe von GI254023 in die T-Zellkultur deren Neubildung, nicht mehr im Immunoblot detektierbar. Außerdem

wurde hier deutlich, dass der hFasL auch in nicht mit PMA und Ionomycin restimulierten T-Zellen gescheddet wird. Hier könnte es sich sowohl um die Aktivität einiger aktivierter Zellen als auch um konstitutives FasL *Shedding* handeln. Eine tiefergehende Analyse dieses basalen FasL *Sheddings* in der T-Zellkultur wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Regulierte Intramembran-Proteolyse (RIPing) ist für eine Reihe von Typ I-Transmembranproteinen als grundlegend für Signaltransduktionsprozesse, in denen die freigesetzte intrazelluläre Domäne eine genregulatorische Funktion erfüllt, beschrieben (de Strooper, 1999). So transloziert die intrazelluläre Domäne von Notch nach sequentieller Spaltung durch ADAM-Proteasen und Presenilin in den Zellkern, wodurch ein genregulatorisches Signal erreicht wird (Struhl *et al.*, 1999). Neuere Untersuchungen legen nahe, dass auch TypII-Transmembranmoleküle einer sequentiellen regulierten Proteolyse durch die Aktivität von Signalpeptid Peptidasen (SPPs) unterliegen könnten (Mortoglio *et al.*, 2003). Als erstes Molekül, das aufgrund der Prozessierung durch ein Mitglied der SPPL-Protease-Familie (SPP-like proteases) ein reverses Signaling vermittelt, wurde TNF-a identifiziert (Fluhrer *et al.*, 2006; Friedmann *et al.*, 2006).

Dem hFasL wird auch eine Bedeutung als kostimulatorisches Molekül, das die Proliferation von T-Zellen unterstützt, zugeschrieben (Sun *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2000, Desbarats *et al.*, 1998). Hierfür kommt der zytoplasmatischen Domäne eine entscheidende und hinreichende Bedeutung zu (Sun *et al.*, 2006). Kirkin *et al.* zeigen, dass ADAM10-prozessiertes N-terminales hFasL-Spaltfragment von der Signal-Peptid-Peptidase SPPL2a geschnitten wird (Kirkin *et al.*, 2007). Dort ist beschrieben, dass dieser innerhalb der Plasmamembran lokalisierte Schnitt zur Freisetzung der intrazellulären Domäne des hFasL führt. Eine nachfolgende Lokalisation der intrazellulären Domäne in den Nukleus, die die Voraussetzung zur Beeinflussung der Genexpression darstellt, konnte gezeigt werden. Eigene Experimente, die unter Verwendung von 293T-Zellen, die stabil verschiedene SPPL-Proteasen überexprimieren, durchgeführt wurden, deuteten ebenfalls auf eine Prozessierung des hFasL durch SPPL2a hin. Allerdings wurden diese Befunde aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit sowie der Unwirksamkeit des SPP-Inhibitors (Z-LL)<sub>2</sub>-Keton auf ein möglicherweise durch die Aktivität von SPPL2a generiertes N-terminale Fragment in den entsprechenden 293T-Transfektanden nicht weiterverfolgt.

Die physiologische Relevanz der experimentellen Befunde in Kirkin *et al.* ist unklar, da sich die intrazelluläre Domäne in den dort gezeigten Experimenten als sehr instabil erweist, und sie lediglich unter Inhibierung des proteasomalen Abbaus mittels Lactacystein im

Immunoblot nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus wurden durch Kikin *et al.* keine Zielgene dieses potentiellen reversen Signalweges des FasL beschrieben.

Dennoch könnte die FasL-Prozessierung durch ADAM10 einen entscheidenden Schritt im retrograden FasL-Signaling darstellen. Es wäre in diesem Zusammenhang denkbar, dass nicht das NTF1, sondern ein durch ADAM10 degradiertes Produkt des NTF1 das Substrat für SPPL2a darstellt, so dass hierdurch eine zeitliche Verzögerung des reversen FasL-Signals erreicht werden könnte. Zur Analyse dieser Hypothese wären genauere kinetische Untersuchungen der FasL-Degradierung, zum Beispiel mittels *pulse-chase* Experimenten, nötig.

## 5.2 Physiologische Relevanz des ADAM10-vermittelten Fas Ligand Sheddings

In der Literatur ist beschrieben, dass eine Metalloprotease-vermittelte Abspaltung des membrangebundenen Fas Liganden in einer Herunterregulation der zytotoxischen Aktivität der FasL-tragenden Zelle resultiert (Schneider *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang wurden Zytotoxizitätsexperimente mit FasL-exprimierenden Lymphoblastoma Zellen (K562) und Chromium<sup>51</sup>-markierten FasL-sensitiven Jurkatzellen durchgeführt. Der Zusatz von Metalloprotease-Inhibitoren in Kokultur-Ansätze resultierte in einer verstärkten Lyserate der Jurkat-Zielzellen. Dabei hatte auch der ADAM10-spezifische Metalloprotease-Inhibitor GI254023 einen signifikanten Effekt.

Es sind eine Reihe von FasL-exprimierenden Tumorzelllinien beschrieben. Nach dem sog. „tumor-counterattack“-Modell entziehen sich solche Tumore durch Eliminierung infiltrierender T-Zellen dem Zugriff des Immunsystems, indem sie in den Fas-sensitiven T-Zellen Apoptose auslösen. Damit verschaffen sie sich, ähnlich dem Hodengewebzellen oder der Cornea (Ferguson *et al.*, 2002) unter zu Hilfenahme des Fas/FasL-Systems einen immunprivilegierten Status. Eine Herunterregulation der ADAM10-Aktivität in FasL-exprimierenden Tumorzellen würde deren Zytotoxizität gegenüber T-Zellen steigern.

Inwieweit ein solcher Mechanismus in Tumorzellen, aber auch bei der Homöostase von immunprivilegiertem Gewebe, gegeben ist, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Darüber hinaus ist in diesem Zusammenhang ein weiterer interessanter Mechanismus beschrieben, durch den sich Tumore in Fas/FasL-System abhängiger Weise dem Immunsystem entziehen könnten. So zeigen Untersuchungen von Hallermalm *et al.* (2004),

dass gerade die Bindung von löslichem, autokrin sekretiertem FasL an den FasR der Tumorzellen diese vor der FasL-vermittelten Zytotoxizität der T-Zellen schützt. Nach diesem Modell würde gerade ein erhöhtes FasL *Shedding* das Überleben der Tumore fördern.

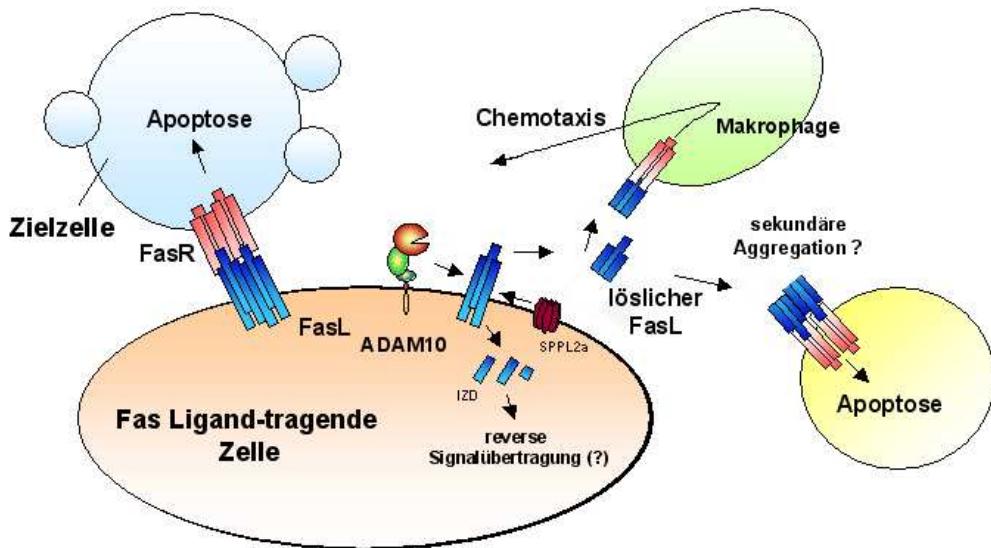
Auf diese beiden Mechanismen wurde in dieser Arbeit in experimenteller Weise in begrenztem Umfang eingegangen, indem die zytotoxische Aktivität des löslichen FasL analysiert wurde. Hierzu sind in der Literatur unterschiedliche Angaben zu finden: Insgesamt ist ein Modell akzeptiert, in dem der lösliche FasL gegenüber der membrangebundenen Form eine geringere Zytotoxizität aufweist, und der lösliche FasL antiapoptotisch wirken kann. Interessanterweise könnte eine sekundäre Aggregation des löslichen FasL zu dessen Aktivität beitragen: Der lösliche FasL bindet *als* Trimer an seinen Rezeptor, weist aber in der hexameren Form eine erhöhte apoptotische Aktivität auf (Schneider *et al.*, 1998, Holler *et al.*, 2003). Darüber hinaus scheint die Aktivität eine Abhängigkeiten von Mikroumgebung, Spaltstelle oder der Konzentration aufzuweisen (Hohlbaum *et al.*, 2000, Vargo-Gogola *et al.*, b).

In dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen mit ultrazentrifugierten Zellkulturüberständen ergaben eine zytotoxische Aktivität der ausschließlich durch ADAM10 prozessierten, löslichen hFasL-Form. Eine genauere Titration der Konzentrationsabhängigkeit der apoptotischen und möglicherweise antiapoptotischen Aktivität ging aber über die Zielsetzung dieser Arbeit hinaus.

Durch die Restimulation von aktivierten T-Zellen über den T-Zellrezeptor/CD3-Komplex wird neben der FasL-Expression auch die Expression von Fas gesteigert (Klas *et al.*, 1993). Durch Bindung des FasL wird dann in diesen Zellen im Rahmen des sogenannten Aktivierungs-induzierten Zelltods (AICD) Apoptose ausgelöst. Dieser Prozess kann sowohl in autokriner als auch parakriner Weise angestoßen werden (Suizid/Fratrizid) (Nagata *et al.*, 1995; Brunner *et al.*, 1995; Dhein *et al.*, 1995, Scott, D. W. *et al.*, 1996). Auf diese Weise trägt das Fas/FasL-System in grundlegender Weise zur Beendigung einer Immunantwort und damit zu T-Zell Homöostase bei. Da eine verstärkte FasL-Oberflächenexpression das zytotoxische Potential der Zelle erhöht, könnte eine Zugabe von Metalloprotease-Inhibitoren Auswirkungen auf den Aktivierungs-induzierten Zelltod haben.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden *in vitro* kultivierte, aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit bakteriellem Superantigen restimuliert, wobei in Gegenwart von MP-Inhibitoren die FasL-Oberflächenexpression gesteigert werden konnte. Damit korrelierend nahm in diesen Ansätzen der Anteil an toten Zellen zu, wobei auch der ADAM10-Inhibitor GI einen

deutlichen Effekt zeigte. Daraus kann geschlossen werden, dass die FasL-prozessierende Aktivität von ADAM10 eine Einfluss auf den Aktivierungs-induzierten Zelltod ausüben kann.



**Abb. 40: Die physiologische Bedeutung des Fas Ligand-Shedding**

Löslicher Fas Ligand kann unter bestimmten Umständen Apoptose auslösen und wirkt chemotaktisch auf Makrophagen. Der membrangebundene Fas Ligand weist eine höhere apoptotische Aktivität gegenüber Zielzellen auf als der lösliche Fas Ligand. Daher wird durch die Aktivität von ADAM10 die Zytotoxizität des Fas Liganden herunterreguliert.

Darüber hinaus könnte die Fas Ligand-Prozessierung durch ADAM10 den initialen Schritt für eine reverse Signalübertragung durch die intrazelluläre Domäne sein (IZD) darstellen.

## 5.3 Regulatorische Aspekte des Fas Ligand-Shedding

In dieser Arbeit konnte die besondere Bedeutung von ADAM10 bei der Regulation des FasL-Ektodomänen-*Shedding* und der daraus resultierenden Beeinflussung der Zytotoxizität der FasL-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Daran anschließend wurden Experimente durchgeführt, die zum Verständnis der molekularen Mechanismen beitragen sollten, die der Regulation sowie der Spezifität des ADAM10-vermittelten FasL-*Shedding* zugrunde liegen.

### 5.3.1 Untersuchung zur Endozytose des humanen Fas Liganden

Zunächst wurde der Frage nach dem Verbleib von nicht abgespaltenem FasL bei Inhibition seines *Shedding* durch Metalloprotease-Inhibitoren nachgegangen: Zwar kann, wie bisher

durch eine Reihe von Experimenten gezeigt wurde, die FasL-Oberflächenexpression durch Zugabe von Metalloprotease-Inhibitoren deutlich gesteigert werden. In einer Reihe von Experimenten wurde jedoch auffällig, dass die absolute zusätzliche FasL Menge, die bei reduziertem FasL-*Shedding* mit dem Zellpellet assoziiert bleibt, bei weitem nicht der Menge entspricht, die unter normalen Zellkulturbedingungen in den Zellkulturüberstand abgegeben worden wäre. Dies wird besonders nach der Quantifizierung durch den hFasL-spezifischen ELISA deutlich. Doch auch die Intensität der das Vollängenprotein repräsentierenden Bande in der Immunoblot-Analyse nimmt bei Inhibition des FasL-*Shedding*s nicht in signifikanter Weise zu.

Untersuchungen von Nuygen *et al.* deuten an, dass Endozytoseprozesse zur Degradation des hFasL beitragen könnten. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob nicht abgespaltener FasL endozytiert wird. Dies würde die Voraussetzung für eine lysosomale Degradation des FasL bilden, die den anscheinenden Verlust an Zellpellet-assoziertem hFasL nach Inhibition des *Shedding*s erklären könnte.

Die meisten der beschriebenen Endozytoseprozesse sind abhängig von der GTPase Dynamin-2 (McNiven *et al.*, 1998; Henley, *et al.*, 1998), welche die Abschnürung von (endozytotischen) Vesikeln vermittelt.

Da einige der mit FasL interagierenden Proteine, so CIP4, FBP17 und PACSIN1-3 (persönliche Mitteilung Marcus Lettau) mit Dynamin interagieren (Itho 2005, Tsujita 2006, Kessels und Qualmann, 2004, Modregger *et al.*, 2000), wäre eine Anbindung der FasL-Expressionsregulation an die Dynamin-abhängige Endozytose denkbar.

Die Überexpression einer dominant-negativen Dynamin-2 Mutante blockiert Clathrin- und viele *Lipid Raft*- abhängige Endozytosewege (Lajoie *et al.*, 2007 und Referenzen darin). Durch Koexpression dieser Dynamin-Mutante mit dem hFasL in 293T-Zellen konnte jedoch keine Beeinflussung des FasL-*Shedding*s erreicht werden. Allerdings sind für einige Proteine auch Dynamin-2 unabhängige endozytotische Prozesse beschrieben worden (Damm *et al.*, 2005; Kirkham *et al.*, 2005). Daher kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass der FasL bei Inhibition seines *Shedding*s in Dynamin-2 unabhängiger Weise endozytiert wird. Hier wäre ein Zusammenhang mit der *Lipid Raft*-abhängigen, Dynamin-unabhängigen Endozytose (Nichols *et al.*, 2003) denkbar.

Ebenfalls ist zu bedenken, dass der FasL in T-Zellen aufgrund eines spezialisierten Sets an Adapterproteinen andersgearteten endozytotischen Transportprozessen unterworfen sein könnte als in nicht-hämatopoetischen Zellen.

### 5.3.2 Besteht ein Zusammenhang zwischen Rezeptorbindung und Fas Ligand-Shedding ?

Der Notch Rezeptor muss, um effizient von der Zelloberfläche abgespalten zu werden, an seinen Liganden Delta binden (Schroeter *et al.*, 1998). Einige Befunde während der Analyse der proteolytischen Prozessierung der apoptotisch inaktiven hFasL-Mutante F275L, deuteten darauf hin, dass der FasL-Proteolyse einem ähnlichen Mechanismus zugrunde liegen könnte: In Immunoblot-Analysen von hFasL-Mutanten, die aufgrund definierter Punktmutationen nicht mehr oder stark eingeschränkt an den FasR binden (Schneider *et al.*, 1997), wurden eine starke Reduktion der N-terminalen Spaltfragmente gefunden. Interessanterweise korrelierte dabei die Intensität dieser Banden mit der Fähigkeit zur Rezeptorbindung: Die hFasL-Mutante F275L bindet nicht mehr an den Rezeptor und zeigt einen nahezu vollständigen Verlust der N-terminalen Fragmente. Die hFasL-Mutante P206D, die noch eine schwache Rezeptorbindung besitzt, zeigt auch noch schwache Signale für die N-terminalen Spaltfragmente im Immunoblot. Ebenso führte die Anbringung eines HA-Tags oder eines Alkalische Phosphatase-Tags an den C-Terminus des hFasL zu einem Verlust der Apoptose-Induktion (Daten nicht gezeigt) und vermindert die Bandenintensität der N-terminalen Spaltfragmente.

Allerdings konnten für ein über die Rezeptorbindung vermitteltes FasL-*Shedding* keinerlei Hinweise gefunden werden. Weder eine Störung der Interaktion des FasL mit membrangebundenen Fas Rezeptor durch Zugabe von löslichem Fas-Rezeptor noch die Herunterregulation der Fas-Expresion mittels Fas-spezifischer siRNA scheinen das hFasL-*Shedding* in signifikanter Weise zu beeinflussen.

Des Weiteren sprechen Befunde von Henkler *et al.*, die auf eine hohe Stabilität von supramolekularen Fas-FasL-Clustern hindeuten, gegen ein rezeptorinduziertes *Shedding* von FasL. Vielmehr bleiben Zellen über den Fas/FasL-Komplex über einen längeren Zeitraum miteinander verbunden (Henkler *et al.*, 2005). Diese Beobachtung spräche für eine Inhibition des FasL-*Shedding* durch Bindung an den Fas-Rezeptor.

### 5.3.3 Ist das Fas Ligand-*Shedding* an intrazelluläre Signalwege gekoppelt?

Die Aktivierung des Fas Rezeptors über die Bindung des FasL löst eine Signalkaskade aus, die einen apoptotischen Zelltod bewirkt. Dabei ist die schrittweise Aktivierung von verschiedenen Caspasen besonders charakteristisch. Es wäre denkbar, dass der FasL lediglich durch Zellen, in denen apoptotische oder damit verknüpfte Signalwege aktiv sind, gesheddet wird. Eine Apoptose-induzierte Aktivierung von ADAM10 oder einer anderen Metalloprotease, die den FasL prozessieren könnte, wäre möglich. Für eine Reihe von Substraten konnte eine Induktion des *Sheddings* durch Auslösung von Apoptose gezeigt werden. Zum Beispiel wird der IL-6-Rezeptor nach Behandlung von HepG2-Zellen mit agonistischem Fas-Antikörper verstärkt freigesetzt. Dies ist auf eine verstärkte, Caspase-abhängige und PKC-unabhängige Maturierung von ADAM17 zurückzuführen (Calahris *et al.*, 2006).

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des FasL-*Sheddings* von apoptotischen Prozessen wurde in 293T-Zellen, die mit der apoptotisch inaktiven hFasL-Variante F275L, die dem *gld*-Phänotyp zugrunde liegt transfizierten waren, mittels Staurosporin Apoptose induziert. Staurosporin ist ein potenter Kinase-Hemmer. Durch Staurosporinbehandlung werden die grundlegenden Mechanismen der Apoptose ausgelöst (Bertrand *et al.*, 1994, Jacobsen *et al.*, 1996). Dennoch konnte durch Staurosporinbehandlung von Zellen, die die Wildtyp hFasL oder dessen Variante F275L exprimieren, Immunoblot keine Zunahme der N-terminalen Spaltfragmente nachgewiesen werden.

Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass das bisher beschriebene FasL-Prozessierungsmuster nicht durch Verhinderung der Apoptose während der WT-FasL-Expression in 293T-Zellen mittels des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk beeinflussbar ist. Wurden hFasL-transfizierte 293T-Zellen mit diesem Apoptose-Inhibitor behandelt, steigt zwar, sehr wahrscheinlich aufgrund der erhöhten Vitalität der Zellen, die Gesamtexpressionsrate des hFasL. Allerdings blieb das Verhältnis von den detektierten N-terminalen Spaltfragmente zum Volllängenprotein hiervon unberührt (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde sprechen gegen ein verstärktes FasL *Shedding* durch apoptotische Zellen.

Die Fas-vermittelte Apoptose wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen kontrolliert (Wajant *et al.*, 2003). Neben der Vermittlung von apoptotischen Signalen wurde in den letzten Jahren eine nichtapoptotische Signalübertragung durch den Fas Rezeptor nachgewiesen. Einige der Fas-spezifischen Apoptose regulierenden Mechanismen könnten

auch nicht-apoptotisches Fas-Signaling vermitteln (Wajant, *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005), das wiederum einen Einfluss auf das FasL-*Shedding* haben könnte.

Im nicht apoptotische Fas-Signaling kann es zu einer Aktivierung des Erk-Signalweges (Desbarats *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 2001), oder Jun Kinasen (Cardone *et al.*, 1997) kommen. Wird die Apoptose geblockt, kann auch NF-κB durch Fas aktiviert werden (Mandal *et al.*, 1996, Wajant *et al.*, 2003).

Ob im Zuge der Aktivierung solcher nichtapoptotischen Signalwege des Fas Rezeptors auch das FasL-*Shedding* betroffen ist, wurde durch Verwendung von pharmakologischen Substanzen untersucht, die auf der Ebene der *second messenger* verschiedene Signalwege aktivieren. Ionomycin vermittelt den Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ . Eine Erhöhung des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegels hat Einfluß auf verschiedene Signalwege. Klassischerweise wird durch diese Behandlung eine Aktivierung der CaM-Kinase sowie Proteinkinase C erreicht. Darüber hinaus bindet Calmodulin im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenem Zustand an den Fas-Rezeptor bei dessen Aktivierung (Chen *et al.*, 2007). Der Phorbolester PMA weist eine stimulatorische Wirkung auf PKCs auf. Auch die Aktivierung von PKC ist, wie oben erwähnt, für das nicht-apoptotische Fas-Signaling beschrieben worden.

Daher könnten durch die Ionomycin- oder PMA-Stimulation Signalwege angestoßen werden, die nach Aktivierung des Fas-Signaling ein *Shedding* des FasL herbeiführen. In diesem Fall würden auch FasL-Mutanten, die wegen fehlender oder reduzierter Rezeptorbindung keine Aktivierung von Fas-Signalwegen vermitteln können, proteolytisch freigesetzt werden.

In den dazu durchgeführten Experimenten wurde deutlich, dass weder die Zugabe von Ionomycin noch PMA das *Shedding* des Wildtyp-FasL noch der hFasL-Varianten F275L oder FasL-AP, die wahrscheinlich keine Bindung an den FasR zeigen, beeinflusste. Daher scheint es insgesamt, dass weder das Wildtyp- FasL-*Shedding* noch die Prozessierung von FasL F275L durch Signalwege beeinflusst werden, die die Aktivierung von PKC, JunK, Caspisen, MAP-Kinasen oder Calmodulin-abhängige Signalübertragung beinhalten.

Ein alternativer Erklärungsansatz für die beobachteten Defekte im *Shedding* der FasL Rezeptorbindungs mutanten könnte von der Charakterisierung der dem F275L Mutante durch Schreiber *et al.* (1997) ausgehen. Sie zeigen eine mit dem Wildtyp-FasL vergleichbare Glykosylierung von FasL F275L. Interessanterweise weisen sie jedoch Defekte in der Trimerisierung der löslichen Form der F275L-Mutante nach (Schneider 1997). Dadurch wird allerdings nicht die Oberflächenexpression dieser Mutante beeinträchtigt (Hahne *et al.*, 1995).

Insgesamt sprechen die Befunde daher dafür, dass die von Schneider *et al.* beschriebene Konformationsänderung, die zu Defekten in der Trimerisierung des hFasL führt, die ADAM10/FasL Interaktion stört.

Es wäre interessant zu untersuchen, inwieweit dabei die Konformation an sich oder eine Verhinderung der Trimerisierung der beeinträchtigten FasL-Prozessierung zugrunde liegen würde.

In allen in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen wurde der Wildtyp-hFasL in hohem Maße konstitutiv von der Zelloberfläche abgespalten. Durch Reagenzien wie Ionomycin oder dem cholesteroldepletierendem Methyl-Cyclodextrin, für die in vielen Zusammenhängen eine stimulatorische Wirkung auf *Shedding*-Ereignisse beschrieben worden ist, konnte für FasL keine Beeinflussung des *Sheddings* erreicht werden. Der Phorbolester PMA hatte lediglich eine sehr geringe stimulatorische Wirkung auf die Prozessierung von Wildtyp-FasL.

Die entscheidende regulatorische Ebene der FasL-Expression in zytotoxischen T-Zellen könnte daher der kontrollierter Transport der sekretorischen Lysosomen zur Zelloberfläche sein.

## 5.4 Untersuchungen zur Substratspezifität und Regulation von ADAM10 und ADAM17

Es ist in weiten Teilen unklar, auf welche Weise ADAM-Proteasen ihre spezifischen Substrate erkennen und welche molekularen Mechanismen der Regulation ihrer proteolytischen Aktivität zugrunde liegen.

Bisher konnten keinerlei Konsensussequenz im Bereich der Spaltstellen der ADAM-Substrate gefunden werden. Daher müssen Bereiche entfernt der Spaltstelle des Substrats bzw. des aktiven Zentrums der Protease zur Regulation und Spezifität der proteolytischen Substratfreisetzung beitragen (Seals und Courtneige, 2003).

Zur Eingrenzung von Bereichen unterschiedlicher ADAM-Proteasen wurden durch verschiedene Gruppen chimäre ADAM-Proteasen und/oder chimäre ADAM-Substrate erzeugt (u.a. Reddy *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2003; Horiuchi *et al.*, 2006; Fors *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 1995).

In dieser Arbeit wurden zur Durchführung solcher Analysen chimäre DNA-Konstrukte hergestellt, die aus Sequenzen bestehen, die für definierte Domänen von ADAM10 und ADAM17 kodieren.

Für alle in 293T oder Cos7-Zellen exprimierten chimären Proteasen konnte eine mature Form detektiert werden. Hierbei sind leichte Unterschiede im Verhältnis von Proform zu maturer Form zwischen den Chimären zu erkennen. Daher könnten solche chimären Proteasen eine Beeinträchtigung ihrer Reifung zur maturen Form und damit Aktivität aufweisen.

Beispielweise wurde für das Konstrukt TTTK, in dem die zytoplasmatische Domäne von ADAM17 gegen die entsprechende Domäne von ADAM10 ausgetauscht worden war, sowohl ein relativ schwaches Signal für die mature Form in der Immunoblot-Analyse, als auch eine abweichende Lokalisation in der Immunfluoreszenz gezeigt. Dennoch konnte, wie unten näher erläutert, eine mit ADAM17 vergleichbare proteolytische Aktivität gegenüber TNF-alpha für diese chimäre Protease gezeigt werden.

Weiterhin zeigten alle chimären Proteasen eine ähnliche, wenn auch nicht völlig gleiche Lokalisation in der Immunfluoreszenz-Analyse nach Überexpression in Cos7-Zellen. Für alle überexprimierten Chimäre konnte zumindest ein kleiner Anteil an der Zelloberfläche lokalisiert werden. Daher kann insgesamt davon ausgegangen werden, dass alle hergestellten chimären ADAM- Proteasen zur Zelloberfläche transportiert werden können und potentiell aktiv sind.

### 5.4.1 Chimärenstudien zur Regulation der Fas Ligand-Proteolyse

Der Austausch definierter Domänen von ADAM10 oder des hFasL gegen ADAM17 bzw. hTNF- $\alpha$  haben unterschiedlich starke Auswirkungen auf die FasL-Shedding-Rate. So kann die Metalloprotease-Domäne von ADAM10 nicht durch die Metalloprotease-Domäne von ADAM17 ersetzt werden, was eine Spezifität der ADAM10-Metalloprotease-Domäne für den FasL zeigt. Diese Spezifität wird allerdings nicht alleine durch die Metalloprotease-Domäne vermittelt. Weiterhin muss die erzeugte Chimäre die Disintegrin-/cysteinreiche Domäne und überraschenderweise auch die Transmembrandomäne von ADAM10 zusammen mit der Metalloprotease-Domäne besitzen. Sind diese drei Domänen vorhanden, wird der FasL im Vergleich zu Wildtyp-ADAM10 mit etwa der halben Rate freigesetzt. Zur Erreichung der vollen Aktivität scheint auch die zytoplasmatische Domäne von ADAM10 beizutragen.

### 5.4.2 Die mögliche Rolle der zytoplasmatischen Domäne von ADAM10 im Fas Ligand-*Shedding*

War die zytoplasmatische Domäne von ADAM10 deletiert (Konstrukt KKK) oder durch die zytoplasmatische Domäne von ADAM17 ausgetauscht (Konstrukt KKKT), wurde nur eine halbmaximale Freisetzungsraten von löslichem FasL erreicht. Im Gegensatz dazu spielte die zytoplasmatische Domäne von ADAM17 für das hTNF- $\alpha$ -*Shedding* keine Rolle, weshalb hier wahrscheinlich ein FasL-spezifischer Effekt vorliegt. Zusätzlich deutet auf die spezifische Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne von ADAM10 im Bezug auf das FasL-*Shedding* der Befund, dass ein Austausch der zytoplasmatischen Domäne von ADAM10 gegen die zytoplasmatische Domäne von ADAM17 nicht das konstitutive *Shedding* von hTNF- $\alpha$  beeinträchtigte. Daher kann angenommen werden, dass dieses Konstrukt prinzipiell eine volle Aktivität erreichen kann.

Darüber hinaus führte auch die Deletion der zytoplasmatischen Domäne des FasL zu einer Halbierung der hFasL-Freisetzungsraten. Der Austausch dieser Domäne gegen die zytoplasmatische Domäne von hTNF- $\alpha$  hat eine noch stärkere Beeinträchtigung des hFasL-*Shedding* zur Folge.

Interessanterweise ist die Expression des ADAM10-Konstrukts mit deletierter zytoplasmatischer Domäne (KKK) in jeglichen Koexpressionsexperimenten mit Mausfibroblasten unter der Nachweisgrenze im Immunoblot geblieben. Dennoch wurde die gleiche hFasL-*Shedding*-Aktivität erreicht wie durch das Konstrukt KKKT (Austausch der zytoplasmatischen ADAM10-Domäne gegen die zytoplasmatische Domäne von ADAM17). Diese Chimäre zeigte eine sehr gute, mit Wildtyp-ADAM10 vergleichbare Expression. Auch wenn eine inhibitorische Wirkung der zytoplasmatischen Domäne von ADAM17 auf das hFasL-*Shedding* nicht ausgeschlossen werden kann, sprechen diese Befunde dafür, dass eine relativ geringe Proteasemenge eine hohe Freisetzungsraten des Substrats erreichen kann. Eine ähnliche Beobachtung im Bezug auf das *Shedding* von EGF-Liganden wird in einer Veröffentlichung von Horiuchi *et al.* (2006) in gleicher Weise diskutiert.

Die zytoplasmatischen Domänen von ADAM10 als auch des hFasL besitzen SH3-Bindedomänen. Ein SH3 Bindemotif in der intrazellulären Domäne von ADAM10 (Positionen 708-715) wurde als basolaterales Sortierungsmotif in polarisierten epithelialen Zellen identifiziert, ohne dass die dieser Beobachtung zugrundeliegenden molekularen Mechanismen analysiert wurden (Wild-Bode *et al.*, 2006).

Der hFasL bindet über seine prolinreiche Domäne eine Reihe von Signalproteinen mit SH3- und WW-Domäne (Janssen *et al.*, 2003; Ghadimi *et al.*, 2002; Wenzel *et al.*, 2001; Lettau *et al.*, 2006; Baum *et al.*, 2005; Qian *et al.*, 2006; Thornbill *et al.*, 2007). So ist unter anderem eine Interaktion mit Proteinen wie den Src-verwandten Kinasen Fyn, LcK und Fgr oder Adapterproteine wie Nck1 Grb-2, FBP17, CD2BP1 und PACSIN1-3, beschrieben. Hier ist ihre Beteiligung an der regulierten Lokalisation des FasL in sekretorischen Lysosomen sowie den Transport in die immunologische Synapse gezeigt.

Interessanterweise scheint PACSIN3 auch die zytoplasmatische Domäne von ADAM10 über seine SH3-Domäne zu binden (Mori *et al.*, 2003). Daher wäre u.a. eine PACSIN3-vermittelte Lokalisation beider Proteine in den in dieser Arbeit verwendeten 293T-Zellen und Mausfibroblasten denkbar.

Das Adapterprotein Eve-1 enthält einige SH3 Domänen und bindet, wie durch Koimmunpräzipitationsversuche herausgefunden wurde, die zytoplasmatischen Domänen von ADAM9, 10, 12, 15 und 17, wobei diese Bindung das Phorbol-ester-stimulierte *Shedding* von TGF- $\alpha$ , HB-EGF, Amphiregulin und Epiregulin positiv beeinflusst (Tanaka *et al.*, 2004). Auch dieses Protein könnte daher das effiziente ADAM10-vermittelte *Shedding* von FasL vermitteln.

Eine direkte Interaktion von ADAM10 und dem FasL über ihre zytoplasmatischen Domänen erscheint unwahrscheinlich: Neben dem Fehlen offensichtlicher Interaktionsmotive konnte auch keine ADAM Protease bei der Identifizierung von Interaktionspartnern der prolinreichen Domäne des FasL gefunden werden (Ghadimi *et al.*, 2002; Baum *et al.*, 2005).

Interessanterweise zeigten sowohl Jodo *et al.* (2005) für ein FasL-Konstrukt, das eine Deletion der Aminosäuren 2-33 trägt, als auch Zuccato *et al.* (2007) für FasL-Mutanten mit mutierten N-terminalen Tyrosinresten eine starke Erhöhung der Oberflächenexpression. Obwohl dies durch Zuccato *et al.* mit einer Beeinträchtigung der Sortierung des FasL erklärt wird, wäre es interessant zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären Phosphorylierung des FasL und dessen *Shedding* besteht. Hierbei könnte ein nicht identifiziertes Adapterprotein sowohl mit zytoplasmatisch lokalisierten, potentiell phosphorylierbaren Tyrosinresten des FasL als auch mit der prolinreichen Domäne im zytoplasmatischen Bereich von ADAM10 interagieren.

Zwar konnte das hFasL-*Shedding* nicht in großem Umfang durch PMA oder Ionomycin stimuliert werden. Dennoch wäre es denkbar, dass einige chimäre Proteasen durch Austausch bestimmter Domänen von ADAM10 und ADAM17 die Fähigkeit zur PMA-induzierten proteolytischen Prozessierung des FasL erlangen. Es wurde in einigen Veröffentlichungen

diskutiert, dass durch die Phosphorylierung von Threonin<sup>735</sup> in der zytoplasmatischen Domäne von ADAM17 eine Stimulation des *Shedding* erreicht werden kann (Diaz-Rodruigez *et al.*, 2002; Soond *et al.*, 2005). Hierbei wurde ein Zusammenhang zwischen der Erk-abhängigen Phosphorylierung von Threonin<sup>735</sup> und der Maturierung durch Induktion des Transports zur Zelloberfläche hergestellt (Soond *et al.*, 2005).

Daher wurde untersucht, ob durch Zugabe von PMA eine Stimulation der FasL-Prozessierung bei Koexpression der ADAM10/17-Chimäre erreichbar ist. Doch auch in dieser Analyse war keine signifikante Beeinflussung der hFasL *Shedding*-Rate durch PMA erkennbar (Daten nicht gezeigt). Ebenso konnten durch Immunoblot-Analysen keine PMA-induzierte Maturierung der Chimäre nachgewiesen, da sich das Verhältnis von Proform zu maturer Form nicht signifikant durch PMA Zugabe zu den mit den chimären Proteasen transfizierten 293T- oder Cos7-Zellen änderte. Ebenso konnte in der Immunfluoreszenz keine Änderung der Lokalisation der Chimären durch PMA-Stimulation erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

### 5.4.3 Die mögliche Rolle der ADAM10-Transmembrandomäne im Fas Ligand-*Shedding*

Von besonderer Bedeutung für das FasL-*Shedding* durch ADAM10 scheint überraschenderweise die Transmembrandomäne zu sein. Sowohl ein Austausch der Transmembrandomäne von hFasL gegen die Transmembrandomäne von hTNF- $\alpha$  als auch der Transmembrandomäne von ADAM10 gegen die ADAM17-Transmembrandomäne (Konstrukt KKTT und KKTK) führen zu einem fast vollständigen Verlust des hFasL-*Shedding*.

Eine Erklärung für die Bedeutung der Transmembrandomäne könnten Analysen der Prozessierung des Wachstumshormonrezeptors (*growth hormone receptor*, GHR) bringen (Yang 2007): Der Wachstumshormonrezeptor liegt schon vor Bindung des Wachstumshormons dimerisiert vor, die Bindung des Liganden führt zur Aktivierung der zytoplasmatisch GHR-assoziierten Janus Kinase 2. Der Austausch der Transmembrandomäne gegen die Transmembrandomäne des „*Low Density Lipoprotein Rezeptors*“ (LDLR) hat keine Auswirkung auf die Dimerisierung, und auch die Antwort auf Stimulation durch Wachstumshormon bleibt vergleichbar. Interessanterweise jedoch konnte die LDLR/GHR-Chimäre weit weniger stark durch ADAM17 nach PMA Induktion gesheddet werden.

Darüber hinaus konnte die Stimulation des LDLR/GHR-Chimäre durch einen Konformations-sensitiven inhibitorischen anti-Wachstumshormonrezeptor-Antikörper weit weniger stark herunterreguliert werden als im Falle des Wildtyp-Wachstumshormonrezeptor. Die Autoren diskutieren, dass sich die Konformation oder Orientierung der extrazellulären Domäne im Juxtamembranbereich in Abhängigkeit von der Transmembrandomäne verändern könnte, was zu einer Veränderung des *Shedding*-Musters führt. Die Transmembrandomäne von ADAM10 könnte in ähnlicher Weise die Konformation der Juxtamembranregion des Enzyms beeinflussen und auf diese Weise das *Shedding* beeinflussen. Es könnte sein, dass schon eine kleine Änderung der Konformation oder Orientierung dieser Region der extrazellulären Domäne nach Austausch der Transmembrandomäne das FasL-*Shedding* beeinflusst.

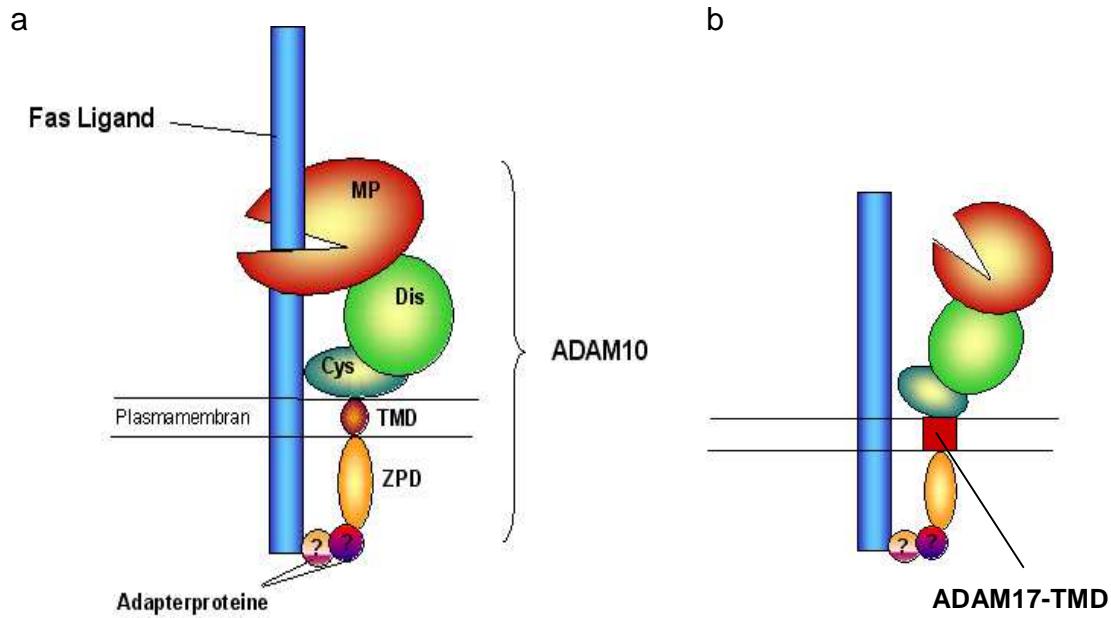
In diesem Zusammenhang sind auch die Veröffentlichungen von Takeda *et al.* (2006) und Igarashi *et al.* (2007) zu berücksichtigen. Durch Lösung der Kristallstruktur der ADAM-homologen Schlangengiftprotease VAP1 wurde eine sogenannte hypervariable Region identifiziert, die aufgrund ihrer Lage und Zusammensetzung als Protein-Protein-Interaktionsregion für die spezifische Substraterkennung durch ADAM-Proteasen angenommen wird. Sie liegt in der C-förmig gefalteten Ektodomäne gegenüber dem aktiven Zentrum und weist bei verschiedenen ADAM Proteasen in Zahl und Art unterschiedliche Aminosäurereste auf, die die Substratbindung vermitteln können. Auch Janes *et al.* (2005) beschreiben den gleichen membranproximalen Bereich von ADAM10 aufgrund der gelösten Kristallstruktur der ADAM10-Disintegrin/cysteinreichen Domäne als verantwortlich für die Substratbindung.

Auch der Austausch der Transmembrandomäne des hFasL gegen die korrespondierende Domäne des hTNF- $\alpha$  reduziert das hFasL-*Shedding* sehr stark. Hier könnte ebenfalls angenommen werden, dass die korrekte Konformation des membranproximalen Abschnitts des hFasL, die eine Voraussetzung für eine Erkennung durch die hypervariable Region von ADAM10 ist, von der Transmembrandomäne des hFasL abhängt.

Eine weitere prinzipielle Möglichkeit zur Regulation des *Sheddings* des FasL könnte durch dessen Lokalisation in *Lipid Rafts* gegeben sein. Diese cholesterol- und sphingolipidreiche Mikrodomänen spielen, wie kürzlich entdeckt wurde, eine wichtige Rolle bei der Regulation des *Sheddings* von APP (Kojro *et al.*, 1998) CD30 (von Tresckow *et al.*, 2004), Interleukin-6-Rezeptor (Matthews *et al.*, 2003) oder L-Selektin (Phong *et al.*, 2003). Die Aktivität von ADAM19 ist mit *Lipid Rafts* assoziiert (Wakatsuki *et al.*, 2004).

Eine *Lipid Raft*-Lokalisation wird für den FasL zum Großteil durch die intrazelluläre prolinreiche Domäne vermittelt (Cahuzac *et al.*, 2006). Thiel *et al.* zeigten 2007 eine starke Ankonzentration der maturen Form von ADAM17 in der Detergenz-unlöslichen *Raft* Fraktion, wohingegen für ADAM10 bisher keine Lokalisation in *Lipid Rafts* beschrieben worden ist. ADAM10 und 17 unterscheiden sich stark in der Länge und Sequenz der zytoplasmatischen Domänen, und auch die Transmembrandomänen weisen keine starke Konservierung auf. Daher wurde untersucht, ob durch Depletion von Cholesterol mittels Methycyclodextrin, was zu einer Zerstörung von *Lipid Rafts* führt, eine Induktion des FasL-*Shedding* möglich ist. Sollten die Metalloprotease-Domäne und Transmembrandomäne von ADAM10 die Spezifität für den FasL vermitteln, Transmembrandomäne und/oder zytoplasmatische Domäne von ADAM17 jedoch zu einer differentiellen Lokalisation in *Lipid Rafts* führen, könnte die Cholesteroldepletion eine Interaktion von Protease und Substrat und damit das *Shedding* wiederherstellen. Eine Zugabe von Methylcyclodextrin führte jedoch nicht zu einer verstärkten hFasL-Prozessierung durch irgendeines der unterschiedlichen Konstrukte bei Koexpression in ADAM10-defizienten Mausfibroblasten (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt muss in Bezug auf die Lokalisation und Interaktion von FasL und ADAM10 bedacht werden, dass die gewonnenen Ergebnisse durch Überexpressionsexperimente in Mausfibroblasten und 293T-Zellen gewonnen wurden. In hämatopoetischen Zellen werden allerdings spezifische Sets von Adapterproteinen und Kinasen exprimiert, die mit ADAM10 und dem FasL interagieren könnten. Im Besonderen verläuft die Sortierung des FasL in diesen Zellen aufgrund seiner Speicherung in sekretorischen Lysosomen grundsätzlich anders als in anderen Zelltypen (Blott *et al.*, 2001). Daher können die in dieser Arbeit erbrachten Befunde nicht ohne weiteres auf Zellen aus der hämatopoetischen Reihe übertragen werden.



**Abb. 41: Schematische Darstellung des hFas Ligand-Shedding durch ADAM10**

(a) Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zum Fas Ligand-*Shedding* deuten auf eine essentielle Funktion der Metalloprotease-Domäne(MP), der Disintegrin-domäne (DIS) zusammen mit der cysteinreichen Domäne (Cys), und der Transmembrandomäne (TMD) hin. Zusätzlich könnten nicht identifizierte Adapterproteine, die an den zytoplasmatischen Domänen (ZPD) binden, an der effizienten Interaktion oder einer ähnlichen Sortierung von ADAM10 und dem Fas Ligand beteiligt sein. Über membrannahe Sequenzen innerhalb der cysteinreichen Domäne, die zwischen verschiedenen ADAMs wenig konserviert sind, ist wahrscheinlich ein Teil der spezifischen Substraterkennung vermittelt. (b) Eine Veränderung der Transmembrandomäne könnte die Orientierung und/oder Konformation der extrazellulären Domänen beeinflussen, so dass der hFasL nicht mehr erkannt wird. Dies würde die Inaktivität von ADAM10, das die Transmembrandomäne von ADAM17 enthält, erklären.

#### 5.4.4 Chimärenstudien zur Regulation der TNF-Proteolyse durch ADAM17

In weiteren Experimenten wurde versucht, Domänen von ADAM17 und hTNF- $\alpha$  zu identifizieren, die das konstitutive und stimulierte *Shedding* von hTNF- $\alpha$  vermitteln.

In Vorversuchen konnten die bekannten Erkenntnisse reproduziert werden, dass ADAM17 den hTNF- $\alpha$  sowohl konstitutiv als auch PMA-stimulierbar nach dessen Überexpression aus Mausfibroblasten freisetzen kann. In dieser Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden,

dass ADAM10 kein PMA-induziertes, jedoch ein effizientes konstitutives hTNF- $\alpha$ -*Shedding* vermitteln kann.

In den Analysen kamen neben ADAM10- bzw. ADAM17-defizienten Mausfibroblasten auch ADAM10/ADAM17-doppeldefiziente Mausfibroblasten zum Einsatz, die in der Arbeitsgruppe durch Kreuzung von heterozygoten ADAM10<sup>+/−</sup>-mit ADAM17<sup>+/−</sup>-Mäusen generiert worden waren. Da diese Zellen weder konstitutiv noch in PMA-stimulierbarer Weise hTNF- $\alpha$  *shedden* konnten, bildeten sie eine ideale experimentelle Grundlage für die Analyse des hTNF- $\alpha$ -*Shedding*s mittels ADAM10/ADAM17-Chimären.

In den in erster Linie auf hTNF- $\alpha$ -spezifischen ELISA-Analysen basierenden Versuchen stellte sich heraus, dass es für das hTNF- $\alpha$ -*Shedding* unerheblich zu sein scheint, ob die Metalloproteasedomäne von ADAM10 oder ADAM17 stammt. Dies ist plausibel, da beide Proteasen prinzipiell hTNF- $\alpha$  *shedden* können. Die Möglichkeit des konstitutiven und/oder stimulierten hTNF- $\alpha$ -*Shedding*s schien dagegen durch nachfolgende Domänen bestimmt. Dies steht im direkten Gegensatz zu einer Veröffentlichung von Reddy *et al.* (2000), in der ähnliche Experiment beschrieben sind. Hier konnte die Metalloprotease-Domäne von ADAM10 nicht die Metalloprotease-Domäne von ADAM17 ersetzen. Es wurde dort die Grenze der Metalloprotease-Domäne von ADAM10 drei Aminosäuren weiter C-terminal definiert. Dieser kleine Unterschied könnte Auswirkungen auf die Aktivität der Chimäre haben. Die durchgeführten Analysen, die in Reddy *et al.*, (2000) gezeigt werden, sind bei weitem nicht so umfangreich wie die in dieser Arbeit beschriebenen. So wurde zum Beispiel nicht das unstimulierte *Shedding* der dort benutzten ADAM10/ADAM17-Chimäre untersucht. Die Deletion der zytoplasmatischen Domäne von ADAM17 hatt in dieser Arbeit keinerlei Auswirkung auf beide *Shedding*-Arten von hTNF- $\alpha$ . Dies ist in Übereinstimmung mit Reddy *et al.* (2000) und Fan *et al.*, (2003). Auch Horiuchi *et al.* wiesen 2007 nach, dass die zytoplasmatische Domäne von ADAM17 nicht notwendig für das PMA-induzierte *Shedding* von TGF- $\alpha$  ist.

Wie im Falle des hFasL-*Shedding*s durch ADAM10 scheinen auch hier die Disintegrin-/cysteinreiche Domäne und die Transmembrandomäne von ADAM17 eine funktionelle Einheit zu bilden. Allerdings besteht die Funktionalität nicht in erster Linie in der Vermittlung des konstitutiven *Shedding*s. Vielmehr müssen beide Domänen, weitgehend unabhängig von der Identität der Metalloprotease-Domäne, in einer chimären Protease vereint sein, um neben dem konstitutiven hTNF- $\alpha$ -*Shedding* auch ein PMA-stimulierbares hTNF- $\alpha$ -*Shedding* zu erreichen.

Man könnte hier im Zusammenhang mit der Bedeutung der Transmembrandomäne einen zugrundeliegenden Mechanismus diskutieren, der sich an oben erwähnte Ergebnissen aus der Veröffentlichung von Yang *et al.*, anlehnt (Yang *et al.*, 2007). Wie dort beschrieben, könnte auch hier, allerdings auf der Seite von ADAM17, eine über die Transmembrandomäne vermittelte Konformationsänderung oder Orientierung der extrazellulären Domäne, die durch PMA-Stimulation erreicht wird, die Voraussetzung für das PMA-induzierte TNF- $\alpha$ -*Shedding* durch ADAM17 sein. Durch den Austausch der Transmembrandomäne von ADAM17 gegen die Transmembrandomäne von ADAM10 könnte die extrazellulär membranproximal gelegene hypervariable Region von ADAM17 durch PMA-Stimulation nicht mehr die Konformation oder Orientierung einnehmen, um den TNF- $\alpha$  in verstärktem Maße *shedden* zu können.

Auf der Seite des TNF- $\alpha$  scheint der Austausch der Transmembrandomäne von hTNF- $\alpha$  gegen die Transmembrandomäne des hFasL sowohl konstitutives als auch PMA stimuliertes *Shedding* negativ zu beeinflussen. Dies gilt noch stärker für den entsprechenden Austausch der zytoplasmatischen Domäne. Dies ist ebenfalls ein überraschender Befund, denn für viele ADAM-Substrate konnte gezeigt werden, dass ihr PMA-induziertes *Shedding* lediglich von der extrazellulären Domäne bestimmt wird (Brakebusch *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Mullberg *et al.*, 1994; Sisodia *et al.*, 1992; Sadhukhan *et al.*, 1998). Zur Verifizierung einer Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne von TNF- $\alpha$  für dessen *Shedding* müsste die proteolytische Freisetzung eines TNF-Konstrukts mit deletierter zytoplasmatischer Domäne analysiert werden.

## 6 Zusammenfassung

Der Fas Ligand ist als Apoptose-induzierendes Molekül auf der Oberfläche von T- und NK-Zellen, einigen Tumorzellen sowie Zellen immunprivilegierten Gewebes beschrieben. Die proteolytische Freisetzung des humanen Fas Liganden trägt zur negativen Regulation der apoptotischen Aktivität dieses Todesliganden bei.

Obwohl ein erhöhtes Serumlevel des löslichen Fas Liganden mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert erscheint, ist die Fas Ligand-freisetzende Protease bisher nicht identifiziert worden.

In dieser Arbeit konnte durch pharmakologische, biochemische und genetische Analysen die Metalloprotease ADAM10 als diejenige Protease identifiziert werden, die in kritischer Weise das *Shedding* des Fas Liganden vermittelt. Dabei konnte die essentielle Bedeutung von ADAM10 als Fas Ligand Sheddase sowohl in Mausfibroblasten als auch in humanen epithelialen und hämatopoetischen Zellen gezeigt werden.

Eine Verstärkung der Fas Ligand-vermittelten Zytotoxizität von Tumorzellen durch spezifische ADAM10-Inhibition konnte nachgewiesen werden. Somit könnte eine Fehlregulation der ADAM10-Aktivität in Tumorzellen eine Rolle im sogenannten „*tumor counterattack*“ spielen. Darüber hinaus konnte durch ADAM10-Inhibition im Fas Ligand-abhängigen aktivierungsinduzierten Zelltod von T-Zellen eine erhöhte Apoptoserate erreicht werden. Daher könnte die ADAM10-Aktivität einen bedeutsamen Beitrag zur Regulation des aktivierungsinduzierten Zelltods leisten.

Aufgrund von Untersuchungen zur Regulation des *Sheddings* des Fas Liganden erscheinen eine Abhängigkeit des FasL-*Sheddings* von der Fas-Rezeptorbindung sowie die Endozytose von Oberflächen-FasL unwahrscheinlich. Dafür legt das Prozessierungsmuster von inaktiven humanen Fas Ligand-Mutanten nahe, dass der Fas Ligand als Trimer abgespalten werden könnte.

Analysen zur Vermittlung der Substratspezifität wurden mit Hilfe von chimären ADAM10/ADAM17 Proteasen durchgeführt, in denen verschiedene Domänen von ADAM10 gegen die entsprechenden Domänen der homologen Protease ADAM17 (TACE), die den FasL nicht proteolytisch prozessieren kann, ausgetauscht wurde. Hier zeigte sich eine Beteiligung aller Domänen von ADAM10 an der spezifischen proteolytischen Prozessierung des humanen Fas Liganden. Dabei sind die extrazellulär gelegenen Domänen sowie die Transmembrandomäne essentiell, die zytoplasmatische Domäne von ADAM10 trägt lediglich einen Teil zur Spezifität des Fas Ligand-*Shedding* bei.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit mithilfe von ADAM10/ADAM17 doppeldefizienten Mausfibroblasten gezeigt werden, dass ADAM10 den humanen TNF- $\alpha$  effektiv konstitutiv, nicht jedoch PMA-stimulierbar freisetzen kann. Die Untersuchungen zur Regulation und Spezifität des humanen TNF- $\alpha$ -*Shedding* mit Hilfe der ADAM10/ADAM17 Chimären führten zu der Identifizierung einer funktionellen Einheit aus Transmembrandomäne und Disintegrin-/cysteinreicher Domäne von ADAM17, die das PMA-stimulierte *Shedding* des humanen TNF- $\alpha$  vermittelt.

In dieser Arbeit wird erstmals die mögliche Rolle der Transmembrandomänen von ADAM10 und ADAM17 bei der Vermittlung der Regulation und Spezifität des *Shedding* beschrieben. Einen möglichen Einfluss der Transmembrandomäne auf die Konformation oder Orientierung der cysteinreichen Domäne, die in vielen Untersuchungen als notwendig für die Substrat-erkennung durch ADAMs beschrieben worden ist, wäre denkbar. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind allerdings noch unklar und sollen Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

## 7 Summary

The Fas Ligand is described as an apoptosis inducing molecule that is expressed on the surface of T-cells, NK-cells, some tumor cells as well as cells of the immunoprivileged tissue. The proteolytic release of Fas Ligand contributes to the negative regulation of the apoptotic activity of this death ligand.

Although increased serum levels of soluble Fas Ligand were described for many pathophysiological conditions, the Fas Ligand-releasing protease has not yet been identified. In this work, using pharmacological, biochemical and genetic analyses, a critical involvement of the disintegrin metalloprotease ADAM10 for the shedding of Fas Ligand was demonstrated. The essential role of ADAM10 was shown in mouse fibroblasts and human epithelial and hematopoietic cells.

Furthermore, an upregulation of cell-mediated FasL cytotoxicity of tumor cells by ADAM10-inhibition could be demonstrated. Therefor, a dysregulation of ADAM10 activity could play a role in the “tumor counterattack” mechanism.

Importantly, the specific inhibition of ADAM10 activity increased the Fas Ligand dependent activation induced cell death of T-cells. The experiments suggest that ADAM10 might play a major role in the regulation of this death pathway.

The investigation of the regulatory aspects of Fas Ligand shedding did not reveal a dependency of Fas Ligand shedding on receptor binding or on endocytosis of surface Fas Ligand. The processing pattern of inactive human Fas Ligand mutants suggests that the trimeric form of Fas Ligand is a substrate for ADAM10.

Experiments using chimeras in which domains of ADAM10 were exchanged against the corresponding domains of the homologue ADAM17 (TACE), which is not able to shed Fas Ligand, showed a participation of all domains in determining substrate specificity. Here, the extracellular domain and the transmembrane domain appear of specific importance, whereas the cytoplasmic domain contributed only partially to Fas Ligand shedding.

Using mouse ADAM10/ADAM17 double deficient fibroblasts it was shown that ADAM10 can mediate an effective constitutive, but not PMA-induced shedding of TNF- $\alpha$ .

Analysing the regulation and specificity of TNF- $\alpha$  shedding using the ADAM10/ADAM17 chimeric proteases, a functional unit consisting of the transmembrane and cystein rich domains could be identified, which mediates the PMA-inducibility of TNF- $\alpha$  shedding.

## Summary

---

In this work a possible role of the transmembrane domains of ADAM10 and ADAM17 in mediating regulation and specificity of shedding events is described for the first time. A possible influence of the transmembrane domain on the conformation of the cystein rich domain, which is needed for the substrate recognition by ADAMs, is suggested. The underliing molecular mechanisms are subject to further studies.

## 8 Literaturverzeichnis

Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhouit TA, Broadway N, Hartmann D, Sedlacek R, Dietrich S, Muetze B, Schuster B, Kallen KJ, Saftig P, Rose-John S, 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. *J Immunol* 172:6362-6372.

Aggarwal BB. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3:745-756.

Ahn JH, Park SM, Cho HS, Lee MS, Yoon JB, Vilcek J, Lee TH. 2001. Nonapoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression. *J Biol Chem* 276:47100-47106.

Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, Goodwin RG, Smith CA, Ramsdell F, Lynch DH. 1995. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* 181:71-77.

Allison J, Georgiou HM, Strasser A, Vaux DL. 1997. Transgenic expression of CD95 ligand on islet beta cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3943- 3947.

Almeida EA, Huovila AP, Sutherland AE, Stephens LE, Calarco PG, Shaw LM, Mercurio AM, Sonnenberg A, Primakoff P, Myles DG, White JM. 1995. Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell* 81:1095-1104. Anders A, Gilbert S, Garten W, Postina R, Fahrenholz F. 2001. Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *Faseb J* 15:1837-1839.

Arribas J, Coodly L, Vollmer P, Kishimoto TK, Rose-John S, Massague J. 1996. Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J Biol Chem* 271:11376-11382.

Baum W, Kirkin V, Fernandez SB, Pick R, Lettau M, Janssen O, Zornig M. 2005. Binding of the intracellular Fas ligand (FasL) domain to the adaptor protein PSTPIP results in a cytoplasmic localization of FasL. *J Biol Chem* 280:40012- 40024.

Becherer JD, Blobel CP. 2003. Biochemical properties and functions of membraneanchored metalloprotease-disintegrin proteins (ADAMs). *Curr Top Dev Biol* 54:101-123.

Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. 1995. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377:630-632. Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn KW, Pommier Y. 1994. Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res* 211:314-321.

Black RA, Doedens JR, Mahimkar R, Johnson R, Guo L, Wallace A, Virca D, Eisenman J, Slack J, Castner B, Sunnarborg SW, Lee DC, Cowling R, Jin G, Charrier K, Peschon JJ, Paxton R. 2003. Substrate specificity and inducibility of TACE (tumour necrosis factor alpha-

converting enzyme) revisited: the Ala-Val preference, and induced intrinsic activity. *Biochem Soc Symp*:39-52.

Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385:729-733.

Blobel CP. 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:32-43.

Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM. 1992. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356:248-252.

Blott EJ, Bossi G, Clark R, Zvelebil M, Griffiths GM. 2001. Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *J Cell Sci* 114:2405-2416.

Blott EJ, Griffiths GM. 2002. Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:122-131.

Boehringer N, Hagens G, Songeon F, Isler P, Nicod LP. 1999. Differential regulation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-10 (IL-10) secretion by protein kinase and phosphatase inhibitors in human alveolar macrophages. *Eur Cytokine Netw* 10:211-218.

Bohm BB, Aigner T, Roy B, Brodie TA, Blobel CP, Burkhardt H. 2005. Homeostatic effects of the metalloproteinase disintegrin ADAM15 in degenerative cartilage remodeling. *Arthritis Rheum* 52:1100-1109.

Borland G, Murphy G, Ager A. 1999. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits shedding of L-selectin from leukocytes. *J Biol Chem* 274:2810-2815.

Bossi G, Griffiths GM. 1999. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med* 5:90-96.

Brakebusch C, Varfolomeev EE, Batkin M, Wallach D. 1994. Structural requirements for inducible shedding of the p55 tumor necrosis factor receptor. *J Biol Chem* 269:32488-32496.

Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477:267-283.

Briley GP, Hissong MA, Chiu ML, Lee DC. 1997. The carboxyl-terminal valine residues of proTGF alpha are required for its efficient maturation and intracellular routing. *Mol Biol Cell* 8:1619-1631.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-868.

Budagian V, Bulanova E, Orinska Z, Ludwig A, Rose-John S, Saftig P, Borden EC, Bulfone-Paus S. 2004. Natural soluble interleukin-15Ralpha is generated by cleavage that involves the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17). *J Biol Chem* 279:40368-40375.

Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA. 1998. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273:27765-27767.

Cahuzac N, Baum W, Kirkin V, Conchonaud F, Wawrezinieck L, Marguet D, Janssen O, Zornig M, Hueber AO. 2006. Fas ligand is localized to membrane rafts, where it displays increased cell death-inducing activity. *Blood* 107:2384-2391.

Cardone MH, Salvesen GS, Widmann C, Johnson G, Frisch SM. 1997. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 90:315-323.

Chalaris A, Rabe B, Paliga K, Lange H, Laskay T, Fielding CA, Jones SA, Rose- John S, Scheller J. 2007. Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* 110:1748-1755.

Chantry A, Gregson NA, Glynn P. 1989. A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 264:21603-21607.

Chen A, Engel P, Tedder TF. 1995. Structural requirements regulate endoproteolytic release of the L-selectin (CD62L) adhesion receptor from the cell surface of leukocytes. *J Exp Med* 182:519-530.

Chen Y, Pawar P, Pan G, Ma L, Liu H, McDonald JM. 2007. Calmodulin binding to the Fas-Mediated death-inducing signaling complex in cholangiocarcinoma cells. *J Cell Biochem*.

Choi C, Park JY, Lee J, Lim JH, Shin EC, Ahn YS, Kim CH, Kim SJ, Kim JD, Choi IS, Choi IH. 1999. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF-alpha, or IFNgamma. *J Immunol* 162:1889-1895.

Cisse MA, Sunyach C, Lefranc-Jullien S, Postina R, Vincent B, Checler F. 2005. The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. *J Biol Chem* 280:40624-40631.

Cohen PL, Eisenberg RA. 1991. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 9:243-269.

Contin C, Pitard V, Itai T, Nagata S, Moreau JF, Dechanet-Merville J. 2003. Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alphaconverting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J Biol Chem* 278:32801- 32809.

Damm EM, Pelkmans L, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Kurzchalia T, Helenius A. 2005. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol* 168:477-488.

Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. 1996. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379:557-560.

De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R. 1999. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398:518-522.

Desbarats J, Birge RB, Mimouni-Rongy M, Weinstein DE, Palerme JS, Newell MK. 2003. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol* 5:118-125.

Desbarats J, Duke RC, Newell MK. 1998. Newly discovered role for Fas ligand in the cell-cycle arrest of CD4+ T cells. *Nat Med* 4:1377-1382.

Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. 1995. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373:438-441.

Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Esparis-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. *Mol Biol Cell* 13:2031-2044.

Doedens JR, Mahimkar RM, Black RA. 2003. TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 308:331-338.

Eck MJ, Sprang SR. 1989. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 264:17595-17605.

Eck MJ, Ultsch M, Rinderknecht E, de Vos AM, Sprang SR. 1992. The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) at 1.9-Å resolution. *J Biol Chem* 267:2119-2122.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.

Enslen H, Tokumitsu H, Stork PJ, Davis RJ, Soderling TR. 1996. Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10803-10808.

Ethell DW, Kinloch R, Green DR. 2002. Metalloproteinase shedding of Fas ligand regulates beta-amyloid neurotoxicity. *Curr Biol* 12:1595-1600.

Evans JP, Kopf GS, Schultz RM. 1997. Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin beta subunit to mouse eggs: evidence for adhesive activity via an egg beta1 integrin-mediated interaction. *Dev Biol* 187:79-93.

Evans JP, Schultz RM, Kopf GS. 1995. Mouse sperm-egg plasma membrane interactions: analysis of roles of egg integrins and the mouse sperm homologue of PH-30 (fertilin) beta. *J Cell Sci* 108 ( Pt 10):3267-3278.

Evans JP, Schultz RM, Kopf GS. 1997. Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin alpha subunit to mouse eggs: evidence for function as a cell adhesion molecule in sperm-egg binding. *Dev Biol* 187:94- 106.

Fan H, Turck CW, Deryck R. 2003. Characterization of growth factor-induced serine phosphorylation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme and of an alternatively translated polypeptide. *J Biol Chem* 278:18617-18627.

Ferguson TA, Green DR, Griffith TS. 2002. Cell death and immune privilege. *Int Rev Immunol* 21:153-172.

Fingleton B. 2007. Matrix metalloproteinases as valid clinical targets. *Curr Pharm Des* 13:333-346.

Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW, Murphy G, Bernfield M. 2000. Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol* 148:811- 824.

Fluhrer R, Grammer G, Israel L, Condron MM, Haffner C, Friedmann E, Bohland C, Imhof A, Martoglio B, Teplow DB, Haass C. 2006. A gamma-secretase-like intramembrane cleavage of TNFalpha by the GxGD aspartyl protease SPPL2b. *Nat Cell Biol* 8:894-896.

Fluhrer R, Haass C. 2007. Signal peptide peptidases and gamma-secretase: cousins of the same protease family? *Neurodegener Dis* 4:112-116.

Fors BP, Goodarzi K, von Andrian UH. 2001. L-selectin shedding is independent of its subsurface structures and topographic distribution. *J Immunol* 167:3642- 3651.

Friedmann E, Hauben E, Maylandt K, Schleeger S, Vreugde S, Lichtenhaller SF, Kuhn PH, Stauffer D, Rovelli G, Martoglio B. 2006. SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nat Cell Biol* 8:843-848.

Frigerio S, Silei V, Ciusani E, Massa G, Lauro GM, Salmaggi A. 2000. Modulation of fas-ligand (Fas-L) on human microglial cells: an in vitro study. *J Neuroimmunol* 105:109-114.

Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, Murphy G, Greaves DR, Dempsey PJ, Raines EW. 2001. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 276:37993-38001.

Gechtman Z, Alonso JL, Raab G, Ingber DE, Klagsbrun M. 1999. The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *J Biol Chem* 274:28828-28835.

Ghadimi MP, Sanzenbacher R, Thiede B, Wenzel J, Jing Q, Plomann M, Borkhardt A, Kabelitz D, Janssen O. 2002. Identification of interaction partners of the cytosolic proline region of CD95 ligand (CD178). *FEBS Lett* 519:50-58.

Ghio M, Contini P, Mazzei C, Brenci S, Filaci G, Indiveri F, Puppo F. 2000. Soluble HLA class I and Fas ligand molecules in blood components and their role in the immunomodulatory effects of blood transfusions. *Leuk Lymphoma* 39:29- 36.

Gilpin BJ, Loechel F, Mattei MG, Engvall E, Albrechtsen R, Wewer UM. 1998. A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. *J Biol Chem* 273:157-166. Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, Ruberti G, Bagnasco M, Testi R, Galluzzo A. 1997. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 275:960-963.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74:111-122.

Gough PJ, Garton KJ, Wille PT, Rychlewski M, Dempsey PJ, Raines EW. 2004. A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16. *J Immunol* 172:3678-3685.

Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. 1995. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270:1189-1192.

Gurezka R, Laage R, Brosig B, Langosch D. 1999. A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments. *J Biol Chem* 274:9265-9270.

Gutierrez-Steil C, Wrone-Smith T, Sun X, Krueger JG, Coven T, Nickoloff BJ. 1998. Sunlight-induced basal cell carcinoma tumor cells and ultraviolet-B-irradiated psoriatic plaques express Fas ligand (CD95L). *J Clin Invest* 101:33-39.

Haass C, Selkoe DJ. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101-112.

Hahne M, Peitsch MC, Irmiger M, Schroter M, Lowin B, Rousseau M, Bron C, Renno T, French L, Tschopp J. 1995. Characterization of the non-functional Fas ligand of gld mice. *Int Immunol* 7:1381-1386.

Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. 1996. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274:1363-1366.

Hakulinen J, Keski-Oja J. 2006. ADAM10-mediated release of complement membrane cofactor protein during apoptosis of epithelial cells. *J Biol Chem* 281:21369-21376.

Hallermalm K, De Geer A, Kiessling R, Levitsky V, Levitskaya J. 2004. Autocrine secretion of Fas ligand shields tumor cells from Fas-mediated killing by cytotoxic lymphocytes. *Cancer Res* 64:6775-6782.

Hargreaves PG, Wang F, Antcliff J, Murphy G, Lawry J, Russell RG, Croucher PI. 1998. Human myeloma cells shed the interleukin-6 receptor: inhibition by tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and a hydroxamate-based metalloproteinase inhibitor. *Br J Haematol* 101:694-702.

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

Hattori M, Osterfield M, Flanagan JG. 2000. Regulated cleavage of a contactmediated axon repellent. *Science* 289:1360-1365.

Henkler F, Behrle E, Dennehy KM, Wicovsky A, Peters N, Warnke C, Pfizenmaier K, Wajant H. 2005. The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability. *J Cell Biol* 168:1087-1098.

Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. 1998. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 141:85-99.

Hinkle CL, Sunnarborg SW, Loiselle D, Parker CE, Stevenson M, Russell WE, Lee DC. 2004. Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency. *J Biol Chem* 279:24179-24188.

Hohlbaum AM, Moe S, Marshak-Rothstein A. 2000. Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. *J Exp Med* 191:1209-1220.

Holbro T, Hynes NE. 2004. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:195-217.

Horiuchi K, Le Gall S, Schulte M, Yamaguchi T, Reiss K, Murphy G, Toyama Y, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP. 2007. Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Mol Biol Cell* 18:176-188.

Hosaka N, Oyaizu N, Kaplan MH, Yagita H, Pahwa S. 1998. Membrane and soluble forms of Fas (CD95) and Fas ligand in peripheral blood mononuclear cells and in plasma from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Infect Dis* 178:1030-1039.

Hotoda N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S. 2002. A secreted form of human ADAM9 has an alpha-secretase activity for APP. *Biochem Biophys Res Commun* 293:800-805.

Howard L, Maciewicz RA, Blobel CP. 2000. Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28. *Biochem J* 348 Pt 1:21-27.

Howard L, Nelson KK, Maciewicz RA, Blobel CP. 1999. Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domaincontaining proteins, endophilin I and SH3PX1. *J Biol Chem* 274:31693- 31699.

Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V, Kallen KJ, Rose-John S, Ludwig A. 2003. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1- mediated cell-cell adhesion. *Blood* 102:1186-1195.

Iba K, Albrechtsen R, Gilpin B, Frohlich C, Loechel F, Zolkiewska A, Ishiguro K, Kojima T, Liu W, Langford JK, Sanderson RD, Brakebusch C, Fassler R, Wewer UM. 2000. The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. *J Cell Biol* 149:1143-1156.

Igarashi T, Araki S, Mori H, Takeda S. 2007. Crystal structures of catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/adamalysin/reprolysin family proteins. *FEBS Lett* 581:2416-2422.

Isaaz S, Baetz K, Olsen K, Podack E, Griffiths GM. 1995. Serial killing by cytotoxic T lymphocytes: T cell receptor triggers degranulation, re-filling of the lytic granules and secretion of lytic proteins via a non-granule pathway. *Eur J Immunol* 25:1071-1079.

Itai T, Tanaka M, Nagata S. 2001. Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF-alpha-converting enzyme, but not its truncated soluble form. *Eur J Biochem* 268:2074-2082.

Izumi Y, Hirata M, Hasuwa H, Iwamoto R, Umata T, Miyado K, Tamai Y, Kurisaki T, Sehara-Fujisawa A, Ohno S, Mekada E. 1998. A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Embo J* 17:7260-7272.

Jackson LF, Qiu TH, Sunnarborg SW, Chang A, Zhang C, Patterson C, Lee DC. 2003. Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *Embo J* 22:2704-2716.

Jacobsen MD, Weil M, Raff MC. 1996. Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. *J Cell Biol* 133:1041-1051.

Jalkanen M. 1987. Biology of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Med Biol* 65:41-47.

Janes PW, Saha N, Barton WA, Kolev MV, Wimmer-Kleikamp SH, Nievergall E, Blobel CP, Himanen JP, Lackmann M, Nikolov DB. 2005. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* 123:291-304.

Janssen O, Qian J, Linkermann A, Kabelitz D. 2003. CD95 ligand- death factor and costimulatory molecule? *Cell Death Differ* 10:1215-1225.

Jodo S, Pidiyar VJ, Xiao S, Furusaki A, Sharma R, Koike T, Ju ST. 2005. Fas ligand (CD178) cytoplasmic tail is a positive regulator of Fas ligand-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 174:4470-4474.

Johannes FJ, Horn J, Link G, Haas E, Siemienski K, Wajant H, Pfizenmaier K. 1998. Protein kinase C $\mu$  downregulation of tumor-necrosis-factor-induced apoptosis correlates with enhanced expression of nuclear-factor-kappaB dependent protective genes. *Eur J Biochem* 257:47-54.

- Kaizu K, Maeda M, Ohkawa T, Hayashida M, Nakajima S, Sugisaki Y, Fukunaga Y. 2004. Marked elevation of soluble fas ligand and cytokine secretion after splenectomy in aggressive natural killer cell leukemia/lymphoma. *Leuk Lymphoma* 45:2291-2294.
- Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, Seiki M. 2001. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 153:893-904.
- Karray S, Kress C, Cuvellier S, Hue-Beauvais C, Damotte D, Babinet C, Levi-Strauss M. 2004. Complete loss of Fas ligand gene causes massive lymphoproliferation and early death, indicating a residual activity of gld allele. *J Immunol* 172:2118-2125.
- Kavurma MM, Khachigian LM. 2003. Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression. *Cell Death Differ* 10:36-44.
- Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H. 1995. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* 182:1777-1783.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
- Kessels MM, Qualmann B. 2004. The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J Cell Sci* 117:3077-3086.
- Kiener PA, Davis PM, Rankin BM, Klebanoff SJ, Ledbetter JA, Starling GC, Liles WC. 1997. Human monocytic cells contain high levels of intracellular Fas ligand: rapid release following cellular activation. *J Immunol* 159:1594-1598.
- Kirkham M, Fujita A, Chadda R, Nixon SJ, Kurzchalia TV, Sharma DK, Pagano RE, Hancock JF, Mayor S, Parton RG. 2005. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *J Cell Biol* 168:465- 476.
- Kirkin V, Cahuzac N, Guardiola-Serrano F, Huault S, Luckeath K, Friedmann E, Novac N, Wels WS, Martoglio B, Hueber AO, Zornig M. 2007. The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. *Cell Death Differ*.
- Kottirsch G, Koch G, Feifel R, Neumann U. 2002. Beta-aryl-succinic acid hydroxamates as dual inhibitors of matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor alpha converting enzyme. *J Med Chem* 45:2289-2293.
- Kubatzky KF, Ruan W, Gurezka R, Cohen J, Ketteler R, Watowich SS, Neumann D, Langosch D, Klingmuller U. 2001. Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor. *Curr Biol* 11:110-115.
- Lajoie P, Nabi IR. 2007. Regulation of raft-dependent endocytosis. *J Cell Mol Med* 11:644-653.
- Lau HT, Yu M, Fontana A, Stoeckert CJ, Jr. 1996. Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing FasL in mice. *Science* 273:109-112.

Lee DC, Sunnarborg SW, Hinkle CL, Myers TJ, Stevenson MY, Russell WE, Castner BJ, Gerhart MJ, Paxton RJ, Black RA, Chang A, Jackson LF. 2003. TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase. *Ann N Y Acad Sci* 995:22-38.

Lettau M, Qian J, Linkermann A, Latreille M, Larose L, Kabelitz D, Janssen O. 2006. The adaptor protein Nck interacts with Fas ligand: Guiding the death factor to the cytotoxic immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5911-5916.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.

Ludwig A, Hundhausen C, Lambert MH, Broadway N, Andrews RC, Bickett DM, Leesnitzer MA, Becherer JD. 2005. Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen* 8:161-171.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.

Mandal M, Maggirwar SB, Sharma N, Kaufmann SH, Sun SC, Kumar R. 1996. Bcl-2 prevents CD95 (Fas/APO-1)-induced degradation of lamin B and poly(ADP-ribose) polymerase and restores the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *J Biol Chem* 271:30354-30359.

Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P. 2005a. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9182-9187.

Maretzky T, Schulte M, Ludwig A, Rose-John S, Blobel C, Hartmann D, Altevogt P, Saftig P, 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. *Mol Cell Biol* 25:9040-9053.

Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Gamen S, Monle n I, Lasierra P, Larrad L, Pineiro A, Alava MA, Naval J. 1999. Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol* 163:1274-1281.

Martoglio B, Golde TE. 2003. Intramembrane-cleaving aspartic proteases and disease: presenilins, signal peptide peptidase and their homologs. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2:R201-206.

Maskos K, Fernandez-Catalan C, Huber R, Bourenkov GP, Bartunik H, Ellestad GA, Reddy P, Wolfson MF, Rauch CT, Castner BJ, Davis R, Clarke HR, Petersen M, Fitzner JN, Cerretti DP, March CJ, Paxton RJ, Black RA, Bode W. 1998. Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3408-3412.

Matsuno H, Yudoh K, Watanabe Y, Nakazawa F, Aono H, Kimura T. 2001. Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand. *J Rheumatol* 28:22-28.

Matthews V, Schuster B, Schutze S, Bussmeyer I, Ludwig A, Hundhausen C, Sadowski T, Saftig P, Hartmann D, Kallen KJ, Rose-John S. 2003. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem* 278:38829-38839.

Matthews V, Schuster B, Schutze S, Bussmeyer I, Ludwig A, Hundhausen C, Sadowski T, Saftig, Hartmann D, Kallen KJ, Rose-John S. 2003. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem* 278:38829-38839.

McNiven MA. 1998. Dynamin: a molecular motor with pinchase action. *Cell* 94:151-154.

Milla ME, Gonzales PE, Leonard JD. 2006. The TACE zymogen: re-examining the role of the cysteine switch. *Cell Biochem Biophys* 44:342-348.

Milla ME, Leesnitzer MA, Moss ML, Clay WC, Carter HL, Miller AB, Su JL, Lambert MH, Willard DH, Sheeley DM, Kost TA, Burkhardt W, Moyer M, Blackburn RK, Pahel GL, Mitchell JL, Hoffman CR, Becherer JD. 1999. Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factoralpha-converting enzyme (TACE). *J Biol Chem* 274:30563-30570.

Mitsiades N, Yu WH, Poulaki V, Tsokos M, Stamenkovic I. 2001. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res* 61:577-581.

Mochizuki S, Okada Y. 2007. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci* 98:621-628.

Modregger J, Ritter B, Witter B, Paulsson M, Plomann M. 2000. All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *J Cell Sci* 113 Pt 24:4511-4521.

Mohammed FF, Smookler DS, Taylor SE, Fingleton B, Kassiri Z, Sanchez OH, English JL, Matisian LM, Au B, Yeh WC, Khokha R. 2004. Abnormal TNFactivity in Timp3-/- mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. *Nat Genet* 36:969-977.

Mori S, Tanaka M, Nanba D, Nishiwaki E, Ishiguro H, Higashiyama S, Matsuura N. 2003. PACSIN3 binds ADAM12/meltrin alpha and up-regulates ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. *J Biol Chem* 278:46029-46034.

Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhardt W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Becherer JD, et al. 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385:733-736.

Mountz JD, Zhou T, Su X, Wu J, Cheng J. 1996. The role of programmed cell death as an emerging new concept for the pathogenesis of autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 80:S2-14.

Mullberg J, Althoff K, Jostock T, Rose-John S. 2000. The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *Eur Cytokine Netw* 11:27-38.

Muppidi JR, Siegel RM. 2004. Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. *Nat Immunol* 5:182-189.

Nachbur U, Kassahn D, Yousefi S, Legler DF, Brunner T. 2006. Posttranscriptional regulation of Fas (CD95) ligand killing activity by lipid rafts. *Blood* 107:2790- 2796.

Nagano O, Murakami D, Hartmann D, De Strooper B, Saftig P, Iwatsubo T, Nakajima M, Shinohara M, Saya H. 2004. Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *J Cell Biol* 165:893-902.

Nagata S, Suda T. 1995. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 16:39-43.

Nakamura H, Suenaga N, Taniwaki K, Matsuki H, Yonezawa K, Fujii M, Okada Y, Seiki M. 2004. Constitutive and induced CD44 shedding by ADAM-like proteases and membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 64:876-882.

Nguyen T, Russell J. 2001. The regulation of FasL expression during activationinduced cell death (AICD). *Immunology* 103:426-434.

Noel A, Gilles C, Bajou K, Devy L, Kebers F, Lewalle JM, Maquoi E, Munaut C, Remacle A, Foidart JM. 1997. Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion Metastasis* 17:221-239.

Nozawa K, Kayagaki N, Tokano Y, Yagita H, Okumura K, Hasimoto H. 1997. Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 40:1126-1129.

O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. 1996. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 184:1075-1082.

Ohtsu H, Dempsey PJ, Eguchi S. 2006. ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C1-10.

Orlinick JR, Elkon KB, Chao MV. 1997. Separate domains of the human fas ligand dictate self-association and receptor binding. *J Biol Chem* 272:32221-32229.

Orlinick JR, Vaishnav AK, Elkon KB. 1999. Structure and function of Fas/Fas ligand. *Int Rev Immunol* 18:293-308.

Ottolengo L, Tortolina G, Amelotti M, Dallegrì F. 1999. Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 162:3601-3606.

Owen-Schaub L, Chan H, Cusack JC, Roth J, Hill LL. 2000. Fas and Fas ligand interactions in malignant disease. *Int J Oncol* 17:5-12.

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:221-233.

Pan D, Rubin GM. 1997. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90:271-280.

Park SM, Schickel R, Peter ME. 2005. Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr Opin Cell Biol* 17:610- 616.

Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ, Black RA. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282:1281-1284.

Peter ME, Scaffidi C, Medema JP, Kischkel F, Krammer PH. 1999. The death receptors. *Results Probl Cell Differ* 23:25-63.

Phong MC, Gutwein P, Kadel S, Hexel K, Altevogt P, Linderkamp O, Brenner B. 2003. Molecular mechanisms of L-selectin-induced co-localization in rafts and shedding [corrected]. *Biochem Biophys Res Commun* 300:563-569.

Poghosyan Z, Robbins SM, Houslay MD, Webster A, Murphy G, Edwards DR. 2002. Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 277:4999-5007.

Powell RM, Wicks J, Holloway JW, Holgate ST, Davies DE. 2004. The splicing and fate of ADAM33 transcripts in primary human airways fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:13-21.

Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M, Matrisian LM. 1999. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol* 9:1441-1447.

Qian J, Chen W, Lettau M, Podda G, Zornig M, Kabelitz D, Janssen O. 2006. Regulation of FasL expression: a SH3 domain containing protein family involved in the lysosomal association of FasL. *Cell Signal* 18:1327-1337.

Reddy P, Slack JL, Davis R, Cerretti DP, Kozlosky CJ, Blanton RA, Shows D, Peschon JJ, Black RA. 2000. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem* 275:14608- 14614.

Reiss K, Ludwig A, Saftig P. 2006. Breaking up the tie: disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion. *Pharmacol Ther* 111:985-1006.

Reiss K, Maretzky T, Haas IG, Schulte M, Ludwig A, Frank M, Saftig P. 2006. Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gammaglobulin C3 modulates cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 281:21735- 21744.

- Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, Tousseyn T, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P. 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *Embo J* 24:742-752.
- Rensing-Ehl A, Frei K, Flury R, Matiba B, Mariani SM, Weller M, Aebischer P, Krammer PH, Fontana A. 1995. Local Fas/APO-1 (CD95) ligand-mediated tumor cell killing in vivo. *Eur J Immunol* 25:2253-2258.
- Rieux-Laucat F, Le Deist F, Fischer A. 2003. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death Differ* 10:124- 133.
- Roberts CM, Tani PH, Bridges LC, Laszik Z, Bowditch RD. 1999. MDC-L, a novel metalloprotease disintegrin cysteine-rich protein family member expressed by human lymphocytes. *J Biol Chem* 274:29251-29259.
- Rooke J, Pan D, Xu T, Rubin GM. 1996. KUZ, a conserved metalloproteasedisintegrin protein with two roles in Drosophila neurogenesis. *Science* 273:1227-1231.
- Rosendahl MS, Ko SC, Long DL, Brewer MT, Rosenzweig B, Hedl E, Anderson L, Pyle SM, Moreland J, Meyers MA, Kohno T, Lyons D, Lichenstein HS. 1997. Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. *J Biol Chem* 272:24588-24593..
- Rouvier E, Luciani MF, Golstein P. 1993. Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 177:195-200.
- Ruegg UT, Burgess GM. 1989. Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci* 10:218-220.
- Sadhukhan R, Sen GC, Ramchandran R, Sen I. 1998. The distal ectodomain of angiotensin-converting enzyme regulates its cleavage-secretion from the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:138-143.
- Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP. 2004. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* 164:769-779.
- Sato K, Kimura F, Nakamura Y, Murakami H, Yoshida M, Tanaka M, Nagata S, Kanatani Y, Wakimoto N, Nagata N, Motoyoshi K. 1996. An aggressive nasal lymphoma accompanied by high levels of soluble Fas ligand. *Br J Haematol* 94:379-382.
- Sawa M, Kiyo T, Kurokawa K, Kumihara H, Yamamoto M, Miyasaka T, Ito Y, Hirayama R, Inoue T, Kirii Y, Nishiwaki E, Ohmoto H, Maeda Y, Ishibushi E, Inoue Y, Yoshino K, Kondo H. 2002. New type of metalloproteinase inhibitor: design and synthesis of new phosphonamide-based hydroxamic acids. *J Med Chem* 45:919-929.
- Schimmelpfeng K, Gogel S, Klammt C. 2001. The function of leak and kuzbanian during growth cone and cell migration. *Mech Dev* 106:25-36.

Schneider P, Bodmer JL, Holler N, Mattmann C, Scuderi P, Terskikh A, Peitsch MC, Tschopp J. 1997. Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction. *J Biol Chem* 272:18827-18833.

Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J. 1998. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 187:1205-1213.

Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R. 1998. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393:382-386.

Schulte M, Reiss K, Lettau M, Maretzky T, Ludwig A, Hartmann D, de Strooper B, Janssen O, Saftig P. 2007. ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death Differ* 14:1040-1049.

Scott DW, Grdina T, Shi Y. 1996. T cells commit suicide, but B cells are murdered! *J Immunol* 156:2352-2356.

Seals DF, Courtneidge SA. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17:7-30.

Seino K, Iwabuchi K, Kayagaki N, Miyata R, Nagaoka I, Matsuzawa A, Fukao K, Yagita H, Okumura K. 1998. Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. *J Immunol* 161:4484-4488.

Shi W, Chen H, Sun J, Buckley S, Zhao J, Anderson KD, Williams RG, Warburton D. 2003. TACE is required for fetal murine cardiac development and modeling. *Dev Biol* 261:371-380.

Sisodia SS. 1992. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6075-6079.

Smith KM, Gaultier A, Cousin H, Alfandari D, White JM, DeSimone DW. 2002. The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. *J Cell Biol* 159:893-902.

Solomon KA, Pesti N, Wu G, Newton RC. 1999. Cutting edge: a dominant negative form of TNF-alpha converting enzyme inhibits proTNF and TNFRII secretion. *J Immunol* 163:4105-4108.

Soond SM, Everson B, Riches DW, Murphy G. 2005. ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci* 118:2371-2380.

Soond SM, Everson B, Riches DW, Murphy G. 2005. ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci* 118:2371-2380.

Sotillos S, Roch F, Campuzano S. 1997. The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Development*

124:4769-4779.

Stefanidakis M, Koivunen E. 2006. Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood* 108:1441-1450.

Steiner H, Haass C. 2000. Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:217-224.

Steinhusen U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K, Huber O. 2001. Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J Biol Chem* 276:4972-4980.

Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. 1997. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med* 186:2045-2050.

Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K, Nagata S. 1995. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol* 154:3806- 3813.

Sun M, Ames KT, Suzuki I, Fink PJ. 2006. The cytoplasmic domain of Fas ligand costimulates TCR signals. *J Immunol* 177:1481-1491.

Suzuki I, Fink PJ. 1998. Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signaling through Fas ligand. *J Exp Med* 187:123-128.

Suzuki I, Martin S, Boursalian TE, Beers C, Fink PJ. 2000. Fas ligand costimulates the in vivo proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol* 165:5537-5543.

Suzuki N, Ichino M, Mihara S, Kaneko S, Sakane T. 1998. Inhibition of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of lymphocytes in vitro by circulating anti-Fas ligand autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41:344-353.

Takeda S, Igarashi T, Mori H, Araki S. 2006. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *Embo J* 25:2388-2396.

Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. 1998. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 4:31-36. Tanaka M, Nanba D, Mori S, Shiba F, Ishiguro H, Yoshino K, Matsuura N, Higashiyama S. 2004. ADAM binding protein Eve-1 is required for ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands. *J Biol Chem* 279:41950-41959.

Tanaka M, Suda T, Haze K, Nakamura N, Sato K, Kimura F, Motoyoshi K, Mizuki M, Tagawa S, Ohga S, Hatake K, Drummond AH, Nagata S. 1996. Fas ligand in human serum. *Nat Med* 2:317-322.

Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. 1995. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *Embo J* 14:1129- 1135.

Taylor DD, Gercel-Taylor C. 2005. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *Br J Cancer* 92:305-311.

Thornhill PB, Cohn JB, Drury G, Stanford WL, Bernstein A, Desbarats J. 2007. A proteomic screen reveals novel Fas ligand interacting proteins within nervous system Schwann cells. *FEBS Lett* 581:4455-4462.

Toyozaki T, Hiroe M, Tanaka M, Nagata S, Ohwada H, Marumo F. 1998. Levels of soluble Fas ligand in myocarditis. *Am J Cardiol* 82:246-248.

Trambas CM, Griffiths GM. 2003. Delivering the kiss of death. *Nat Immunol* 4:399- 403.

Tsujita K, Suetsugu S, Sasaki N, Furutani M, Oikawa T, Takenawa T. 2006.

Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J Cell Biol* 172:269-279.

van der Bliek AM, Redelmeier TE, Damke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM, Schmid SL. 1993. Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol* 122:553-563.

Vargo-Gogola T, Crawford HC, Fingleton B, Matrisian LM. 2002a. Identification of novel matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) cleavage sites in murine and human Fas ligand. *Arch Biochem Biophys* 408:155-161.

Vargo-Gogola T, Fingleton B, Crawford HC, Matrisian LM. 2002b. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) selects for apoptosis-resistant mammary cells in vivo. *Cancer Res* 62:5559-5563.

von Tresckow B, Kallen KJ, von Strandmann EP, Borchmann P, Lange H, Engert A, Hansen HP. 2004. Depletion of cellular cholesterol and lipid rafts increases shedding of CD30. *J Immunol* 172:4324-4331.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. 2003. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:53-66.

Wakatsuki S, Kurisaki T, Sehara-Fujisawa A. 2004. Lipid rafts identified as locations of ectodomain shedding mediated by Meltrin beta/ADAM19. *J Neurochem* 89:119-123.

Walcheck B, Herrera AH, St Hill C, Mattila PE, Whitney AR, Deleo FR. 2006. ADAM17 activity during human neutrophil activation and apoptosis. *Eur J Immunol* 36:968-976.

Wang R, Zhang L, Zhang X, Moreno J, Luo X, Tondravi M, Shi Y. 2001. Differential regulation of the expression of CD95 ligand, receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), and TNF-alpha during T cell activation. *J Immunol* 166:1983-1990.

Wen C, Metzstein MM, Greenwald I. 1997. SUP-17, a *Caenorhabditis elegans* ADAM protein related to *Drosophila* KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling. *Development* 124:4759-4767.

Wenzel J, Sanzenbacher R, Ghadimi M, Lewitzky M, Zhou Q, Kaplan DR, KabelitzD, Feller SM, Janssen O. 2001. Multiple interactions of the cytosolic polyproline region of the CD95

ligand: hints for the reverse signal transduction capacity of a death factor. FEBS Lett 509:255-262.

Weskamp G, Cai H, Brodie TA, Higashyama S, Manova K, Ludwig T, Blobel CP. 2002. Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. Mol Cell Biol 22:1537-1544.

Weskamp G, Ford JW, Sturgill J, Martin S, Docherty AJ, Swendeman S, Broadway N, Hartmann D, Saftig P, Umland S, Sehara-Fujisawa A, Black RA, Ludwig A, Becherer JD, Conrad DH, Blobel CP. 2006. ADAM10 is a principal 'sheddase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. Nat Immunol 7:1293-1298.

Weskamp G, Ford JW, Sturgill J, Martin S, Docherty AJ, Swendeman S, Broadway N, Hartmann D, Saftig P, Umland S, Sehara-Fujisawa A, Black RA, Ludwig A, Becherer JD, Conrad DH, Blobel CP. 2006. ADAM10 is a principal 'sheddase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. Nat Immunol 7:1293-1298.

Wild-Bode C, Fellerer K, Kugler J, Haass C, Capell A. 2006. A basolateral sorting signal directs ADAM10 to adherens junctions and is required for its function in cell migration. J Biol Chem 281:23824-23829.

Yan Y, Shirakabe K, Werb Z. 2002. The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. J Cell Biol 158:221-226.

Yavari R, Adida C, Bray-Ward P, Brines M, Xu T. 1998. Human metalloprotease-disintegrin Kuzbanian regulates sympathoadrenal cell fate in development and neoplasia. Hum Mol Genet 7:1161-1167.

Zhao J, Chen H, Wang YL, Warburton D. 2001. Abrogation of tumor necrosis factoralpha converting enzyme inhibits embryonic lung morphogenesis in culture. Int J Dev Biol 45:623-631.

Zheng Y, Saftig P, Hartmann D, Blobel C. 2004. Evaluation of the contribution of different ADAMs to tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) shedding and of the function of the TNFalpha ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by the TNFalpha convertase (TACE/ADAM17). J Biol Chem

Zheng Y, Schlondorff J, Blobel CP. 2002. Evidence for regulation of the tumor necrosis factor alpha-convertase (TACE) by protein-tyrosine phosphatase PTPH1. J Biol Chem 277:42463-42470.

Zuccato E, Blott EJ, Holt O, Sigismund S, Shaw M, Bossi G, Griffiths GM. 2007. Sorting of Fas ligand to secretory lysosomes is regulated by monoubiquitylation and phosphorylation. J Cell Sci 120:191-199.

## 9 Anhang

### 9.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Paul Saftig für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Doktorarbeit in seinem Labor und der Überlassung des interessanten Themas bedanken. Er hat durch sein Interesse an dieser Arbeit, seine stetige Unterstützung sowie der Gewährung von wissenschaftlichen Freiheiten, die optimalen Rahmenbedingungen geschaffen, die ein erfolgreiches und zugleich angenehmes Arbeiten erst möglich machten.

Bei Herrn Professor Scheidig möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Frau Professorin Karina Reiß bin ich zu großem Dank verpflichtet. Auf ihre Unterstützung konnte ich mich jederzeit verlassen. Die gemeinsam erlebten wissenschaftlichen Fortschritte und auch Rückschläge haben die letzten drei Jahre für mich zu einer sehr spannenden Zeit gemacht.

Herrn Professor Ottmar Janssen und Herrn Dr. Marcus Lettau danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung des des Fas Ligand-*Sheddings*.

Bei Herrn Dr. Michael Schwake und Frau Dr. Judith Blanz möchte ich mich für den regen Austausch an Ideen, Tipps und Heringen bedanken, wobei jeder das gegeben hat, was er konnte. Mia Schmiedt gebührt Dank für die große Hilfe bei der Klonierung der kleinen Chimären-Konstrukte.

Stellvertretend für die verrückten Freaks, die im Biochemischen Institut wohnen oder wohnten, möchte ich Andrea Rittger, Alexander Schneede, Kathi Stiebeling, Marlies Rusch, Jenny Schröder, Maike Kanter, Cathrin Claussen, Thorsten Maretzky, Christian Beimgraben (ja, ich habe Dir einen *Chicken Wing* gemopst) und Marion Willenborg nennen und mich für eine tolle Zeit bedanken.

Athena und Georg sei gedankt für die Unterstützung beim Schreiben dieser Arbeit. Und auch darüber hinaus.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die sehr dazu beigetragen haben, die letzten Jahre überaus lebensfroh gestalten zu können.

Der größte Dank gebührt meinen lieben Eltern, auf deren Unterstützung ich immer vertrauen durfte. Ich liebe Euch.

## 9.2 Curriculum vitae

### Lebenslauf

Name: Marc Schulte  
Geburtsdatum: 9. November 1977  
Geburtsort: Halle/Westf.  
Familienstand: ledig  
Wohnort: Holtenauer Str. 194, 24105 Kiel

### Schulausbildung

1984-1988 Grundschule Steinhagen/Amshausen  
1988-1997 Kreisgymnasium Halle/Westf.

### Zivildienst

1997-1998 Zivildienst bei der Johanniter-Unfall-Hilfe als Rettungssanitäter

### Studium

1998-2003 Studium der Biologie an der Technischen Universität Braunschweig  
Abschluß als Diplom-Biologe

2002 fünfmonatiges Forschungs-Praktikum an der University of Queensland, Brisbane, Australien, am Institut für Mikrobiologie und Parasitologie, Professor Alastair McEwan

2003 Diplomprüfung in Zellbiologie, Genetik und Botanik  
Diplomarbeit in der Gruppe von Professor Ralf Mendel: „Die Funktion von *Rhodobacter capsulatus* XdhC für die Xanthinhydrogenase“

09/2003: dreiwöchiger Forschungsaufenthalt an der Ohio State University in Columbus, USA, am Institut für Molekulare und Zelluläre Biochemie, Professor Russ Hille

seit 08/2004: Doktorarbeit im Institut für Biochemie, Uni-Kiel, Professor Paul Saftig

## Publikationen

**Schulte M**, Reiss K, Lettau M, Maretzky T, Ludwig A, Hartmann D, de Strooper B, Janssen O, Saftig P. 2007. ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. **Cell Death Differ** 14(5):1040-9.

Neumann M, **Schulte M**, Junemann N, Stocklein W, Leimkuhler S. 2006. Rhodobacter capsulatus XdhC is involved in Molybdenum Cofactor Binding and Insertion into Xanthine Dehydrogenase. **J Biol Chem** 281(23):15701-8.

Reiss K, Maretzky T, Haas IG, **Schulte M**, Ludwig A, Frank M, Saftig P. 2006. Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gammaglobulin C3 modulates cell-cell adhesion. **J Biol Chem** 281:21735- 21744.

Maretzky T, **Schulte M**, Ludwig A, Rose-John S, Blobel C, Hartmann D, Altevogt P, Saftig P, 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. **Mol Cell Biol** 25:9040-9053.

### **9.3 Erklärung**

#### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Marc Schulte, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Anleitung meiner akademischen Lehrer angefertigt habe.

Diese Dissertation wurde bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt.

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

Kiel, den 24.10.2007

Marc Schulte