

**Proteolytische Freisetzung des
humanen
T Cell Immunoglobulin and Mucin Domain
(TIM)-3 durch die Metalloproteasen
ADAM10 und ADAM17**

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

vorgelegt von

Katja Möller-Hackbarth

geb. Möller

Kiel, 2013

Erster Gutachter: Prof. Dr. Stefan Rose-John

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 26.09.2013

Zum Druck genehmigt: 26.09.2013

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Protein-Ektodomänen- <i>Shedding</i>	1
1.2 Die T cell Immunoglobulin and Mucin Domain (Tim)-Familie	2
1.2.1 Die löslichen Proteine der Tim-Familie	5
1.3 Tim-3	6
1.3.1 Struktur und Expression	6
1.4 Der Rezeptor Tim-3.....	7
1.4.1 Biologische Funktionen	8
1.5 Die Familie der ADAM-Proteasen	11
1.5.1 ADAM10	13
1.5.2 ADAM17	14
1.6 Ziel dieser Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Antibiotika	18
2.1.2 Antikörper.....	18
2.1.3 Chemikalien.....	19
2.1.4 Enzyme	19
2.1.5 Größenmarker	19
2.1.6 Kits.....	20
2.1.7 Puffer und Lösungen.....	20
2.1.8 Kulturmedien	24
2.1.9 Zelllinien.....	25
2.1.10 Oligonukleotide	27
2.1.11 Plasmide.....	28
2.2 Methoden	29
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	29
2.2.2 Zellkultur	33
2.2.3 Protein-biochemische Methoden	35
2.2.4 Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen Tim-3.....	38
2.2.5 Isolierung primärer Monozyten/Makrophagen aus humanem Blut.....	41
2.2.6 Statistische Analyse	43
3. Ergebnisse.....	44
3.1 Herstellung und Reinigung eines monoklonalen Antikörpers gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins.....	44
3.2 Generierung von Expressionsplasmiden für das humane Tim-3.....	49

3.3	ADAM10 und ADAM17 prozessieren humanes Tim-3	52
3.4	Analyse des Tim-3 <i>Sheddings</i> in ADAM10- und ADAM17-Protease-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)	55
3.5	PMA-induziertes <i>Shedding</i> von Tim-3 konnte durch die Deletion von zehn Aminosäuren der Mucin-Domäne verhindert werden	56
3.6	Generierung von Expressionsplasmiden für das humane Tim-3 ohne intrazelluläre Domäne und intrazelluläre Deletionsmutanten	60
3.7	Analyse der intrazellulären Domäne von Tim-3	61
3.8	Calmodulin reguliert die Tim-3 Expression auf der Zelloberfläche.....	65
3.9	PMA- und Ionomycin-induziertes <i>Shedding</i> des endogenen Tim-3 von primären humanen CD14 ⁺ Monozyten	71
3.10	<i>Toll-like</i> Rezeptor (TLR)-Aktivierung von CD14 ⁺ Monozyten führt zum ADAM10-vermittelten <i>Shedding</i> von Tim-3	72
4.	Diskussion.....	77
4.1	Das humane Tim-3 wird von ADAM10 und ADAM17 proteolytisch prozessiert	77
4.2	Einfluss der intrazellulären Domäne von Tim-3 auf die Regulation des Ektodomänen- <i>Sheddings</i>	81
4.3	Proteolytische Spaltung des endogenen Tim-3 in primären humanen CD14 ⁺ Monozyten.....	88
4.4	Ausblick.....	91
5.	Zusammenfassung	93
6.	Summary	95
7.	Anhang.....	96
7.1	Literaturverzeichnis.....	96
7.2	Abbildungsverzeichnis	109
7.3	Tabellenverzeichnis.....	112
7.4	Abkürzungsverzeichnis	112
7.5	Plasmidkarten	115
7.6	Publikationen.....	132
7.7	Lebenslauf	133
7.8	Danksagung	134
7.9	Eidesstattliche Erklärung.....	135

1. Einleitung

1.1 Protein-Ektodomänen-*Shedding*

Als Ektodomänen-*Shedding* wird die proteolytische Freisetzung extrazellulärer Bereiche (Ektodomänen) membranständiger Proteine durch Proteasen bezeichnet. Dieser enzymatische Spaltungsprozess dient der post-translationalen Regulation vieler membrangebundener Proteine. Er erfolgt entweder konstitutiv im nicht aktivierten Zustand der Zelle oder kann durch die Aktivierung der Zelle stimuliert werden (Arribas and Borroto, 2002; Black et al., 1997; Hansen et al., 2000). Bei diesem Prozess werden membrangebundene Proteine nahe der Zellmembran gespalten. Auf diese Weise werden physiologisch aktive, lösliche Fragmente generiert, die dann para- und/oder autokrine Signalfunktionen haben können (Blobel, 2005; Hooper et al., 1997). Das Ektodomänen-*Shedding* ist ein streng regulierter Prozess, der eine Kaskade von intrazellulären Signalwegen involviert (Hayashida et al., 2010). Tatsächlich werden schätzungsweise bis zu 10% aller Zelloberflächenproteine proteolytisch gespalten (Scheller et al., 2011b).

Darunter finden sich viele strukturell und funktionell unterschiedliche Moleküle, so zum Beispiel Zytokine wie *Tumor Necrosis Factor* (TNF) α , Adhäsionsmoleküle wie L-Selektin und Wachstumsfaktoren wie *Tumor Growth Factor* (TGF) α . Desweiteren werden Rezeptoren wie der Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R), ErbB2 und 4, *Tumor Necrosis Factor Receptor* (TNFR) I und II sowie eine Zahl anderer Proteine wie das *amyloid- β precursor protein* (APP) ebenfalls proteolytisch gespalten (Blobel, 2005). Die physiologischen Konsequenzen sind vielfältig und wesentlich. So kann das Ektodomänen-*Shedding* eines Rezeptors beispielsweise zu dessen Inaktivierung führen und die Zellen ihre Ansprechbarkeit für dessen Liganden verlieren.

Auf der anderen Seite kann die lösliche Form des Rezeptors agonistische und antagonistische Funktionen ausüben (Müllberg et al., 2000). Ein gut untersuchtes Beispiel der Funktionen eines löslichen Rezeptors, ist das IL-6-*Trans-signalling*. Bei diesem Prozess kann der lösliche Interleukin-6-Rezeptor (sIL-6R) seinen Liganden, IL-6, binden und im IL-6/sIL-6R-Komplex Zellen aktivieren, die keinen IL-6R besitzen (Rose-John and Heinrich, 1994).

Im Allgemeinen können die Konsequenzen des Ektodomänen-*Sheddings* in Abhängigkeit von der Funktion des Substrates stark variieren (Blobel, 2005). Beispielsweise wird der Rezeptor Notch-1 durch das Ektodomänen-*Shedding* aktiviert. Hier bewirkt die enzymatische Proteolyse in Membrannähe eine zweite Presenilinkomplex-abhängige Spaltung in der Transmembrandomäne (Hartmann et al., 2002b). Dieser als *Regulated Intramembrane Proteolysis* (RIP) bezeichnete Prozess ist vor allem für ADAM10- aber auch für ADAM17-Substrate bekannt. Das sogenannte RIPPING, durch γ -Sekretasen oder *Signal peptide peptidase like* (SPPL)-Proteasen, trennt die Transmembrandomäne von der cytoplasmatische Domäne, welche den Zellkern erreichen kann, um dort anschließend indirekt oder direkt an der transkriptionellen Regulation von spezifischen Zielgenen mitzuwirken (Brown et al., 2000; De Strooper et al., 2010; Fluhner et al., 2008; Kopan and Ilagan, 2009; Xia and Wolfe, 2003).

Die Disintegrin-ähnlichen Proteasen, *A Disintegrin And Metalloproteinases* (ADAMs) und die *Matrix Metalloproteinases* (MMPs), zählen zu den am besten charakterisierten Enzymen, die in den Prozess des Ektodomänen-*Sheddings* involviert sind (Arribas and Borroto, 2002).

Obwohl sie wichtige Rollen bei physiologischen und pathologischen *Shedding*-Prozessen innehaben, bleiben sowohl ihre Substratspezifität und als auch die Regulationsmechanismen ihrer Aktivität unzureichend geklärt.

1.2 Die T cell Immunoglobulin and Mucin Domain (Tim)-Familie

Die *T cell immunoglobulin and mucin* (Tim)-Genfamilie wurde im Jahr 2001 aus dem *Tapr* (*T-cell and airway phenotype regulator*)-Lokus als neue Allergie- und Asthma-Anfälligkeitgene kloniert (McIntire et al., 2001). Das erste identifizierte Tim-Gen, war Tim-1, welches in Leber und Nieren exprimiert wird. Dieses wurde bereits 1996 als Rezeptor für *Hepatitis A virus cellular receptor 1* (HAVCR-1) in Affen identifiziert (Kaplan et al., 1996), bevor es 1998 im Menschen als *Kidney injury molecule -1* (Kim-1) bei der Analyse von ischemischen Nierenzellen entdeckt wurde (Feigelsstock et al., 1998). Die Tim-Genfamilie besteht aus acht murinen (mTim-1 bis -8) und drei humanen (hTim-1, hTim-3 und hTim-4) Mitgliedern (McIntire et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die drei humanen Mitglieder in ihrer Expression, Funktion und Struktur ortholog sind zu den in der Maus gefundenen Mitgliedern mTim-1, mTim-3 und mTim-4 (Abbildung 1). Die Gene der murinen Tim-Familienmitglieder befinden sich auf Chromosom 11B1.1. Die drei humanen Gene sind im menschlichen Genom auf Chromosom 5q33.2 lokalisiert. Diese chromosomalen Regionen wurden wiederholt mit Asthma, Allergien und Autoimmunität in Verbindung gebracht (McIntire et al., 2004). Die weiteren Tim-Gene wurden ausschließlich in Nagetieren gefunden (Kuchroo et al., 2003).

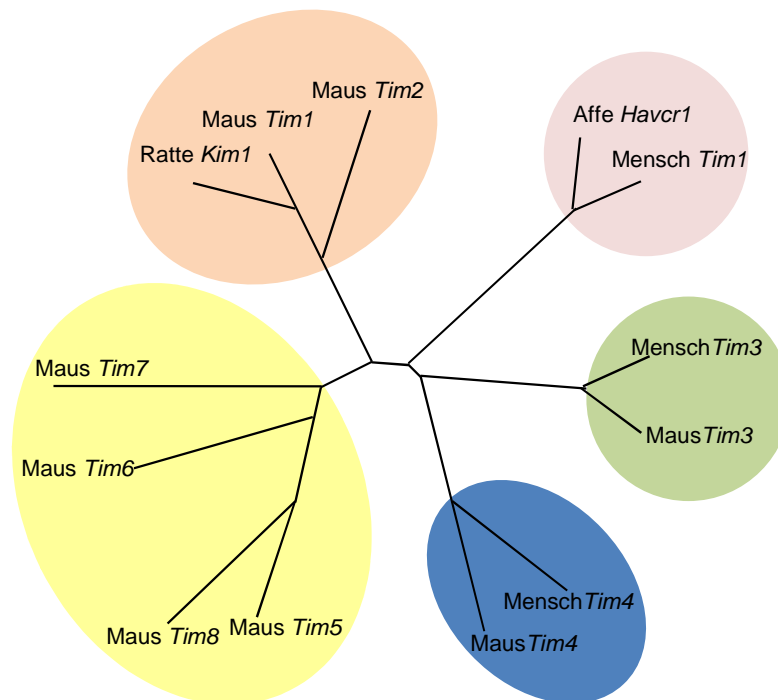


Abbildung 1: Dendrogramm der Sequenzähnlichkeit der Tim-Genfamilie basierend auf Sequenz-Alignments. Die Sequenzähnlichkeit ist proportional zur Länge der Verbindungslinien. Havcr, hepatitis A virus cellular receptor; Kim1, kidney injury molecule 1; Tim, T cell immunoglobulin and mucin.

Der Aufbau der Tim-Proteine ist konserviert. Alle Mitglieder der Tim-Familie sind Typ-I-Zelloberflächenglykoproteine, die eine N-terminale variable Immunoglobulin (IgV)-like Domäne besitzen, gefolgt von einer Mucin-Domäne, die viele O- und N-gebundene Glykosylierungen aufweist.

Die Größe der Mucin-Domäne variiert zwischen den Familienmitgliedern, aber alle enthalten mehrfach die Aminosäuren Threonin, Serin und Prolin. Desweiteren besitzen die Mitglieder der Tim-Proteinfamilie eine Transmembrandomäne und eine cytoplasmatische Domäne mit einem Tyrosinphosphorylierungsmotiv. Nur Tim-4 besitzt kein Tyrosinphosphorylierungsmotiv in dieser Region (McIntire et al., 2004). Die cytoplasmatische Domäne besteht aus 42 bis 77 Aminosäuren und ist die am stärksten konservierte Domäne zwischen Maus und Mensch (Abbildung 2).

Die N-terminale IgV-like Domäne der Tim-Proteine besitzt eine von zwei hydrophoben Loops umgebene Tasche, die der Bindung von Substraten dient. Die Tim-IgV-Domänen bestehen aus zwei antiparallelen β -Faltblättern, die sechs konservierte Cysteinreste enthalten. Diese bilden insgesamt drei Disulfidbrücken, die der IgV-Domäne ihre typische Struktur verleihen und dadurch zur Erkennung und Bindung von Liganden beitragen. (DeKruyff et al., 2010). Die dennoch vorhandenen strukturellen Unterschiede und die Motivvariationen innerhalb der Tim-Familie zeigen, dass sich die intrazellulären Signalwege infolge der Ligandenbindung, zwischen den individuellen Tim-Rezeptoren stark unterscheiden (Kuchroo et al., 2003).

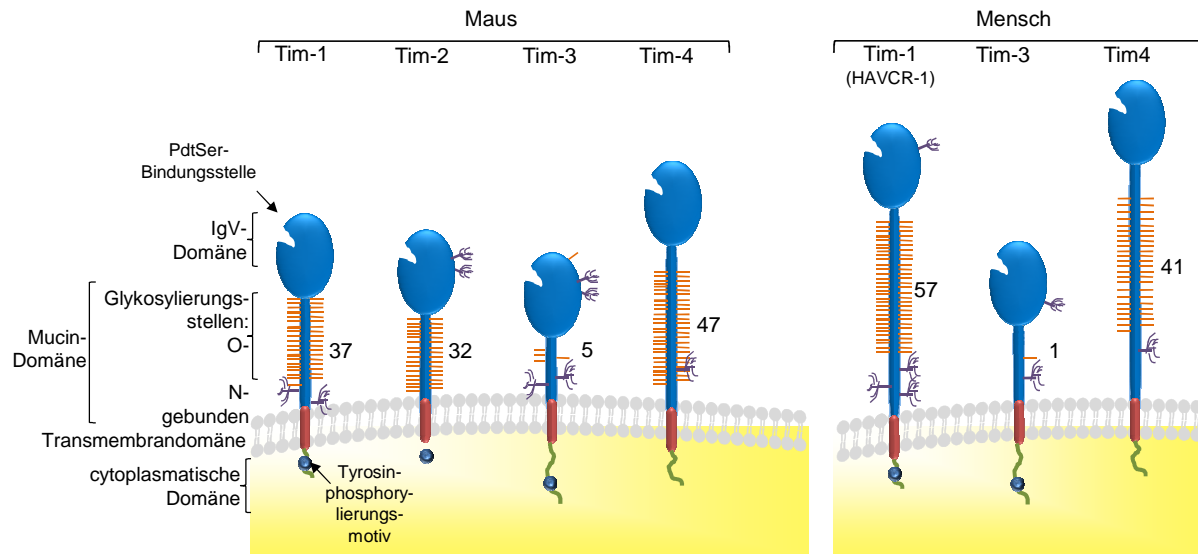


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Tim-Proteinstruktur. Die Tim-Genfamilie besteht aus acht murinen (mTim-1 bis -8) und drei humanen (hTim-1, hTim-3 und hTim-4) Mitgliedern. Alle Mitglieder sind Typ-I-Oberflächenrezeptoren und bestehen aus einer N-terminalen IgV-Domäne, die eine Phosphatidylserin (PtdSer)-Bindungsstelle besitzen, gefolgt von einer unterschiedlich stark glykosylierten Mucin-Domäne, sowie einer Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Domäne, die bis auf Tim-4 jeweils ein Tyrosin-Kinase-Phosphorylierungsmotiv enthält (Freeman et al., 2010). HAVCR, *hepatitis A virus cellular receptor*; Tim, *T cell immunoglobulin and mucin*.

Tim-1, Tim-3 und Tim-4 sind *pattern recognition receptors* (PRRs), die mit Phosphatidylserin (PtdSer) interagieren können (Santiago et al., 2007). PtdSer ist normalerweise an der Innenseite der Plasmamembran einer Zelle lokalisiert. Kommt es allerdings zur Aktivierung, Verletzung oder Apoptose einer Zelle, wird PtdSer auf die Außenseite der Membran „geklappt“. Die Exposition des PtdSer dient als wichtiges Signal zur Phagozytose dieser Zellen (Fadok et al., 1992; Verhoven et al., 1995). Die Erkennung apoptotischer Zellen ist ein essentieller Mechanismus für die Homöostase und Immunregulation (Savill et al., 2002).

Tim-1, Tim-3 und Tim-4 unterscheiden sich, trotz ihrer großen Übereinstimmungen im Aufbau, in ihren Expressionsmustern.

Tim-1 ist vorwiegend auf CD4⁺ T-Helfer-Typ-2 (T_H2)-Zellen exprimiert, wo es die T-Zell-Aktivierung stimuliert (Umetsu et al., 2005). Tim-3 wird hingegen hauptsächlich auf CD4⁺ T-Helfer-Typ-1 (T_H1)-Zellen und auf differenzierten Typ-1 CD8⁺ cytotoxischen T-Zellen (T_c1-Zellen) exprimiert, um Apoptosesignale zu generieren (Zhu et al., 2005). Tim-4 wird ausschließlich auf Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) exprimiert, wo es die Phagozytose von apoptotischen Zellen vermittelt und eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Toleranz spielt (Kobayashi et al., 2007; Miyanishi et al., 2007). Die Tim-Genfamilie hat somit eine wichtige Funktion bei der Regulation von Immunantworten wie der Toleranz gegenüber Transplantaten, Autoimmunität, der Regulation von Allergien und Asthma sowie der Antwort auf virale Infektionen (Rodriguez-Manzanet et al., 2009; Su et al., 2008).

1.2.1 Die löslichen Proteine der Tim-Familie

Viele co-stimulatorische Moleküle und immunregulatorische Rezeptoren, wie CD86, Fas und *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen (CTLA)-4*, kommen natürlicherweise auch als lösliche Varianten vor, die zur Kontrolle der Immunantwort sowie für die Empfindlichkeit und die Widerstandsfähigkeit gegenüber Autoimmunerkrankungen wichtig sind (Cheng et al., 1994; Jeannin et al., 2000; Oaks and Hallett, 2000). So wurde auch eine lösliche Form von Tim-1 beschrieben, die in der juxtamembranen Region proteolytisch gespalten wird. Das lösliche Tim-1, auch als Kim-1 bekannt, wird bei einer akuten Nierenerkrankung enzymatisch prozessiert und dient als Marker im Urin und Gewebe von Patienten mit Nierenzellkarzinom (Han et al., 2005). *In vitro*-Studien ergaben, dass die Aktivierung des p38/*mitogen-activated proteinkinase* (MAPK)-Signalwegs durch den Tyrosinphosphatase-Inhibitor Pervanadat zur Freisetzung des löslichen Tim-1 führte, während das konstitutive Ektodomänen-*Shedding* über den *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK)-MAPK-Signalweg reguliert wurde. Beide Arten der proteolytischen Spaltung konnten durch den Einsatz eines Metalloprotease-Inhibitors gehemmt werden (Zhang et al., 2007).

Auch die Zellaktivierung mittels Phorbol-12-myristate-13-acetat (PMA) und die Stimulation mit Ionomycin führte zum Metalloprotease-vermittelten *Shedding* (Bailly et al., 2002). Darauf folgende Analysen beschäftigten sich mit den beteiligten Proteasen (Guo et al., 2012). So ergaben *Polymerase chain reaction* (PCR)-*Arrayscreenings* der MMP-Expression in *proximal tubular epithelial cells* (PTEC) infolge der *human serum albumin* (HSA)- oder TNF α -Aktivierung, sowie Blockadeexperimente mit Hilfe von Antikörpern und *small interfering Ribonucleic acid* (siRNA), dass sowohl das konstitutive als auch das induzierte *Shedding* von Tim-1 durch MMP-3 vermittelt wird (Lim et al., 2012a). Bisher wurden für die weiteren Mitglieder der Tim-Familie keine weiteren, durch Ektodomänen-*Shedding* entstandenen, löslichen Formen nachgewiesen.

Allerdings fanden Sabatos et al. 2003, bei der Amplifikation der murinen Tim-3-cDNA (*complementary Deoxy-ribonucleic acid*) von Conavalin-A-aktivierten Milzzellen, zusätzlich zur *full-length* Form des Tim-3 (flTim-3) eine weitere um etwa 200 Basenpaare (bp) kleinere Variante. Die Analyse der Aminosäuresequenz ergab, dass es sich bei dieser Variante um eine alternative *Spliceform* handelt, der die für die Mucin- und Transmembran-Domäne kodierenden Exons 3, 4 und 5 fehlten. Somit kodierte diese Variante für eine lösliche Form des Tim-3 (sTim-3). Zur Untersuchung der Funktion des löslichen Tim-3 generierten sie ein lösliches Tim-3-Ig-Fusionsprotein (sTim-3-Ig), bestehend aus der IgV-Domäne von Tim-3 gebunden an ein humanes IgG1-Fc-Protein. Anhand von Proteolipid-Protein (PLP)-immunisierten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit sTim-3-Ig eine Hyperproliferation von T-Zellen und die spontane Produktion von T-Zell-Zytokinen induzierte. Außerdem wurde in dieser Studie gezeigt, dass auch das sTim-3-Ig an T-Zellen binden kann und einen regulatorischen Effekt auf Auto- und Alloimmunantworten haben könnte (Sabatos et al., 2003). Ferner wurde spekuliert, ob das lösliche Tim-3 zur Blockade der inhibitorischen Tim-3-Effekte beitragen könnte (Sanchez-Fueyo et al., 2003). Weitere Analysen der löslichen *Splicevariante* ergaben, dass die sTim-3-mRNA (*messenger RNA*) nur in Milzzellen exprimiert wird, was auf eine hauptsächliche Funktion bei Immunantworten hindeutet. Diese Hypothese wurde dadurch bestätigt, dass die Expression des löslichen Tim-3-Proteins durch die Aktivierung von Lymphozyten hochreguliert werden konnte. Da der Tim-3-Signalweg,

wie in Abschnitt 1.4.1 beschrieben, eine Rolle bei der Regulation des Tumorwachstums spielt, wurde angenommen, dass das lösliche Tim-3 diesen Signalweg blockieren könnte und so, durch die Förderung der Ausbreitung und Differenzierung von T-Zellen, inhibitorisch auf das Tumorwachstum wirkt. *In vivo*-Studien ergaben allerdings, dass sTim-3 zwar nicht direkt mit den Tumorzellen interagiert, aber deren Wachstum über einen bisher ungeklärten Mechanismus erleichtert und das Überleben von tumortragenden Mäusen durch sTim-3 reduziert wurde. Auch die T-Zellzahl war im Tumorgewebe signifikant reduziert. Somit scheint das lösliche Tim-3 einen inhibitorischen Effekt auf die Immunantwort auszuüben, indem es die Expression von T-Zell-spezifischen Zytokinen, wie Interleukin-2 (IL-2) und Interferon (IFN) γ , vermindert und somit wahrscheinlich die Aktivierung oder die Entwicklung von naiven T-Zellen zu Effektor-T-Zellen inhibiert.

Zusammenfassend scheint die Interaktion zwischen dem löslichen Tim-3 und seinem putativen Liganden die Aktivierung von naiven T-Zellen zu inhibieren. Eine mögliche physiologische Funktion von sTim-3 könnte der Schutz vor einer späteren Aktivierung von naiven T-Zellen sein, um in späteren Phasen die Balance der Immunantwort aufrechtzuerhalten.

Zhang et al. zeigten, dass Tim-3 auf primären humanen CD14⁺ Monozyten/Makrophagen exprimiert wird, aber diese Expression nach der Stimulation der Toll-like-Rezeptor (TLR)-Aktivierung mit Lipopolysaccharid (LPS) stark herunterreguliert wird. Zeitgleich wurde die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF α und IL-12, erhöht. Dies deutet auf eine regulatorische Rolle von Tim-3 im angeborenen Immunsystem hin (Zhang et al., 2012). Da in einem Sepsis-Modell gezeigt wurde, dass LPS zur Aktivierung von ADAM17 führte, könnte diese schnelle Herunterregulation des Rezeptors nach der TLR-Aktivierung durch LPS auf ein mögliches Ektodomänen-*Shedding* von Tim-3 hinweisen.

Weitere Studien konnten ebenfalls zeigen, dass ADAM17 für die proteolytische Spaltung des *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein* (LRP)-1 in RAW264.7-Makrophagen verantwortlich ist. Dies induzierte wiederum die Expression von regulatorischen Zytokinen, wie TNF α und IL-10 (Gorovoy et al., 2010). Die LPS-Aktivierung von primären Makrophagen führte zur ADAM17-Aktivierung über die Proteinkinase C (PKC) δ und den p38/MAPK-Pathways, welche das *Shedding* des Mer-Tyrosinkinase-Rezeptor (MerTK) hervorrief (Thorpe et al., 2011). Somit wäre es interessant zu untersuchen, ob die LPS-Stimulation zur Aktivierung von ADAM-Proteasen in Monozyten/Makrophagen führt und dies die proteolytische Spaltung von Tim-3 bewirkt.

1.3 Tim-3

1.3.1 Struktur und Expression

Das murine Tim-3 ist, wie alle Mitglieder der Tim-Familie, ein Typ-I Transmembranprotein und ist mit einer aus 281 Aminosäuren bestehenden extrazellulären Domäne deutlich kleiner als seine Verwandten. Die Struktur der extrazellulären Domäne gleicht dennoch den weiteren Familienmitgliedern. So besteht diese auch bei Tim-3 aus einer variablen Immunoglobulin-

Domäne, an die sich eine Mucin-Domäne anschließt, die zu 31% aus Serin- und Threoninresten zusammengesetzt ist. Die extrazelluläre Domäne ist mit vier N-gebundenen und fünf O-gebundenen Glykosylierungsstellen vergleichsweise wenig glykosyliert (Abbildung 2). Die cytoplasmatische Region enthält sechs Cysteinreste sowie ein konserviertes Tyrosinkinase-Phosphorylierungsmotiv und ein *Src-homology* (SH)-2-Bindungsmotiv (Kuchroo et al., 2003). Das humane Ortholog von mTim-3 besitzt eine 63%ige Sequenzübereinstimmung, mit einer Sequenzähnlichkeit von 77% in der cytoplasmatischen Domäne, einschließlich des konservierten Phosphorylierungsmotivs (Monney et al., 2002).

Das murine Tim-3 wurde 2002 als Zelloberflächen-Expressionsmarker auf T-Zellen identifiziert (Sabatos et al., 2003; Sanchez-Fueyo et al., 2003). Interessanterweise wird der Rezeptor nicht auf naiven T-Zellen exprimiert, sondern erst gebildet, wenn diese vollständig zu Effektor-T-Zellen differenziert sind und $\text{INF}\gamma$ produzieren (Monney et al., 2002).

Tim-3 wird allerdings nicht nur von Zellen des adaptiven Immunsystems exprimiert, sondern konnte auch auf Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems. So konnte es auch auf Makrophagenpopulationen und Dendritischen Zellen (DCs), sowie auf humanen Monozyten (Anderson et al., 2007) nachgewiesen werden.

1.4 Der Rezeptor Tim-3

Tim-3 wurde, wie bereits erwähnt, zunächst als Marker für differenzierte $\text{INF}\gamma$ -produzierende T-Zellen identifiziert, bevor seine Expression ebenfalls auf Zellen des angeborenen Immunsystems nachgewiesen wurde. Vielfältige Analysen zur biologischen Funktion von Tim-3 haben gezeigt, dass Tim-3, durch die Interaktion mit seinen bisher identifizierten Liganden, eine wichtige regulatorische Rolle sowohl im adaptiven als auch im angeborenen Immunsystem spielt.

Bei diesen handelt es sich um Galectin-9 (Gal-9), das zur Familie der S-Typ Lektine gehört, und um PtdSer, welches eines der häufigsten Phospholipide in der Zellmembran von Säugetierzellen ist. Durch Strukturanalysen konnte gezeigt werden, dass beide Liganden auf gegenüberliegenden Seiten der IgV-Domäne von Tim-3 binden (Cao et al., 2007; DeKruyff et al., 2010), sodass die Bindung von Gal-9 eine Interaktion mit PtdSer nicht ausschließt. Auch die jeweiligen Bindungsmechanismen unterscheiden sich grundsätzlich. So bindet Gal-9 über eine β -glykosidische Bindung an N-gebundene Kohlenhydratgruppen der IgV-Domäne (Zhu et al., 2005), während PtdSer mit der aus *CC'-Loop* und *FG-Loop* gebildeten Bindungstasche in der Tim-3-IgV-Domäne interagiert. Diese PtdSer-Bindungsstelle, enthält konservierte Aminosäurereste, die mit einem Metallion arrangiert sind. Diese konservierte Bindungstasche wird *Metal Ion-dependent Ligand-Binding Site* (MILIBS) genannt (Santiago et al., 2007). DeKruyff et al. konnten 2010 durch Bindungsstudien und Analyse der Kristallstruktur zeigen, dass apoptotische Zellen, die PtdSer exprimieren, von Tim-3 exprimierenden Zellen gebunden und/oder phagozytiert werden.

Die Identifikation von Tim-3 als PtdSer-Rezeptor erweitert die Vielseitigkeit zur Erkennung von apoptotischen Zellen (DeKruyff et al., 2010).

Während der Interaktionsmechanismus zwischen PtdSer und Tim-3 somit weitgehend geklärt ist, ist die exakte Struktur der Kohlenhydrate, die von Gal-9 erkannt werden, bisher nicht geklärt. Es ist allerdings bekannt, dass Gal-9 eine hohe Affinität für lange poly-N-Acetyllactosamin-haltige Strukturen besitzt (Nagae et al., 2009).

Wie Gal-9, das kein Signalpeptid besitzt und löslich im Zytoplasma vorliegt, an die Zelloberfläche gelangt, ist bisher unbekannt (Freeman et al., 2010). Die funktionellen Eigenschaften der Interaktionen von Tim-3 mit Gal-9 sind ausführlich untersucht worden.

So induziert die Bindung von Gal-9 an Tim-3 auf aktivierten Effektor-T-Zellen deren Apoptose (Monney et al., 2002; Zhu et al., 2005) (Abbildung 3A) und könnte somit ein Teil einer negativen *feedback*-Schleife sein, die die T-Zellhomöostase aufrechterhält. Auf diese Weise werden Überreaktionen des Immunsystems, wie bei Autoimmunerkrankungen, entgegenwirkt (Anderson et al., 2007).

Der durch Gal-9 induzierte Zelltod ist eine Mischung aus apoptotischen und nekrotischen Ereignissen (Zhu et al., 2005) und obwohl gezeigt werden konnte, dass die Bindung von Gal-9 zu einer Tyrosin-Phosphorylierung von Tim-3 führt, ist wenig über die weiteren Signalwege bekannt (van de Weyer et al., 2006). Neben dieser negativen *feedback*-Schleife auf T-Zellen, fördert die Interaktion mit Gal-9 auf Makrophagen die Beseitigung von intrazellulären Pathogenen (Jayaraman et al., 2010) (Abbildung 3D). Eine kürzlich veröffentlichte Studie bezweifelt allerdings eine spezifische Interaktion zwischen Gal-9 und Tim-3 und somit auch eine Regulation der T-Zellantworten durch diesen Signalweg. Aus ihren Ergebnissen schließen die Autoren, dass die Hauptfunktion von Tim-3 in der Vermittlung der Phagozytose von apoptotischen Zellen, über die Interaktion mit PtdSer, liegt (Leitner et al., 2013). Diese Veröffentlichung lässt Raum für Spekulationen und führt zu einer Reihe weiterer Fragen, die es zukünftig zu beantworten gilt, um die funktionelle Bedeutung der Gal-9-Tim-3-Interaktion zu verifizieren.

1.4.1 Biologische Funktionen

Die biologischen Funktionen von Tim-3 wurden bis heute umfassend untersucht. Insbesondere die Tatsache, dass Tim-3 nicht wie zunächst angenommen nur auf Zellen des adaptiven Immunsystems, sondern ebenfalls auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert wird, erweitert das potentielle Wirkungsspektrum erheblich.

Dennoch beschäftigten sich die ersten Analysen zur funktionellen Bedeutung von Tim-3 mit dessen Rolle bei der Regulation von T-Zellantworten. Diese ergaben, wie bereits erwähnt, dass die Bindung von Gal-9 an Tim-3 auf T-Zellen, wie in Abbildung 3 A gezeigt, zum Zelltod führte. Aus diesem Grund wurde Tim-3 zunächst als negativer Regulator von Immunantworten bekannt, der wichtig für das Beenden von T-Zell-Immunantworten ist (Zhu et al., 2005). *In vivo*- Befunde zeigten, dass die Blockade der Gal-9-Tim-3-Interaktion durch einen inhibierenden Antikörper oder durch ein Tim-3-Ig-Fusionsprotein zu einem beschleunigten und verschlimmerten Verlauf der *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* (EAE), einem Mausmodell der humanen Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose (MS) führte (Monney et al., 2002; Sanchez-Fueyo et al., 2003). Dieses Ergebnis wurde in einer initialen Studie an MS-Patienten, die eine inverse Korrelation zwischen der

Tim-3-Expression und der IFN γ -Sekretion in T-Zellklonen aus der cerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) nachwies, unterstützt (Koguchi et al., 2006).

Ferner ergaben Patientenstudien eine verstärkte Tim-3-Expression auf erschöpften (*exhausted*¹) CD8⁺-T-Zellen (Abbildung 3B) bei einer Reihe chronischer viraler Erkrankungen (Jin et al., 2010), wie Human-Immundefizienz-Virus (HIV) (Jones et al., 2008), Hepatitis-B-Virus (HBV) (Wherry et al., 2003) und Hepatitis-C-Virus (HCV) (Wu et al., 2010). Zudem konnte durch die Blockierung des Tim-3-Gal-9-Signalweges während einer akuten Herpes simplex Virus (HSV)-Infektion, bei der Tim-3 ebenfalls auf *exhausted* CD8⁺-T-Zellen exprimiert wird, eine verstärkte Effektor- und *Memory*-Antwort der CD8⁺-T-Zellen und dadurch eine effizientere virale Kontrolle erzielt werden (Sehrawat et al., 2010). Neben Tim-3 sind *exhausted* T-Zellen vor allem durch die Expression des inhibitorischen Moleküls *Programmed cell death-1* (PD-1) charakterisiert (Boni et al., 2007; Day et al., 2006; Urbani et al., 2006). In den meisten Virusinfektionen werden PD-1 und Tim-3 gemeinsam auf *exhausted* CD8⁺-T-Zellen exprimiert. Die Blockade beider Signalwege stellte die Proliferation der Zellen wieder her und verstärkt die Zytokinproduktion (Sakuishi et al., 2010). Weiter sind sowohl der PD-1- als auch der Tim-3-Signalweg an der T-Zell-*Exhaustion* bei Krebserkrankungen beteiligt (Blank et al., 2006). So wird Tim-3 auch verstärkt auf Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) im Lungenkrebsgewebe exprimiert (Gao et al., 2012).

Die Expression von Tim-3 auf Zellen des adaptiven Immunsystems, wie T-Lymphozyten, ist stark mit der angeborenen Immunantwort verbunden (Abbildung 3). Dies wurde beispielsweise anhand der Rolle von *Myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs²) in Tumorgeweben gezeigt. Diese Zellen sind von großem Interesse, da sie die Fähigkeit besitzen, zytotoxische Aktivitäten und auch die adaptive Immunantwort von T-Zellen zu supprimieren. Ihre Anwesenheit ist mit einer geringen Heilungschance bei Krebserkrankungen verbunden, da sie die T-Zellantwort unterdrücken (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Das von T-Zellen exprimierte Tim-3 ist an der Ausbreitung von MDSCs bei Krebserkrankungen beteiligt (Dardalhon et al., 2010) (Abbildung 3C). So konnten in einem Mausmodell für Brustkrebs weniger Tumore und eine geringere MDSC-Vermehrung festgestellt werden, wenn die Mäuse kein Tim-3 besaßen.

¹ *Exhausted* T-Zellen zeigen eine Einschränkung der Zytokinproduktion sowie der Proliferation und zeigen eine zytotoxische Aktivität.

² MDSCs sind eine heterogene Population von frühen myeloiden Stammzellen, unreifen Granulozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs) zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Differenzierung. Sie werden durch pro-inflammatorische Zytokine aktiviert und eine große Anzahl wurde während Infektionen und Entzündungen gefunden. Sie häufen sich dann im Blut, im Knochenmark, in sekundären Lymphorganen und in der Nähe von Tumoren an.

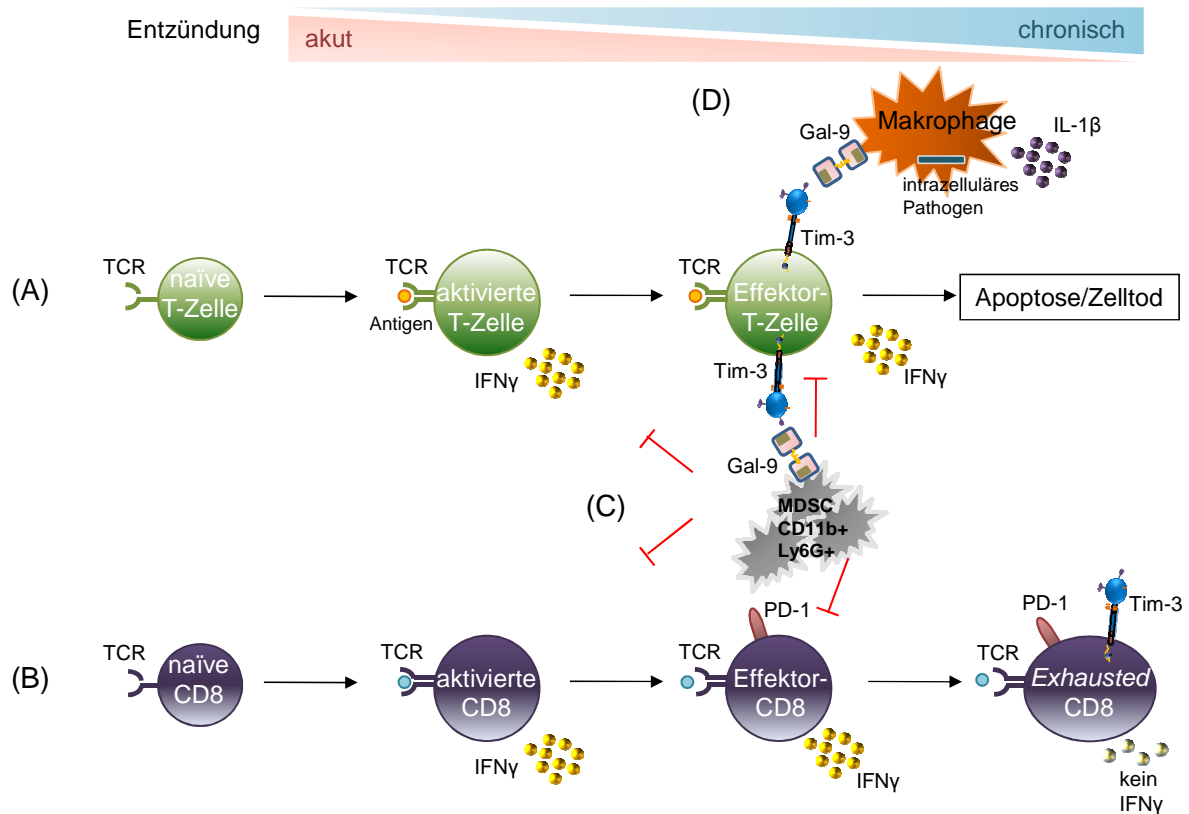


Abbildung 3: Model der Tim-3-Funktionen bei der Regulation von Immunantworten. (A) Tim-3 wird auf aktivierten IFN γ -produzierenden Effektor-T-Zellen exprimiert und die Bindung von Galectin-9 (Gal-9) führt zur Apoptose/Zelltod der T-Zellen. (B) Bei chronischen Entzündungen wird Tim-3 zusammen mit PD-1 auf *exhausted* T-Zellen co-exprimiert. (C) Tim-3 auf Effektor-T-Zellen interagiert mit Gal-9 auf unreifen MDSCs, was zur Reifung dieser Zellen führt und so die T-Zellantworten hemmt. (D) Tim-3 exprimiert von T-Zellen interagiert mit Gal-9 auf mit intrazellulären Pathogenen infizierten Makrophagen und trägt so zur Beseitigung dieser Pathogene bei. PD-1, *programmed cell death 1*; IL-1 β , Interleukin-1 β ; IFN γ , Interferon γ ; Gal-9, Galectin-9, Tim, *T cell immunoglobulin and mucin*; MDSCs, *myeloid-derived suppressor cells*; Ly6G, *Lymphocyte antigen 6G*.

Ebenfalls konnte eine deutliche Reduktion des Wachstums von EL4-Lymphomen³ durch die Blockade von Tim-3 mittels anti-Tim-3-Antikörper erzielt werden. Diese Daten zeigen, dass der Tim-3-Signalweg das Tumorstadium durch die Regulation der Ausbreitung von MDSCs beeinflussen kann (Sakuishi et al., 2011).

Neben diesen inhibitorischen Effekten von Tim-3 auf T-Zellen, fördert es aber auch durch Interaktion mit Gal-9 auf Makrophagen die Beseitigung von intrazellulären Pathogenen (Jayaraman et al., 2010) (Abbildung 3D). Jayaraman et al. konnten die Bindung zwischen Tim-3 auf Effektor-T-Zellen und Gal-9, das von *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)-infizierten Makrophagen exprimiert wurde, nachweisen (Abbildung 3D). Ihre Experimente zeigten, dass während der *Mtb*-Infektion das von T-Zellen produzierte IFN γ und das von den infizierten Makrophagen sezernierte Interleukin-1 β (IL-1 β) die Expression von Tim-3 und Gal-9 induzierte. Während der Effektorphase der Infektion wanderten die Tim-3⁺-T-Zellen in die Lunge und kamen so in Kontakt mit den Gal-9-exprimierenden Makrophagen. Diese

³ EL4-Lymphomzellen sind eine Zellkulturlinie, die durch die Behandlung von C57BL/6-Mäusen mit dem Karzinogen 9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracene entsteht.

Interaktion führte über einen noch unbekanntem Mechanismus zur Aktivierung der Caspase-1 in Makrophagen und damit zur Sekretion von IL-1 β . IL-1 β agiert dann auf eine autokrine Weise, um weitere Signalwege zur Beseitigung der Pathogene zu aktivieren (Abbildung 3D). Tim-3 fördert so die Wirtsresistenz gegenüber intrazellulären Pathogenen, wie *Mtb*.

1.5 Die Familie der ADAM-Proteasen

Die ADAMs sind eine Familie von membrangebundenen und sezernierten Proteinen mit einer ungefähren Länge von 750 Aminosäuren. Sie gehören zu der Superfamilie der M12B-Adamalysin-Metallopeptidasen, die eine Zink-abhängige Proteaseaktivität besitzen (Rawlings et al., 2008; Wolfsberg et al., 1993).

ADAMs wurden als Transmembranproteine des Typ-I mit einer Homologie zu Liganden der Integrine des Schlangengifts identifiziert. Die ersten identifizierten ADAMs in Säugetieren waren die beiden Untereinheiten des Spermaproteins Fertilin, ADAM1 (Fertilin α) und ADAM2 (Fertilin β) (Blobel et al., 1992; Wolfsberg et al., 1995), deren Funktion in Nagetieren untersucht wurde (Primakoff and Myles, 2000).

Bis heute wurden 40 Familienmitglieder im Genom von Säugetieren beschrieben (Edwards et al., 2008; Puente and Lopez-Otin, 2004), von denen 37 in Mäusen und 22 in Menschen exprimiert werden (Weber and Saftig, 2012). Von den 22 identifizierten humanen ADAMs konnte nur für 13 eine tatsächliche Proteaseaktivität gezeigt werden (ADAMEC1, ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30 und 33). Die proteolytische Aktivität wird durch die charakteristische Aminosäuresequenz HEXGHXXGXXHD in ihrer katalytisch-aktiven Metalloprotease-Domäne determiniert (Bode et al., 1993; Murphy, 2009). Dieser Teil der Proteasen besitzt ein katalytisches Zink-Atom, das die Spaltungsspezifität gewährleistet oder für die Regulation der Proteaseaktivität verantwortlich ist (Gomis-Ruth, 2003; Orth et al., 2004; Takeda et al., 2006). Die katalytisch aktiven ADAMs spielen eine Schlüsselrolle in der Zellantwort auf äußere Reize, aber auch während Entwicklungsprozessen, bei der Interaktion von Zellen (Murphy, 2009; White, 2003) sowie bei der Modellierung der Differenzierung, Migration, Rezeptor-Liganden-Signalgebung oder –Abstoßung (Becherer and Blobel, 2003). Substrate der ADAMs sind in erster Linie Typ-I- und Typ-II-Transmembranproteine, aber auch *Glycosylphosphatidylinositol* (GPI)-verankerte Proteine (Vincent et al., 2001).

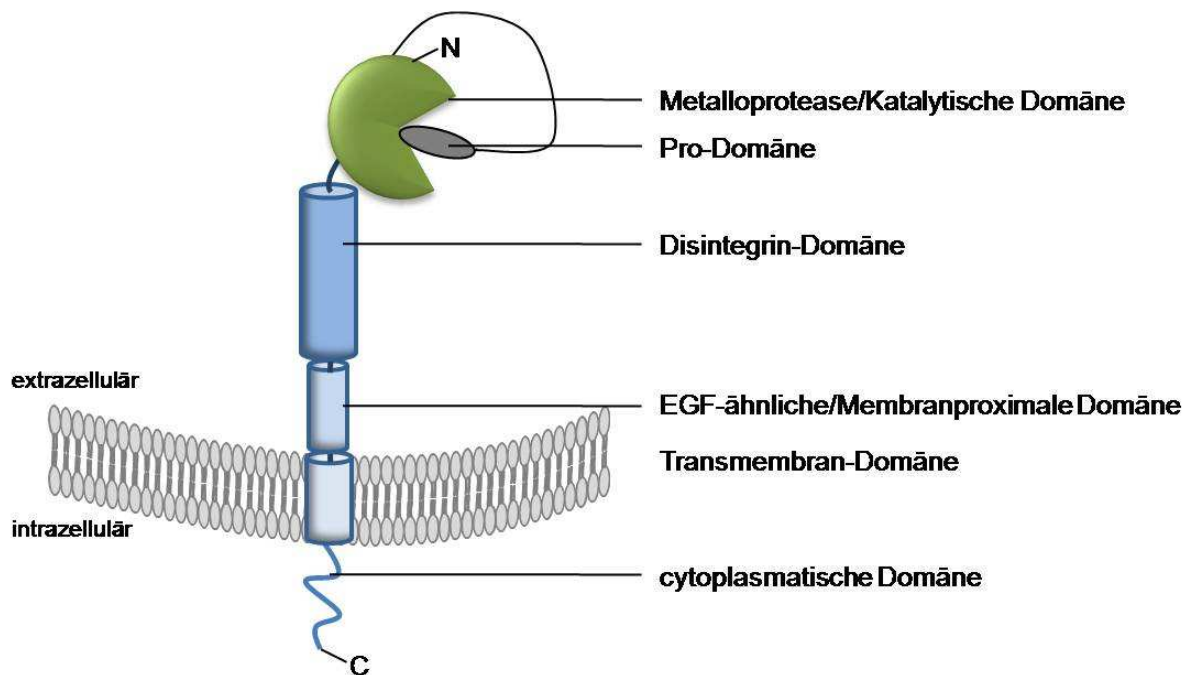


Abbildung 4: Modularer Aufbau der ADAM-Proteasenfamilie. ADAMs sind glykosylierte Typ-I-Transmembranproteine, die aus einer N-terminalen Metalloprotease-Domäne, einer Disintegrin-Domäne, einer EGF-ähnlichen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären cytoplasmatischen Domäne aufgebaut sind. ADAMs sind an dem Ektodomänen-*Shedding* von Typ-I- und Typ-II-Transmembranproteinen sowie GPI-verankerten Proteinen beteiligt und spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation verschiedener Prozesse, wie zum Beispiel der Entwicklung, der Zell-Zell-Interaktion und bei Entzündungsprozessen.

Die Mitglieder der ADAM-Familie zeigen einen weitgehend einheitlichen modularen Aufbau (Abbildung 4). Sie besitzen eine N-terminale Signalsequenz, welche dazu führt, dass die Proteine in den Sekretorischen *Pathway* gelangen. Angrenzend daran befindet sich die Metalloprotease-Domäne mit der Pro-Domäne, die als intramolekulares Chaperon die korrekte Faltung des Proteins kontrolliert und die ADAM-Proteasen vor Degradation im Sekretorischen *Pathway* schützt (Anders et al., 2001). Aufgrund der Pro-Domäne werden die Proteasen als Zymogene in einem inaktiven Zustand gehalten. Die Entfernung der Pro-Domäne, in den meisten Fällen durch Pro-Proteinkonvertasen, wie Furin, findet im Golgi-Apparat statt (Endres et al., 2003; Seals and Courtneidge, 2003). Die isolierten Pro-Domänen können als potente und spezifische Inhibitoren der aktiven Enzyme wirken, wie es für ADAM10 und ADAM17 gezeigt wurde (Gonzales et al., 2004; Moss et al., 2007).

Die cysteinreiche Region der Disintegrin-Domäne vermittelt wahrscheinlich die Regulation der katalytischen Aktivität und die Substraterkennung der ADAMs. Die *Epidermal growth factor* (EGF)-ähnliche oder Membranproximale Domäne (MPD) wirkt wahrscheinlich an der Bindung von Substraten und an Zelloberflächenproteoglykane mit (Iba et al., 2000; Janes et al., 2005). Wie Lorenzen et al. zeigten, ist die MPD von ADAM17 an der Multimerisierung der Protease und der Ligandenerkennung beteiligt (Lorenzen et al., 2012; Lorenzen et al., 2011). C-terminal von dieser Domäne befindet sich eine kurze und flexible extrazelluläre Sequenz, auf die eine hydrophobe Transmembrandomäne folgt (Weber and Saftig, 2012). Die cytoplasmatische Domäne der Mitglieder der ADAM-Familie variiert in der Länge, der

Aminosäuresequenz und den Bindungseigenschaften an cytosolische Proteine (Cao et al., 2002; Seals and Courtneidge, 2003). Einige ADAMs besitzen ein oder mehrere Sequenzmotive zur Bindung von *Src-homology* (SH-)3-Domänen oder prolinreichen Regionen, sowie Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten, die von diversen Kinasen phosphoryliert werden können (Seals and Courtneidge, 2003; Weskamp et al., 1996).

Somit kann spekuliert werden, ob die cytoplasmatische Domäne zur Regulation der Proteasefunktionen als Antwort auf Signale innerhalb der Zelle dient, und/oder die Bindung von extrazellulären Liganden eine post-translationale Veränderung der cytoplasmatischen Domäne bewirkt.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die cytoplasmatische Domäne die Aktivität der ADAMs auf eine Zell- und Stimulus-spezifische Weise verbindet (Edwards et al., 2008). Die bislang am besten charakterisierten Familienmitglieder sind ADAM10 und ADAM17. Diese beiden Proteasen werden im Folgenden näher beschrieben.

1.5.1 ADAM10

ADAM10 wurde 1989 als ein Myelin-degradierendes Enzym aus dem Rinderhirn isoliert (Chantry et al., 1989) und erst später als ADAM identifiziert (Howard et al., 1996). Zwei ADAM10-Orthologe, *kuzbanian* (*kuz*) und *kuzbanian-like* (*kul*), wurden auch in *Drosophila melanogaster* nachgewiesen (Huxley-Jones et al., 2007). Analysen ergaben, dass *Kuzbanian* für die Kontrolle der frühen Entwicklung des Nervensystems durch die proteolytische Aktivierung des Notch-Signalweges essentiell ist (Allinson et al., 2003; Pan and Rubin, 1997).

Ein vollständiger *Knockout* von ADAM10 ($ADAM10^{-/-}$) in der Maus führt zur pränatalen Letalität an Tag 9,5 der Embryonalentwicklung. Es wird angenommen, dass dies auf einer starken Verzögerung des Wachstums und Defekten bei der Entwicklung des Zentralen Nervensystems (ZNS) sowie des kardiovaskulären Systems beruht (Hartmann et al., 2002a). ADAM10 wird im Gegensatz zu den meisten Metalloproteasen nahezu ubiquitinär exprimiert (Seals and Courtneidge, 2003). Der grundsätzliche Aufbau der Protease entspricht der unter Abschnitt 1.5 dargestellten typischen modularen Aufbauweise. Die proteolytische Funktion von ADAM10 kann durch die Bindung der natürlichen Inhibitoren *tissue inhibitors of metalloproteinase* (TIMP)-1 und -3 an die Metalloprotease-Domäne reguliert werden (Huovila et al., 2005; Murphy, 2009).

Zusätzlich scheint das Membranprotein *reversion-inducing cystein-rich protein with Kazal motifs* (RECK) ein physiologischer Inhibitor von ADAM10 zu sein. Dieser reguliert das Ektodomänen-*Shedding* von Notch-Liganden durch direkte Inhibierung der proteolytischen Aktivität von ADAM10 in neuronalen Vorläuferzellen (Muraguchi et al., 2007).

Ferner scheint der Transport, die Reifung und die Aktivierung von ADAM10 durch *Scaffolding*-Proteine, einschließlich der Tetraspanine, kontrolliert zu werden (Prox et al., 2012). Auch die cytoplasmatische Domäne von ADAM10 spielt eine wichtige Rolle bei der Reifung und dem intrazellulären *Trafficking* von ADAM10. So wurde eine Endoplasmatisches Retikulum (ER)-Retentionsequenz im cytoplasmatischen C-Terminus nachgewiesen (Marcello et al., 2010). Aber auch die Interaktion der cytoplasmatischen Domäne mit Proteinen, wie dem *Synapse Associated Protein-97* (SAP97), hilft bei der

korrekten Lokalisierung und fördert auf diese Weise ihre α -Sekretase-Aktivität (Marcello et al., 2007). Experimentell kann die ADAM10-Aktivität durch Calciumionophore, wie Ionomycin, die eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration bewirken, induziert werden. Dieses kann auch durch Calmodulin (CaM)-Inhibitoren, wie Trifluoroperazin (TFP), erreicht werden, wie am Beispiel von CD44 und N-Cadherin gezeigt wurde. Phorbolester wie PMA hingegen führen zu keiner messbaren Aktivitätssteigerung. Jedoch ist ADAM10 bereits konstitutiv aktiv und benötigt meist keinen weiteren Stimulus (Le Gall et al., 2009; Nagano et al., 2004; Reiss et al., 2005; Sanderson et al., 2005).

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist das komplette Substratspektrum von ADAM10 noch nicht bekannt. Allerdings sind über 40 Substrate beschrieben worden, darunter Proteine und Rezeptoren, wie IL-6R, Fractalkine, ErbB2, Fas-L, und N-Cadherin (Weber and Saftig, 2012). Außerdem ist ADAM10 als Haupt-*Sheddase* des Notch-Signalwegs identifiziert worden und desweiteren an der proteolytischen Spaltung der Eph-Tyrosinkinasen und deren Liganden, Ephrine, beteiligt. ADAM10 prozessiert ebenfalls die beiden *Epidermal growth factor receptor* (EGFR)-Liganden EGF und Betacellulin und scheint an der Transaktivierung des *G protein-coupled receptor* (GPCR)-EGFR-Signalweges beteiligt zu sein (Sahin et al., 2004; Schafer et al., 2004). Ferner spielt ADAM10 eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Alzheimer-Erkrankungen durch die Prozessierung von APP (Janes et al., 2005; Saftig et al., 1996). Die Überexpression des dominant-negativen *adam10* in Mäusen, die eine genetische Prädisposition gegenüber Alzheimer-Erkrankungen besaßen, erbrachte eindeutige Hinweise für ADAM10 als Haupt- α -Sekretase von APP im Gehirn von Mäusen (Postina et al., 2004).

Ebenfalls scheint ADAM10 eine kritische Rolle bei der embryonalen und adulten Homöostase der Epidermis zu spielen (Weber et al., 2011). So zeigten Solanas et al., dass ADAM10 wichtig für die Kompartimentierung von Epithelzellen ist und ebenfalls an der Adhäsion und Polarisierung dieser Zellen durch die proteolytische Prozessierung von E-cadherin beteiligt ist (Solanas et al., 2011).

Allerdings sind eine Reihe von Substraten bekannt, wie zum Beispiel $\text{TNF}\alpha$, IL-6R, Notch-1 Rezeptor, *Transforming growth factor* (TGF) α , L-Selektin und APP, die sowohl durch ADAM10 als auch ADAM17 gespalten werden können. Allerdings ist der Regulationsmechanismus meist unterschiedlich (Le Gall et al., 2009).

1.5.2 ADAM17

1997 wurde ADAM17 als Metalloprotease identifiziert, die für die Freisetzung der membran-gebundenen Pro-Form von $\text{TNF}\alpha$ verantwortlich ist (Black et al., 1997). Aus diesem Grund wird ADAM17 auch als *tumor necrosis factor- α converting enzyme* (TACE) bezeichnet. Neben seiner Rolle bei Entwicklungsprozessen deutet das breitgefächerte Substratspektrum von ADAM17 auf eine kritische Funktion auch in adulten Säugern hin. Bisher wurden 76 Proteine identifiziert, die von ADAM17 proteolytisch gespalten werden (Scheller et al., 2011). Neben ihrer Funktion bei der Zytokin-Signalgebung, wie der $\text{TNF}\alpha$ -Aktivierung, ist ADAM17 auch an der proteolytischen Prozessierung vieler Zytokinrezeptoren beteiligt. Darunter der IL-6R α , wodurch das IL-6-*Transsignalling* ermöglicht wird, aber auch der EGFR und der TNFRI und II, was ihre wichtige Funktion in Entzündungsprozessen unterstreicht. ADAM17 reguliert ebenfalls die Signalgebung vieler Wachstumsfaktoren und Hormone. Als Hauptsheddase im

EGFR-Signalweg ist sie für die proteolytische Spaltung von ErbB-Liganden, wie dem TGF α , *Heparin binding* (HB)-EGF und Amphiregulin (AR) zuständig (Hinkle et al., 2004). Desweiteren wurden auch Zelladhäsionsmoleküle, wie *Intercellular Adhesion Molecule* (ICAM)-1 und L-Selektin, sowie andere Moleküle, wie APP, als Substrate identifiziert (Arribas and Esselens, 2009).

Über die physiologischen Mechanismen die zur Aktivierung von ADAM17 führen ist bisher nur wenig bekannt. Allerdings kann das *Shedding* von ADAM17-Substraten durch Phorbolester, wie 12-O-tetradecanylphorbol-13-acetat (TPA) oder PMA und durch den Phosphataseinhibitor Pervanadat stimuliert werden (Arribas and Massague, 1995; Massague and Pandiella, 1993; Pandiella and Massague, 1991). In vielen Studien wurde gezeigt, dass Phorbolester für die Aktivierung der PKC verantwortlich sind und dies das *Shedding* von ADAM17-Substraten induziert (Horiuchi et al., 2007). Ein möglicher Regulationsmechanismus zur Aktivierung von ADAM17 durch die PKC ist eine putative Phosphorylierungssequenz in der cytoplasmatische Domäne von ADAM17 (Diaz-Rodriguez et al., 1999). Dennoch bleibt der zugrunde liegende Mechanismus ungeklärt, da auch eine ADAM17-Mutante ohne intrazelluläre Domäne durch PMA-Stimulation aktiviert werden konnte (Reddy et al., 2000). Außerdem wird das PMA-induzierte *Shedding* auch durch die Interaktion mit anderen Proteinen, wie zum Beispiel Thiolisomerasen, die den Redox-Status des Substrates regulieren, kontrolliert. Durch Inhibitoren der *Protein Disulphide Isomerase* (PDI) wird beispielsweise das Ektodomänen-*Shedding* von L-Selektin gefördert (Smalley and Ley, 2005).

Ein weiterer Mechanismus über den ADAM17 aktiviert wird, ist die GPCR-vermittelte Aktivierung. Hierfür wird die Tyrosinkinase Src benötigt, die zur GPCR-vermittelten Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K) führt, welche wiederum die Aktivierung der *Phosphatidylinositol-dependent Kinase-1* (PDK1) bewirkt. Diese aktiviert über eine direkte Phosphorylierung ADAM17 (Zhang et al., 2006).

Ferner kann ADAM17 mit der ERK/MAPK oder p38/MAPK assoziieren und wird durch diese Interaktion am intrazellulären Threonin⁷³⁵ phosphoryliert (Diaz-Rodriguez et al., 2002). Diese Phosphorylierung führt dazu, dass ADAM17 aktiviert wird und vom ER zur Zelloberfläche wandert (Diaz-Rodriguez et al., 2002; Soond et al., 2005). Diese Signalwege können beispielsweise durch Pervanadat induziert werden (Daum et al., 1998). So kann ADAM17 sowohl über den PKC-Signalweg, als auch über weitere Signalwege, wie dem p38 oder ERK/MAPK-Signalweg oder die Stimulation von GPCRs aktiviert werden (Lemjabbar et al., 2003; Schafer et al., 2004a). Aber auch andere Stimuli, wie das Zytokin IL-1 α und β regulieren ADAM17 (Bandyopadhyay et al., 2006; Tachida et al., 2008). Ferner führt die Depletion von Cholesterol zur Aktivierung von ADAM17, da dieses sich in spezialisierten Zellmembranbereichen, den sogenannten *Lipid rafts* befindet, deren Membran stark cholesterollhaltig ist (Matthews et al., 2003).

Die proteolytische Aktivität von ADAM17 kann durch seinen physiologischen Inhibitor TIMP-3 gehemmt werden (Huovila et al., 2005).

Viele der heutigen Erkenntnisse zu ADAM17 stammen aus *knockout*-Mäusen und experimentellen Mausmodellen. Bereits 1998 wurde festgestellt, dass eine vollständige ADAM17-Defizienz bei Mäusen zu multiplen pathologischen Veränderungen führte, einschließlich einer gestörten Entwicklung der Augen, des Epithels, der Lunge, des Herzens,

des Immunsystems und von Haut und Haaren (Peschon et al., 1998). In Abhängigkeit von ihrem genetischen Hintergrund zeigen ADAM17-defiziente Mäuse eine embryonale Letalität zwischen Tag 17,5 der Embryonalentwicklung und ihrer Geburt. Die gestörte Entwicklung der Augen führt zu offenen Augenlidern, einer geschwächten Kornea und einem fehlenden Bindehautbeutel (Peschon et al., 1998). Desweiteren konnte eine gestörte Entwicklung des Epithels festgestellt werden. So besaßen ADAM17-defiziente Mäuse ein vergrößertes Herz und eine gestörte Entwicklung der Herzklappen (Shi et al., 2003). Die meisten Entwicklungsdefekte sind auf das gestörte Ektodomänen-*Shedding* von EGFR-Liganden zurückzuführen (Chalaris et al., 2010) und konnten auch in EGFR-defizienten Mäusen beobachtet werden (Blobel, 2005). Zusätzlich zeigten ADM17-defiziente Mäuse Defekte, die stark denen der TGF α -defizienten Mäuse ähnelten (Peschon et al., 1998).

Chalaris et al. entwickelten eine hypomorphe Maus durch die Einbringung eines zusätzlichen Exons mit einem *in-frame* translationalen Stop-Codon zwischen Exon 11 und 12 (Adam17^{ex/ex}). Diese Mäuse besitzen reduzierte ADAM17-Level in allen Geweben und wurden genutzt, um die Rolle von ADAM17 in Entzündungsprozessen zu studieren. *Dextran* sodium sulfat (DSS)-induzierte Kolitis in diesen Mäusen führte zu einer verstärkten Entzündung des Darms, aufgrund des gestörten *Sheddings* von ErbB-Liganden und einer defekten Regeneration der Schleimhaut des intestinalen Epithels (Scheller et al., 2011a). Aus diesen Beobachtungen konnte geschlossen werden, dass ADAM17 einen positiven Effekt auf Regenerationsprozesse und Gewebeschäden durch die Aktivierung des EGFR-*Signaltransducer and Activator of transcription* (STAT)-3 hat (Chalaris et al., 2010). Eine weitere Studie, in der Mäuse mit einer Mutation in der Metalloprotease-Domäne von ADAM17 (Adam17^{wavedx/wavedx}), verwendet wurden, die wie die Adam17^{ex/ex}-Mäuse, eine stark eingeschränkte *Shedding*-Aktivität besitzen, bestätigte die gesteigerte Entzündung nach der DSS-Behandlung und somit die schützende Rolle von ADAM17 während der experimentellen Kolitis (Brandl et al., 2010).

Ein *Single-nucleotide polymorphism* (SNP)-Array der DNA von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen der Haut und des Darms, die einen ähnlichen Haarphänotyp wie Adam17^{ex/ex}-Mäuse aufwiesen, ergab eine *loss-of-function*-Mutation in Adam17. Diese führte wahrscheinlich zur Expression eines ADAM17-Proteins, das ausschließlich aus der Pro-Domäne und dem Signalpeptid besteht. Analysen des Phänotyps und des Expressionsprofils von PBMCs eines dieser Patienten zeigten, dass das Fehlen einer funktionellen ADAM17-Protease zur verminderten TNF α -Produktion in PBMCs führte und ebenfalls die beobachteten Entzündungen der Haut und des Darms bedingte. Allerdings scheinen Menschen, anders als die *knockout*-Mäuse, Mechanismen zu besitzen, die das Fehlen von ADAM17 kompensieren können. Womit die Hemmung von ADAM17 als therapeutische Möglichkeit von Entzündungserkrankungen im Menschen weiter im Fokus von zukünftigen Studien steht (Blaydon et al., 2011).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es sich beim humane Tim-3 um ein Substrat von Metalloproteasen handelt. Dabei ging es zunächst um die Frage, welche Protease(n) für das Ektodomänen-*Shedding* verantwortlich ist/sind. Weiterhin sollte die mögliche Regulation der proteolytischen Freisetzung des löslichen Tim-3 analysiert werden.

Die Entstehung einer löslichen Variante des humanen Tim-3 durch Ektodomänen-*Shedding* war zu Beginn der Arbeit noch völlig unbekannt. Es ging zunächst um die Frage, ob bekannte Stimuli zur Aktivierung der ADAMs, wie PMA und Ionomycin, die Entstehung von löslichem Tim-3 induzieren können, und ob die unterschiedlichen Aktivatoren die induzierte Freisetzung durch unterschiedliche Proteasen vermitteln. Um zu klären, welche Regionen des Rezeptors an der Regulation der proteolytischen Freisetzung beteiligt sind, sollten verschiedene Deletionsmutanten generiert und analysiert werden.

Schließlich sollte geprüft werden, ob das endogene Tim-3 in humanen CD14⁺Monozyten ebenfalls nach TLR-Aktivierung proteolytisch gespalten wird. Hierbei sollten Stimulationsversuche mit LPS Aufschluss über eine mögliche Beteiligung des löslichen Tim-3 an Antworten des Immunsystems auf bakterielle Infektionen geben, und geklärt werden, welche Proteasen an diesem Prozess beteiligt sind.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Ampicillin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	f.c. 100 µg/ml
Kanamycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	f.c. 25 µg/ml
Neomycin (G-418)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland)	f.c. 100 µg/ml

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primäre Antikörper

Durchflusszytometrische Messungen (FACS)

α -humaner CD14	FITC-gekoppelter Antikörper aus der Maus (Klon M5E2, BD Biosciences) Konzentration: 100 µg/ml, Verdünnung: 1:5
α -humaner Tim-3	PE-gekoppelter Antikörper aus der Maus (Klon F38-2E2, BioLegend) Konzentration: 100 µg/ml, Verdünnung: 1:5
α -muriner IgG1 κ	PE-gekoppelter Antikörper aus der Maus (Klon MOPC21, BioLegend) Konzentration: 200 µg/ml, Verdünnung 1:10
α -muriner IgG2a, κ	FITC-gekoppelter Antikörper aus der Maus (Klon G155-178, BD Biosciences) Konzentration: 100 µg/ml, Verdünnung: 1:5
Fc-Block	Humaner Fc Block CD16/32 mAb (BD Biosciences). Dieser enthält Immunglobuline, die an Fc-Rezeptoren binden und auf diese Weise die unspezifische Bindung primärer Antikörper an diese Rezeptoren verhindert.

SDS-PAGE

α -humaner Tim-3	monoklonaler Antikörper aus der Ratte (Klon 9); bindet an ein Epitop der IgV-Domäne (60 kDa). (Herstellung siehe 3.2.4) Konzentration 1 mg/ml; Verdünnung: 1:33,3 (1% BSA in TBS-T)
α - β -Aktin	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, der endogene Level von β -Aktin (45kDa) detektiert. Kreuzreaktivität mit β -Aktin der Maus (Cell signaling, Boston, USA). Konzentration: 100 μ g/ml; Verdünnung: 1:1.000 (1% BSA in TBS-T)

2.1.2.2 Sekundäre Antikörper

ImmunoPure® Ziege anti-Maus IgG (H+L), Peroxidase gekoppelt	ThermoFisherScientific Inc. (Waltham, MA, USA) Konzentration: 800 μ g/ml; Verdünnung: 1:5.000
Ziege anti-Ratte IgG, Peroxidase gekoppelt	SouthernBiotech (Birmingham, AL, USA) Konzentration 1 mg/ml; Verdünnung: 1:3.000

2.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

2.1.4 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden, soweit nicht anders vermerkt, von ThermoFisherScientific Inc. (Waltham, MA, USA) bezogen.

2.1.5 Größenmarker

Für die Größenbestimmung von Proteinen wurde die *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (10-250 kDa) verwendet. Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (250-10.000 bp). Die Größenbestimmung kleiner DNA-Fragmente wurde mit Hilfe des *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (100-1.000 bp); alle von ThermoFisherScientific Inc. (Waltham, MA, USA).

2.1.6 Kits

Folgende Kits wurden für diese Arbeit verwendet:

Detektion von Chemilumineszenz	SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; ThermoFisherScientific Inc. (Waltham, MA, USA).
DNA-Extraktion aus Agarosegelen und Aufreinigung von PCR-Produkten	GeneJET Gel Extraction Kit; ThermoFisherScientific Inc. (Waltham, MA, USA).
RNA-Isolierung aus Zellen	GeneJET RNA Purification Kit; ThermoFisherScientific Inc. (Waltham, MA, USA).
Mini-Präparation von DNA-Plasmiden	GeneJET Plasmid Miniprep Kit; ThermoFisherScientific Inc. (Waltham, MA, USA).
Midi-Präparation von DNA-Plasmiden	NucleoBond Xtra Midi; Macherey-Nagel GmbH & Co.Kg (Düren, Deutschland).

2.1.7 Puffer und Lösungen

SDS-PAGE

Blockpuffer (SDS-PAGE)	6%	Milchpulver in TBS-T
Transferpuffer (SDS-PAGE)	25 mM 192 mM 20% (V/V)	Tris-HCl, pH 8,3 Glycin Methanol
Lysispuffer (Zellyse)	20 mM 150 mM 0.5 mM 0.5% (m/V)	Tris-HCl, pH 7,6 NaCl EDTA IGEPAL (NP-40) Proteaseinhibitor

Proteaseinhibitor	COMPLETE™ Tabletten (Roche, Mannheim, Deutschland) enthalten vielfältige Proteaseinhibitoren, die die proteolytische Aktivität der meisten Zelltypen hemmen. 1Tablette in 50 ml Lysispuffer	
Trenngel (12,5%) (SDS-PAGE)	3,06 ml	H ₂ O
	5,1 ml	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
	0,2 ml	10% SDS
	8,2ml	30% Polyacrylamid
	0,2 ml	10% APS
	0,02 ml	TEMED
Trenngel (15%) (SDS-PAGE)	4,5 ml	H ₂ O
	5,1 ml	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
	0,2 ml	10% SDS
	9,9 ml	30% Polyacrylamid
	0,2 ml	10% APS
	0,02 ml	TEMED
Sammelgel (4%) (SDS-PAGE)	3,275 ml	H ₂ O
	0,625 ml	1,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	0,05 ml	10% SDS
	0,67 ml	30% Polyacrylamid
	0,05ml	10% APS
	0,005 ml	TEMED
SDS-Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM	Tris-HCl, pH 8,3
	192 mM	Glycin
	0,1% (m/V)	SDS
Laemmli-Puffer (4x) (SDS-PAGE)	8% (m/V)	SDS
	10% (m/V)	β-Mercaptoethanol
	40% (m/V)	Glycerol
	0,13%	Bromphenolblau
	(m/V)	Tris-HCl, pH 6,8
	125 mM	
Tris Buffered Saline (TBS, SDS-PAGE)	10 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	150 mM	NaCl
TBS-T		TBS
(SDS-PAGE)	0,5% (V/V)	Tween 20

Coomassie Färbelösung (SDS-PAGE)	40% (V/V) 10% (V/V) 0,1% (V/V)	Ethanol Essigsäure Coomassie R250
Entfärbungslösung (SDS-PAGE)	40% (V/V) 10% (V/V)	Ethanol Essigsäure
Strippinglösung	0,5 M	NaCl
<u>Pull down Assay</u>		
IP-Lysispuffer	200 mM 20 mM 0,55% (m/V)	KCl HEPES TritonX
IP-Bindungspuffer	200 mM 20 mM	KCl HEPES
<u>ELISA</u>		
Phosphate Buffered Saline (PBS)	150 mM 8 mM 1,7 mM	NaCl Na ₂ HPO ₄ , pH7,4 NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Waschpuffer (PBS-T)	0,05% (V/V)	Tween-20 in PBS, pH 7,2
BSA-Blockpuffer (ELISA)	1 % (m/V)	BSA in PBS, pH 7,2
Casein-Blockpuffer (ELISA)	1% (m/V)	Casein in PBS, pH 7,2
Streptavidinlösung (Strep-HRP, Roche, Mannheim, Deutschland) Konzentration: 1000 U/ml	1:5000	PBS-T, pH 7,2
Stopplösung (ELISA)	1,8 M	H ₂ SO ₄

Alkalische Phosphatase Assay (AP-Assay)

Alkalische Phosphatase Puffer (<i>AP-Assay</i>)	0,1 M	Glycin
	1 mM	MgCl ₂
	1 mM	ZnCl ₂
	1 mg/ml	Nitrophenylphosphat- Dinatrium-Salz-Hexahydrat

Durchflusszytometrische Messung (FACS)

FACS Puffer	0,25% (m/V)	BSA in PBS, pH 7,2
Blockpuffer	0,5 µl	Serum aus der Maus oder Ratte
	0,5 µl ad 10 µl	Fc-Block FACS-Puffer

Antikörperherstellung

Waschpuffer	0.5% (V/V)	Tween 20 in PBS, pH 7,2
Urea-Denaturierungspuffer	50 mM 6 M	Tris-HCl, pH8,0 GuHCl
Renaturierungspuffer	100 mM 400 mM 2 mM 4 mM 0,4 mM	Tris-HCl, pH 8,5 L-arginin EDTA reduziertes Gluthathion reduziertes Gluthathion
FPLC Lösung	100 mM 100 mM	Tris-HCl, pH 8,5 NaCl
Bindungspuffer (<i>FPLC</i>)	20 mM	Phosphat, pH7,4
Elutionspuffer (<i>FPLC</i>)	100 mM	Glycin, pH 2,7
Neutralisierungspuffer	1 mM	Tris-HCl, pH 9,0

Magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS)

Isolierungspuffer (<i>Monozyten-Isolierung</i>)	2 mM	EDTA in PBS, pH7,2
MACS-Puffer (<i>Monozyten-Isolierung</i>)	2 mM 0,5% (m/V)	EDTA BSA in PBS, pH7,2

Molekularbiologische Methoden

TBE-Puffer (0,5x) (<i>Agarosegele</i>)	44,5 mM 10 mM 44,5 mM	Borsäure EDTA, pH 8,0 Tris-HCl
DNA Probenpuffer (6x) (<i>DNA-Gelelektrophorese</i>)	0,1% (m/V) 20% (m/V) 0,1%	Bromphenolblau Glycerol in TBE-Puffer Xylencyanol
S1 Puffer (<i>DNA Mini-Präp</i>)	50 mM 10 mM 100 µg/ml	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA RNase
S2 Puffer (<i>DNA Mini-Präp</i>)	200 mM 1% (m/V)	NaOH SDS
S3 Puffer (<i>DNA Mini-Präp</i>)	2,8 mM	Kaliumacetat, pH 5,1

2.1.8 Kulturmedien**2.1.8.1 Bakterien**

Luria-Bertani-(LB)-Medium	10 g 10 g 5 g	NaCl Pepton Hefeextrakt ad 1.000 ml mit H ₂ O
Luria-Bertani -(LB)-Platten	10 g 10 g 5 g 20 g	NaCl Pepton Hefeextrakt Agar ad 1.000 ml mit H ₂ O

2.1.8.2 Zellkultur

DMEM (-/-)	Dulbecco´s <i>modified</i> Egel´s Medium (DMEM), <i>high Glucose</i> (4,5 g/l) mit stabilem Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)
DMEM (+/+)	Dulbecco´s <i>modified</i> Egel´s Medium (DMEM), <i>high Glucose</i> (4,5 g/l) mit stabilem Glutamin; ergänzt mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)
RPMI 1640 für primäre Monozyten	RPMI 1640 ohne L-Glutamin, ergänzt mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
RPMI 1640 für Hybridomazellen (HAT-Medium)	RPMI 1640Hybridoma Express plus ergänzt mit 50 µM β-mercaptoethanol und 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)

Trypsin/EDTA (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)

Alle verwendeten Zellkulturmaterialien wurden von Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland) bezogen.

2.1.9 Zelllinien

HEK293	Immortalisierte humane embryonale Nierenzellen; etabliert für transiente und stabile Transfektionen (ATCC®-Nummer: CRL-1573™).
MEF ADAM10^{-/-}	Immortalisierte embryonale Mausfibroblasten, defizient für die Metalloproteinase ADAM10
MEF ADAM17^{-/-}	Immortalisierte embryonale Mausfibroblasten, defizient für die Metalloproteinase ADAM17

MEF ADAM10^{-/-} ADAM17^{-/-}

Immortalisierte embryonale
Mausfibroblasten, defizient für die
Metalloproteinasen ADAM10 und
ADAM17

MEF wt

Immortalisierte embryonale
Mausfibroblasten

Hybridoma-Zellen

Fusionszelllinie aus primären B-Zellen der
Ratte und der murinen Zelllinie P3X63-
Ag8.635

***Escherichia coli* XL1-Blue**

Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA,
USA, *Klonierungsstamm*

***Escherichia coli* BL21**

Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA,
USA, *Protein-Expressionsstamm*

2.1.10 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion GmbH (München, Deutschland) synthetisiert und sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

Name	Nukleotidsequenz
pcDNA3.1-FP	5'- CTCTGGCTAACTAGAGAAC-3'
pcDNA3.1-RP	5'- CAAACAACAGATGGCTGGC-3'
5'hTim-3	5'- GACTGGTACCTCAGAAGTGGAATACAGAGCGGAGG-3'
3'hTim-3	5'- GCTCCGATGTAGATGCCGTCATTGGC-3'
5'AP- hTim-3-ΔS1	5'-GCCAATGACGGCATCTACATCGGAGC-3'
3'AP-hTim-3-ΔS1	5'- GCTCCGATGTAGATGCCGTCATTGGC-3'
5'AP-hTim-3-ΔS2	5'-TTGGCCAATGACTTACGGGACTCTGG-3'
3'AP-hTim-3-ΔS2	5'-CCAGAGTCCCGTAAGTCATTGGCCAAT-3'
5'AP-hTim-3-ΔS3	5'- CCTGATATAAATGAGTTACGG-3'
3'AP-hTim-3-ΔS3	5'-CCGTAACTCATTTATATCAGGGA-3'
5'AP- hTim-3-ΔI5	5'- GATCCGGCGCTTTAATTTTAGCCTCATCTCTTTG-3'
3'AP-hTim-3-ΔI5	5'- GATCCAAAGAGATGAGGCTAAAATTAAGCGCCG-3'
5'AP-hTim-3-ΔI4	5'- GATCAAGATACAGAATTTAGCAAATGCAGTAGCA-3'
3'AP-hTim-3-ΔI4	5'- GATCTGCTACTGCATTTGCTAAATTCTGTATCTT-3'
5'AP-hTim-3-ΔI3	5'- GATCCTCCCTCAGGATTGGAAGAAAACATCTAT-3'
3'AP-hTim-3-ΔI3	5'-GATCATAGATGTTTTCTTCCAATCCTGAGGGAG-3'
3'hTim-3-ΔI1	5'GATCGCGGCCGCTCAGATGTTTTCTTCTGAGCGAATTCCC-3'
3'hTim-3-ΔI2	5'-GATCGCGGCCGCTCAGGGCTCCTCCACTTCATATACGTTC-3'
3'hTim-3-ΔICD	5'- GATCGCGGCCGCGAAAATTAAGCGCCGAA-3'
5'hTim-3-ΔICD+1	5'- GACTGCCAAGGTCACCCCTGCACCGA-3'
5'hTim-3tags	5'-GATCAAGCTTTCAGAAGTGGAATACAGAGCGGAG-3'
3'hTim-3tags	5'- GATCGCGGCCGCTCATGGCATTGCAAAGCGACAACC- 3'
3'hTim-3-ΔICDtags	5'- GATCGCGGCCGCGAAAATTAAGCGCCGAA-3'
5'IgVhTim-3	5'-GATCCATATGTCAGAAGTGGAATACAGAG-3'
3'IgVhTim-3	5'-GACTGCGGCCGCTCCCTTGGCTGGTTTGA-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

2.1.11 Plasmide

pEGFP-N1	Expressionsplasmid (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA); kodiert für eine mutierte Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP); Kanamycin-Resistenz
pcDNA3.1(+)	Vektor für transiente und stabile Proteinexpression in Säugetierzellen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Ampicillin- und Neomycin-Resistenz
puc57	Klonierungsvektor für die Proteinexpression in <i>E.coli</i> . (GenScript USA inc., Piscataway, NJ, USA) ; Ampicillin-Resistenz
pPCR-Script Amp SK(+)	Klonierungsvektor; Ampicillin-Resistenz (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)
pet23a(+)	Bakterieller Expressionsvektor für die IPTG oder Laktose-induzierte Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i> -Stämmen (Novagen, Darmstadt, Deutschland)
pet23a(+)-hTim-4	Bakterieller Expressionsvektor für die Expression des rekombinanten, humanen Tim-4; generiert von Olga Braun
pcDNA3.1(+)-mTim-2	Vektor zur Expression des murinen Tim-2-Proteins in Säugetierzellen; generiert von Christin Dewitz

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um spezifische DNA-Sequenzen für Klonierungen oder das Detektieren spezifischen DNA-Sequenzen zu amplifizieren, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Für Klonierungen wurde die Pfu DNA Polymerase verwendet (ThermoFisherScientific Inc., Waltham, MA, USA), während zur Detektion von spezifischen DNA-Sequenzen die DreamTaq™DNA Polymerase (ThermoFisherScientific Inc., Waltham, MA, USA) verwendet wurde. Die Pfu DNA Polymerase besitzt im Gegensatz zur DreamTaq™DNA Polymerase eine Korrekturaktivität (*proof-reading*).

Der folgende Reaktionsansatz wurde für alle *PCRs* verwendet:

<i>Template</i>	10-100 ng Plasmid
5'-Primer	10 µM
3'-Primer	10 µM
dNTPs	jeweils 10 mM
PCR-Puffer (10x)	5 µl
Polymerase	1 U
ddH ₂ O	ad 50 µl

Für die PCR wurde üblicherweise folgendes Temperaturprogramm verwendet:

95°C	2 min	} 30 Zyklen
95°C	1 min	
65°C – 75°C	1 – 2 min	
72°C	0,5 – 2,5 min	
72°C	10 min	

Die Anlagerungstemperatur der Primer (dritte Zeile des Programms) wurde in Abhängigkeit von dem GC-Gehalt der verwendeten Primer variiert.

Die Elongationszeit (vierte Zeile des Programms) wurde in Abhängigkeit von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments gewählt.

2.2.1.1.1 SOE-PCR

Die *Splicing by overlapping Extension* PCR (SOE-PCR) dient der Fusion zweier oder mehrerer DNA-Fragmente, die um mindestens 30 Basenpaare (bp) überlappen. Um eine Mutation in eine Aminosäuresequenz einzufügen, werden vier Primer benötigt (Abbildung 5). Die beiden äußeren Primer (1 und 4) begrenzen die zu amplifizierende DNA. Die beiden inneren Primer (2 und 3) enthalten die gewünschte Mutation und sind zueinander komplementär. Im ersten Schritt wurde für die PCR jeweils ein äußerer Primer (1 oder 4) und je ein Primer mit der entsprechenden Mutation (2 oder 3) eingesetzt. Die so entstandenen PCR-Fragmente enthalten die gewünschte Mutation und wurden anschließend als Template für die abschließende dritte PCR mit den beiden äußeren Primern (1 und 4) verwendet (siehe Abbildung 5). Hierzu wurden je 1 µl der einzelnen PCR-Ansätze als Template verwendet. Auf diese Weise entsteht ein Insert mit der gewünschten Mutation, das für die Herstellung von Expressionsplasmiden verwendet wird.

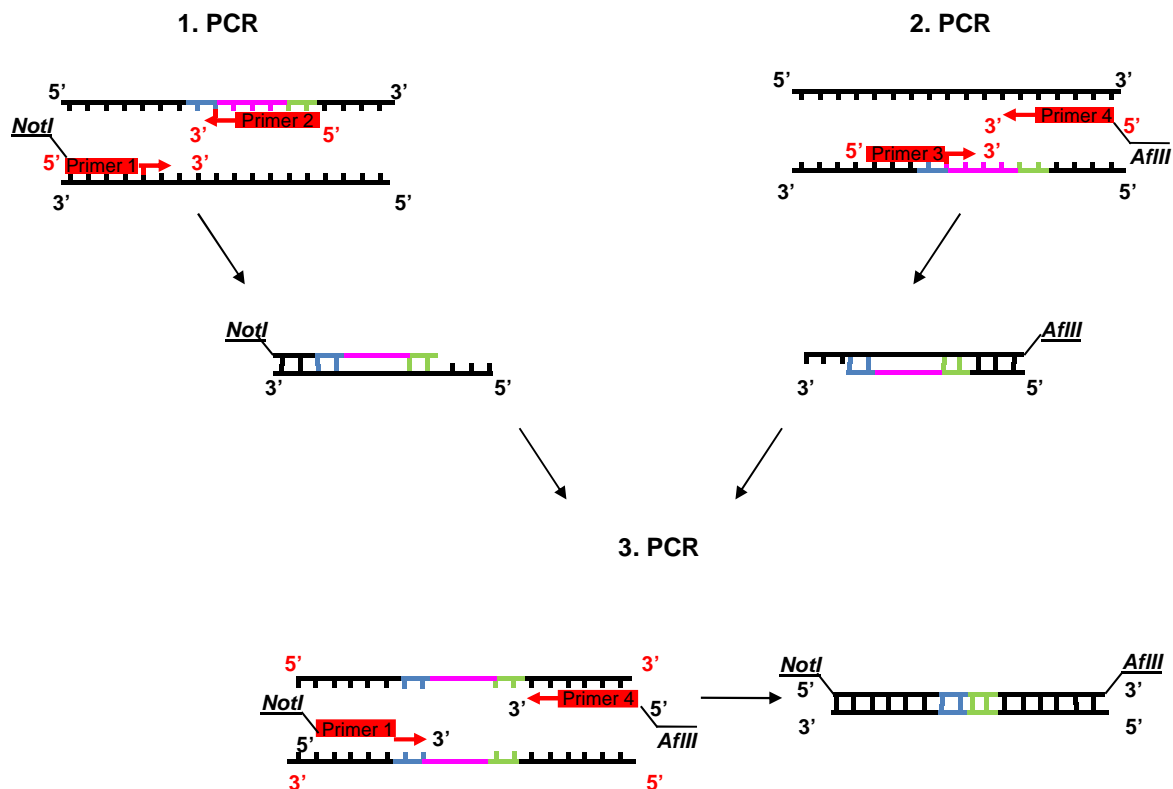


Abbildung 5: Prinzip der SOE-PCR

2.2.1.2 Enzymatische Spaltung von DNA

Die Spaltung von Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Für präparative Arbeiten wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 10 U des entsprechenden Enzyms im jeweiligen Reaktionspuffer in einem Gesamtansatz von 100 µl über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DNA-Ladepuffer beendet und die so entstandenen Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese entsprechend ihrer Größe voneinander getrennt. Dasselbe

Verfahren wurde für PCR-Fragmente verwendet, die für die Ligation in einen Expressionsvektor vorgesehen sind.

Für analytische Arbeiten wurde 1 µg Plasmid-DNA verwendet und in einem Gesamtansatz von 40 µl mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease mindestens für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Wurden zwei unterschiedliche Enzyme in demselben Reaktionsansatz verwendet, wurde der vom Hersteller empfohlene Reaktionspuffer verwendet, der für beide Restriktionsendonukleasen die höchste Effizienz zeigte.

2.2.1.3 Erzeugung von glatten Enden an linearisierten Plasmiden

Um glatte Enden (*blunt ends*) zu erzeugen, wurde im Anschluss an das Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen mit Hilfe des Klenow Fragments (ThermoFisherScientific Inc., Waltham, MA, USA) 5'-überstehende einzelsträngige DNA-Sequenzen aufgefüllt und 3'-überstehende einzelsträngige DNA-Sequenzen abgebaut. Hierfür wurde der Restriktionsansatz mit 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM) und 5 U Klenow Fragment versetzt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und die verwendeten Enzyme bei 75°C für 10 min inaktiviert.

2.2.1.4 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Nach der enzymatischen Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde die Plasmid-DNA durch Addition von 1 U thermosensitiver Alkalischer Phosphatase (*FastAP*, ThermoFisherScientific Inc., Waltham, MA, USA) dephosphoryliert. Die Reaktion wurde nach 1 h bei 37°C durch Zugabe von DNA-Ladepuffer beendet.

2.2.1.5 DNA-Gelelektrophorese

Zur Größentrennung von DNA-Fragmenten wurden 1-2%ige Agarosegele, in Abhängigkeit von der Größe der voneinander zu trennenden Fragmente, verwendet. Die Fragmente wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in horizontalen Elektrophoresekammern (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bei einer konstanten Spannung von 110 V voneinander getrennt. Für die Gele wurde die Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) in 0,5-fachem TBE-Puffer aufgeköcht und mit 0,002% Ethidiumbromid versetzt. Die Gele wurden mit Hilfe eines Gel Doc 2000-Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) dokumentiert.

2.2.1.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu isolieren, wurden Proben, wie in Abschnitt 2.2.1.5 beschrieben, mittels DNA-Gelelektrophorese voneinander getrennt und durch die Zugabe von Ethidiumbromid unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von λ 300 nm sichtbar gemacht. Die gewünschten Fragmente wurden mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten und die Isolierung der DNA erfolgte im Anschluss mit dem *GeneJET Gel Extraction Kit* (ThermoFisherScientific Inc., Waltham, MA, USA) nach Herstellerprotokoll.

2.2.1.7 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Zur spektroskopischen Bestimmung von DNA- bzw. RNA-Konzentrationen in wässrigen Lösungen wurde der *NanoDrop*® ND-1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) verwendet. Der *NanoDrop*® ND-1000 kann DNA-Konzentrationen zwischen 2 und 3.700 ng/μl sowie RNA-Konzentrationen zwischen 2 und 3.000 ng/μl detektieren. Die Reinheit der Nukleinsäureproben wurde über das Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} festgestellt. Für DNA sollte dieses größer als 1,8 und für RNA größer als 2,0 sein.

2.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurde der enzymatisch linearisierte und dephosphorylierte Vektor und das ebenfalls enzymatisch gespaltene Insert in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:5 mit 2 μl Ligationspuffer und 1 μl der T4 DNA-Ligase (ThermoFisherScientific Inc., Waltham, MA, USA) in einem Gesamtvolumen von 20 μl für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Für *blunt end* - Klonierungen wurden 2 U Ligase und zusätzlich 2 μl PEG4000 verwendet. Die Inkubation erfolgte zunächst bei Raumtemperatur für 1 h und dann über Nacht bei 4°C.

2.2.1.9 Transformation von chemisch kompetenten *Escherichia coli*

25 μl einer chemisch kompetenten *Escherichia coli*-Lösung (10^5 Zellen) wurden mit 10 ng Plasmid-DNA oder 20 μl Ligationsansatz versetzt. Die Bakterien wurden dann zunächst für 5 min auf Eis inkubiert, bevor die Hitzeschock-Transformation (30 s, 42°C) erfolgte. Im Anschluss an die Transformation wurden die Zellen erneut für 5 min auf Eis inkubiert, bevor 150 μl LB-Medium zum Ansatz gegeben wurden und die transformierten Bakterien für 1 h bei 37°C und 850 rpm im Thermoschüttler inkubiert wurden. Die Bakteriensuspension wurde schließlich auf einer LB-Platte, die das passende Antibiotikum zur Selektion enthielt, ausgestrichen und bis zur Bildung von Einzelkolonien über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.10 Plasmid-DNA Mini-Präparation

Für die Mini-Präparation von Plasmid-DNA wurde für jede einzelne Kolonie mit 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und über Nacht bei 37°C und 850 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Die Bakterienkultur wurde bei 12.000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Bakteriensediment wurde für die Mini-Präparation verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kits (ThermoFisherScientific Inc., Waltham, MA, USA), nach Angaben des Herstellers, isoliert. Nach einer alkalischen Lyse des Bakteriensediments wurde die Plasmid-DNA an eine Kieselsäuregel-Matrix gebunden und anschließend gereinigt. Nach der Eluierung kann die Plasmid-DNA für weitere molekularbiologische Methoden verwendet werden.

2.2.1.11 Plasmid-DNA Midi-Präparation

Für die Midi-Präparation von Plasmid-DNA wurde für jede einzelne Kolonie 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und über Nacht bei 37°C und 160 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Die Bakterienkultur wurde bei 4.000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Bakteriensediment wurde für die Mini-Präparation verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des NucleoBond Xtra Midi Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co.Kg, Düren, Deutschland), nach Angaben des Herstellers, isoliert. Nach einer alkalischen Lyse des Bakteriensediments bindet die Plasmid-DNA selektiv an eine Kieselsäuregel-Matrix zum Anionenaustausch (*anion exchange resin*) basierend auf Methylaminoethanol. Nach der Eluierung wurde die DNA mit Hilfe von Isopropanol gefällt. Anschließend wurde die DNA-Konzentration, wie in Abschnitt 2.2.1.7 beschrieben, bestimmt.

2.2.1.12 Sequenzierung von DNA

Alle Inserts der selbst hergestellten Plasmide wurden von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) sequenziert. Es wurde eine enzymatischen Sequenzierung, auch Kettenabbruch-Methode nach Sanger genannt, durchgeführt. Hierzu wurden die firmeneigenen Primer pcDNA3.1-FP, pcDNA3.1-RP und T7 verwendet.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

HEK293-Zellen wurden in DMEM (+/+) bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator (NuAire US Autoflow, NuAire Inc., Plymouth, USA) kultiviert. Alle verwendeten adhärenenten Zelllinien wurden bei einer Konfluenz von ca. 80% mit 2 ml Trypsin-EDTA pro 10 cm-Petrischale abgelöst und im Verhältnis 1:20 in eine neue 10 cm-Schale mit 10 ml Kulturmedium überführt.

2.2.2.2 Transfektion von HEK293

Zur Transfektion von HEK293-Zellen wurden 1×10^6 HEK293-Zellen in einer 10 cm-Petrischale mit 10 ml DMEM (+/+) ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mittels TurboFect (ThermoFisherScientific Inc., Waltham, MA, USA) mit 5 µg des entsprechenden DNA-Plasmids transfiziert. TurboFect ist ein kationisches Polymer, dass positiv geladene Komplexe mit der Plasmid-DNA bildet, um dieser die Durchquerung der Zellmembran zu erleichtern. Hierzu wurde die Plasmid-DNA mit 1 ml DMEM (-/-) und 20 µl TurboFect gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Kulturmedium gegen 5 ml DMEM(+/+) getauscht und der Transfektionsansatz tröpfchenweise hinzugegeben. *Shedding*-Experimente erfolgten nach weiteren 48 h, wie beschrieben in Abschnitt 2.2.2.5.

2.2.2.3 Transfektion von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Zur Transfektion von ADAM10-, ADAM17-defizienten bzw. doppeldefizienten MEFs wurden 2×10^6 Zellen in einer 10 cm Petrischale mit 10 ml DMEM (+/+) ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mittels TurboFect (ThermoFisherScientific Inc., Waltham, MA, USA) mit 5 µg des entsprechenden DNA-Plasmids transfiziert. Hierzu wurde die Plasmid-DNA mit 1 ml DMEM (-/-) und 20 µl TurboFect gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Kulturmedium gegen 5 ml DMEM(+/) ausgetauscht und der Transfektionsansatz tröpfchenweise hinzugegeben. Die *Shedding*-Experimente erfolgten nach weiteren 48 h wie beschrieben in Abschnitt 2.2.2.5.

2.2.2.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Um die Oberflächenexpression verschiedener Proteine zu bestimmen, wurde die Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*) verwendet. Hierfür wurde die geeignete Zellzahl zunächst mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (300 g, 5 min, 4°C) und mit dem passenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörper in 100 µl FACS-Puffer für 1 h bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 150 µl FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (300 g, 5 min, 4°C). Diese Schritte wurden alle in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Für die durchflusszytometrische Messung wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und analysiert (FACS Canto und FACS Diva Software, beides von BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland).

2.2.2.5 Analyse des Ektodomänen-*Sheddings*

Zur Bestimmung von membrangebundenen Tim-3-Protein und dem Anteil an löslichen Tim-3-Protein im Überstand nach Stimulation mit PMA (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland), Ionomycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) oder N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulphonamid (W7, Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) wurden HEK293-Zellen 24 h nach der Transfektion abgelöst, zentrifugiert (1.500 g, 5 min), gezählt und in 6-Well-Platten mit einer Zellzahl von 5×10^5 /Well in 2 ml DMEM(+/) ausgesät. Nach weiteren 24 h wurde das Medium durch 600 µl DMEM(-/-) ersetzt. Nach der Zugabe von Hydroxamaten (3 µM) oder EDTA (10 mM) wurden die Zellen 30 min bzw. 10 min inkubiert und anschließend wurde 100 µM PMA (1 h), 5 µM Ionomycin (30 min) oder 100 µM W7 (1 h) zugegeben. Hydroxamate sind chemisch synthetisierte Moleküle, die eine funktionelle Gruppe enthalten, die in der Lage ist an das Zink-Atom in der katalytischen Domäne von Metalloproteasen zu binden und auf diese Weise die katalytische Aktivität zu inhibieren. Der Überstand wurde nachfolgend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4°C), um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Die in der 6-Well Schale verbliebenen Zellen wurden mit 1 ml eiskalten PBS abgelöst und zentrifugiert (15.000 g, 2 min, 4°C), bevor aus ihnen ein Zelllysate hergestellt wurde (siehe Abschnitt 2.2.2.6). Die Menge des enthaltenen Tim-3 in Überstand und Lysat wurden mittels Western Blot (siehe Abschnitt 2.2.3.3) analysiert oder die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase wurde bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.3.6).

2.2.2.6 Lyse von Zellen

Die Zellen wurden mit 1 ml eiskalten PBS abgelöst und zentrifugiert (15.000 g, 2 min, 4°C). Das Sediment wurde in Lysispuffer resuspendiert (6-Well-Schale: 75 µl; 10 cm Schale: 300 µl) und für 2 h unter permanenter Rotation bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Lysate erneut zentrifugiert (15.000 g, 2 min, 4°C), um unlösliche Zellrückstände abzutrennen. Das Zelllysate wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

2.2.3 Protein-biochemische Methoden

2.2.3.1 Calmodulin Pull down Assay

Um die Bindung von Proteinen an Calmodulin nachzuweisen, wurde ein Calmodulin-Pull down-Assay verwendet. Hierzu wurden HEK293-Zellen transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.2.2) und im Anschluss mit Hilfe von 500 µl IP-Lysispuffer lysiert (siehe Abschnitt 2.2.2.6). 100 µl des Zelllysats wurden mit 100 µl Calmodulin-Sepharose 4B (GE Healthcare, München, Deutschland) versetzt, die zuvor dreimal mit 500 µl IP-Bindungspuffer gewaschen wurde. Nach einer zweistündigen Inkubation unter permanenter Rotation wurde die Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert (16.000 g, 2 min, 4°C), der Überstand abgenommen und die Sepharose dreimal mit je 500 µl eiskaltem PBS gewaschen. Im Anschluss wurde die Sepharose in 50 µl 4x-Lämmli-Puffer aufgekocht (10 min, 95°C), erneut zentrifugiert (16.000 g, 2 min, 4°C) und der Überstand für die Analyse mittels Western Blot verwendet.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Größentrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. Hierzu wurde das Mini-PROTEAN 3 Cell-System von Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) verwendet. Die Polyacrylamidgele bestanden aus einem Trenngel mit den Maßen 60 x 90 x 1,5 mm und einem Sammelgel von 10 mm Höhe, die selbst hergestellt wurden. Proben von Zelllysaten wurden vor dem Beladen mit Laemmli-Puffer (4x) versetzt und aufgekocht (10 min, 95°C). Die Überstände wurden mit Hilfe der SpeedVac® Plus SC110A (ThermoScientific, Dreieich, Deutschland) auf ein Endvolumen von 300 µl konzentriert, bevor sie mit Laemmli-Puffer (4x) versetzt und aufgekocht (10 min, 95°C) wurden. Die polymerisierten Gele wurden mit Proben und Marker beladen und die Größentrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 180 V für ca. 1 h.

2.2.3.3 Western Blot

Die Proteine wurden nach der gelelektrophoretischen Größentrennung im Tank-Blotting Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Whatman - Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) in einer Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell-Apparatur (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) transferiert. Die PVDF-Membran wurde mit 100% Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer überführt.

Für den Transfer wurden insgesamt 6 Stücke 3MM *Whatman*-Papier ebenfalls in dem Transferpuffer äquilibriert. Dann wurden 3 Stücke *Whatman*-Papier, das Polyacrylamidgel, die PVDF-Membran und wieder 3 Stücke 3MM *Whatman*-Papier luftblasenfrei in der Blotappertur übereinander geschichtet (Abbildung 6). Der elektrophoretische Proteintransfer fand bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA für 120 min statt.

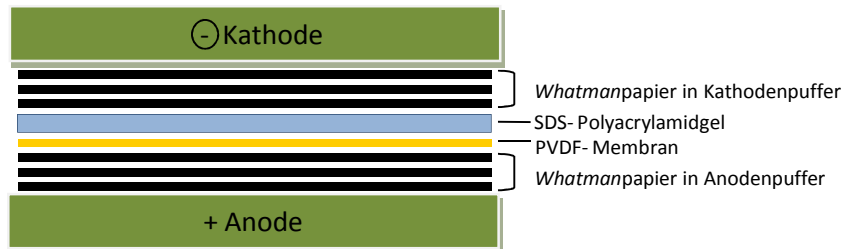


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Blot-Aufbaus beim *Tank-Blotting* Verfahren.

Nach der Immobilisierung der Proteine wurden unspezifische Bindungsstellen mit 6% Milchpulver oder BSA, gelöst in TBS-T, bei Raumtemperatur blockiert und über Nacht bei 4°C mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen, bevor der entsprechende sekundäre Antikörper für 1 h inkubiert wurde. Nach dreimaligen Waschen mit TBS-T für jeweils 10 min wurde die Chemilumineszenz der Proteine mit Hilfe des Pierce ECL Western Blotting Substrates (Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, USA) und eines FluorChem Q-Geräts (Alpha Innotech, Cell Biosciences Inc. Santa Clara, CA, USA) detektiert.

2.2.3.4 *Stripping* von Western Blot-Membranen

Zum Entfernen der Antikörper des ersten Detektionsvorganges wurde die Membran mit Stripping-Puffer für 30 min bei 60 °C inkubiert und anschließend dreimal mit TBS-T für jeweils 10 min gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Membran erneut mit 6% Milchpulver bzw. BSA in TBS-T für 1 h blockiert und über Nacht bei 4°C mit dem neuen Primärantikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte am nächsten Tag wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben.

2.2.3.5 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Die quantitative Bestimmung von Zytokinen erfolgte im *Sandwich*-ELISA-Verfahren. Der erste Antikörper (50 µl/Well) wurde über Nacht an eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Greiner Mikrolon, Solingen, Deutschland) gebunden. Nicht gebundener Antikörper wurde im Anschluss durch Waschen der Platte mit 300 µl/Well PBS-T entfernt. Zur Erhöhung der Stringenz wurde dieser Schritt dreimal wiederholt. Im Anschluss wurde die Platte mit BSA-Blockpuffer 1 h inkubiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Danach wurde die Platte erneut gewaschen (s.o.) und die Proben aufgetragen. Zur Quantifizierung wurde rekombinantes Protein in einer Verdünnungsreihe aufgetragen. Nach 2 h wurde erneut nicht gebundenes Protein durch dreimaliges Waschen entfernt (s.o.) und die Wells mit 50 µl/well des biotinylierten Detektionsantikörpers für weitere 2 h inkubiert. Zur Entfernung des

ungebundenen Antikörpers wurden die Wells erneut gewaschen, bevor 100 µl der Streptavidin-POD-Lösung (von R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) 1:200 in 1% BSA/PBS hinzugegeben wurde. Nach 20-minütiger Inkubation unter Lichtausschluss wurde die Platte erneut gewaschen und 50 µl/Well *BM blue POD-Substrate* (Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen) zugegeben. *BM blue* enthält 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), ein chromogenes Substrat der Peroxidase (POD), das durch die Peroxidase oxidiert wird und einen blauen Farbumschlag zur Folge hat. Die Reaktion wurde nach maximal 20 minütiger Inkubation unter Lichtausschluss durch Zugabe von 50 µl/Well 1,8 M H₂SO₄ beendet. Die colometrische Auswertung bei einer Wellenlänge von λ 450 nm wurde mit dem *Tecan Spectra Rainbow Plattenreader* (Tecan, Maendorf, Schweiz) durchgeführt.

2.2.3.6 Alkalische-Phosphatase-Shedding-Assay

Für den Versuch wurden 1×10^6 HEK293-Zellen in einer 10 cm Petrischale ausgesät und nach 24 h mit 5 µg des entsprechenden DNA-Plasmids transfiziert (Abschnitt 2.2.2.2). Nach weiteren 24 h wurden jeweils 500.000 transfizierte Zellen für die darauffolgende Stimulation auf 6-Well-Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit den gewünschten Reagenzien, wie zum Beispiel 100 µM PMA, 100 µM W7, 10 mM EDTA, 5 µM Ionomycin oder 3 µM Hydroxamaten, in 600 µl DMEM^{-/-} stimuliert. Im Anschluss an die Stimulierung wurden die Zellüberstände geerntet und zusammen mit den isolierten Proteinen des Zelllysats bei -20°C eingefroren. Zur Bestimmung der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase wurden 50 µl des konditionierten Mediums und 5 µl des Zelllysats eingesetzt. Zu jeder Probe wurde 50 µl des Alkalische Phosphatase-Puffers gegeben und die Extinktion bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von λ 405 nm gemessen (Abbildung 7). Über die folgende Rechnung wurde das Verhältnis der Enzymaktivität des Überstandes zur Gesamtprotein-Enzymaktivität und somit das Verhältnis der Enzymaktivität der alkalische Phosphatase bestimmt:

$$\text{Verhältnis d. Enzymaktivität d. alkalischen Phosphatase} = \frac{E_{405 \text{ nm}} \text{ Zellüberstand}}{E_{405 \text{ nm}} \text{ Zellüberstand} + E_{405 \text{ nm}} \text{ Zelllysats}}$$

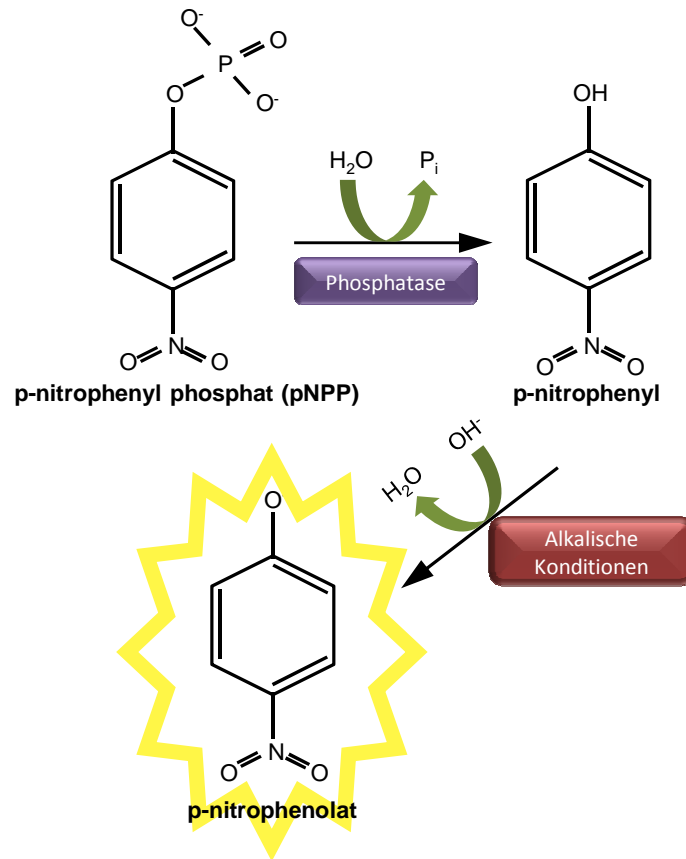


Abbildung 7: Mechanismus für die chemische Umsetzung von pNPP durch die alkalische Phosphatase und die Entstehung eines fluoreszierenden Produktes.

2.2.4 Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen Tim-3

2.2.4.1 Expression und Reinigung der Tim-3-IgV-Domäne für die Antikörperherstellung

Für die Herstellung des Antigens wurden *E.coli* BL21 mit dem entsprechenden bakteriellen Expressionsvektor transformiert (siehe Abschnitt 2.2.1.9). Anschließend wurden die transformierten Bakterien in 1 l LB-Medium, welches 100 µg/ml Ampicillin enthielt, inkubiert. Um die Proteinüberexpression zu induzieren wurde 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) zur Bakterienkultur mit einer Optischen Dichte (OD) von 0,1 gegeben. IPTG induziert die Proteinexpression indem es als Induktor des *lac*-Operons agiert. In dem verwendeten Expressionsvektor befindet sich das Zielgen unter der Kontrolle eines *Lac*-Repressor regulierten Promotors, der durch IPTG gebunden wird. Auf diese Weise kann die Proteinexpression aktiviert werden.

Die Bakterienkultur wurde in einem Schüttelinkubator inkubiert (100 g, 37°C), bis das Bakterienwachstum eine OD von 0,6-0,8 erreicht hatte. Die Bakterien wurden im Anschluss durch Zentrifugation (2.000 g, 15 min, 4°C) sedimentiert, und die im Sediment enthaltenen Bakterien durch Ultraschallbehandlung mittels Sonopuls UW2200, SH2133, Titanteller TT13

(Bandelin, Berlin, Deutschland) lysiert. Durch die große Menge an neusynthetisiertem Protein kommt es zur Bildung von Faltungsintermediaten, die aufgrund ihrer hydrophoben Bereiche auf der Oberfläche aggregieren. Die Akkumulation großer Mengen inaktivem Protein in Bakterien führt dann zur Bildung von Einschlusskörperchen, den sogenannten *Inclusion bodies*, innerhalb des Bakteriums, in denen das inaktive Protein deponiert wird. Um das Protein aus den *Inclusion bodies* zu entlassen, wurde Urea-Denaturierungspuffer verwendet. Mit Hilfe des Renaturierungspuffers wurden die Proteine zurückgefaltet bevor der Puffer mittels NAP-25 Säule (GE Healthcare, München, Deutschland) ausgetauscht wurde. Um eine monomere Proteinfraktion zu erhalten, wurden die rekombinanten Proteine über eine Superdex75 16/60 Säule (GE Healthcare, München, Deutschland) mittels *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) gereinigt. Diese Gelfiltration trennt Moleküle mit unterschiedlichem Molekulargewicht voneinander und separiert auf diese Weise die monomeren von den multimeren Proteinen. Die Säule besteht aus einer quervernetzten Agarosematrix, an die kovalent Dextransketten gebunden sind.

2.2.4.2 Herstellung von Hybridomazellen

Für die Produktion eines monoklonalen Antikörpers gegen Tim-3 wurde die Hybridomtechnik angewendet. Da das humane und murine Tim-3 eine große Sequenzübereinstimmung zeigen, wurde für die Immunisierung *Wistar*-Ratten ausgewählt, um eine mögliche zu geringe Antigeninität von Mäusen auszuschließen. Die Ratten wurden mit einer Emulsion aus 100 µg der gereinigten IgV-Domäne des humanen Tim-3 1:2 in 50 µl PBS und 50 µl Gerbu Adjuvant MM (Gerbu Biotechnik, Heidelberg, Deutschland) intraperitoneal immunisiert. Nach 7, 14 und 21 Tagen wurden die Ratten erneut mit 50 µg des gereinigten Proteins in 100 µl 20% Gerbu Adjuvant MM (Gerbu Biotechnik, Heidelberg, Deutschland) immunisiert, um die Antikörperreaktion zu verstärken. Die letzten beiden Dosen wurden an Tag 28 und 29 nach der ersten Immunisierung injiziert, bevor an Tag 30 die Milz-B-Lymphozyten isoliert wurden und mit P3X63-Ag8.653 Myelomzellen unter Verwendung von Polyethylenglycol 1500 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) fusioniert wurden. Die Selektion erfolgte über das Kulturmedium, dem Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT)-Medium. In diesem wachsen ausschließlich Hybridomazellen, welche die Eigenschaften beider Fusionspartner in sich vereinigen. Aminopterin inhibiert die *de novo*-Biosynthese der beiden Nukleotide GTP und TTP. B-Zellen können über einen alternativen Syntheseweg GTP aus Hypoxanthin synthetisieren, während die verwendeten Myelomazellen aufgrund einer künstlichen Mutation nicht in der Lage sind diesen alternativen Syntheseweg zu nutzen. TTP wird aus dem zugesetzten Thymidin durch Myelomazellen synthetisiert. Nicht fusionierte B-Zellen und Myelomazellen sowie B-Zell/B-Zell-Hybride oder Myeloma/Myeloma-Hybride sind in diesem Medium nicht überlebensfähig und sterben ab. Nur B-Zell/Myeloma-Hybride können den alternativen Signalweg nutzen, da sie das erforderliche Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) zur GTP-Synthese besitzen und somit im HAT-Medium kultiviert werden können. Die nicht fusionierten, toten Zellen wurden aus der Kultur entfernt, indem der Zellkulturüberstand alle 3-4 Tage durch frisches Medium ersetzt wurde.

2.2.4.3 Selektionsscreening der Antikörper-produzierenden Hybridomaklone

Zum Identifizieren von Klonen, die spezifisch Antikörper gegen Tim-3 bilden, wurde ein ELISA durchgeführt. Hierfür wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Greiner Mikrolon, Solingen, Deutschland) mit 50 µl der rekombinanten IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins mit einer Konzentration von 1 µg/ml beschichtet und über Nacht inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde im Anschluss durch Waschen der Platte mit 300 µl/Well PBS-T entfernt. Zur Erhöhung der Stringenz wurde dieser Schritt dreimal wiederholt. Im Anschluss wurde die Platte mit Casein-Blockpuffer 1 h inkubiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Danach wurde die Platte erneut gewaschen (s.o.). 50 µl der Antikörper-enthaltenden Zellkulturüberstände der Hybridomazellklone wurden pro Well aufgetragen. Nach 2 h wurde erneut nicht-gebundenes Protein durch dreimaliges Waschen entfernt (s.o.) und die Wells mit 50 µl/Well des biotinylierten Detektionsantikörpers für weitere 2 h inkubiert. Zur Entfernung des ungebundenen Antikörpers wurden die Wells erneut gewaschen, bevor 100 µl der Streptavidin-POD-Lösung (von R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) 1:200 in 1% BSA/PBS hinzugegeben wurde. Nach 20-minütiger Inkubation unter Lichtausschluss wurde die Platte erneut gewaschen und 50 µl/Well BM blue POD-Substrat (Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen) zugegeben. Die Reaktion wurde nach maximal 20-minütiger Inkubation unter Lichtausschluss durch Zugabe von 50 µl/Well 1,8 M H₂SO₄ beendet. Die colorimetrische Auswertung bei einer Wellenlänge von λ 450 nm wurde mit dem Tecan Spectra Rainbow Plattenreader (Tecan, Maendorf, Schweiz) durchgeführt.

Zusätzlich wurde eine Western Blot Analyse, wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurden Zellysate von Tim-3 transfizierten HEK293-Zellen verwendet. Antikörper-enthaltende Zellkulturüberstände der Hybridomazellklone wurden als primäre Antikörper genutzt.

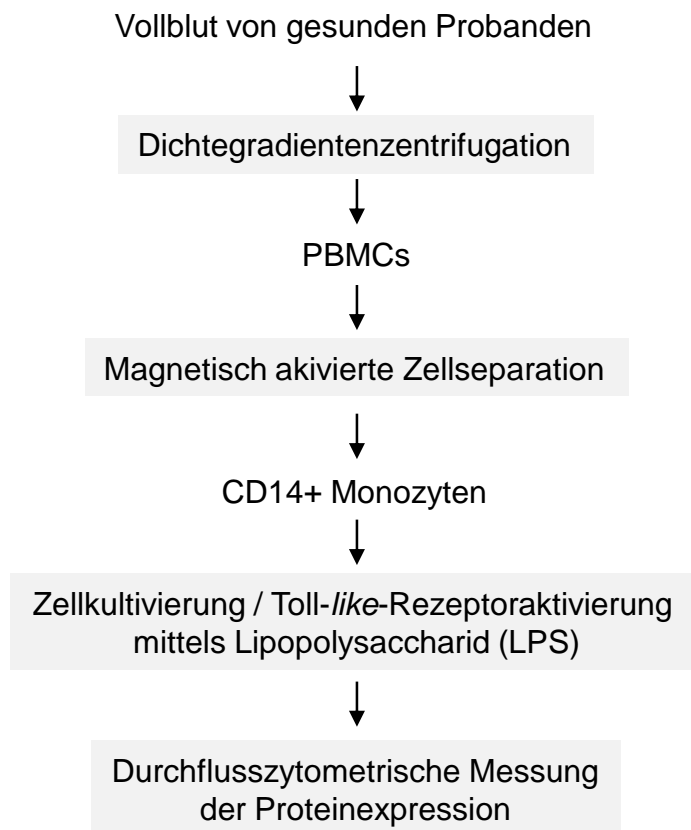
2.2.4.4 Reinigung eines monoklonalen Antikörpers

Nachdem die Hybridomklone 14 Tage kultiviert wurden, wurde der antikörperhaltige Zellüberstand mittels 0,22 µm Filter gefiltert, um Zellrückstände und Verunreinigungen zu entfernen. Mit Hilfe einer *Amicon Stirred ultrafiltration cell 8050/8400* (Merck/Millipore, Darmstadt, Deutschland) 10-fach konzentriert und anschließend entgast. Zur Reinigung wurde die HiTrap Protein G HP (GE Healthcare, München, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die Säule wurde mit Bindungspuffer equilibriert bevor die Antikörperlösung auf die Säule geladen wurde und im Anschluss mit Bindungspuffer gewaschen wurde. Das an die Agarosematrix der Säule gebundene Protein G ist ein Typ III Fc-Rezeptor, der die Fc-Region des Antikörpers bindet. Um den Antikörper zu eluieren, wurde Elutionspuffer verwendet. Da die Antikörper mit einem sauren Puffer eluiert wurden, wurde zur Neutralisierung des Eluats 60 µl Neutralisierungspuffer für 2 ml Eluat in jedes Fraktionsröhrchen vorgelegt, der im Anschluss durch Verwendung einer NAP-10 Säule (GE Healthcare, München, Deutschland) gegen PBS ausgetauscht wurde.

2.2.5 Isolierung primärer Monozyten/Makrophagen aus humanem Blut

2.2.5.1 Präparation von peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs)

Schematische Darstellung der prinzipiellen experimentalen Vorgehensweise:



Zur Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen aus Blut (PBMCs), nach Ethikantragsnummer AD 404/12, wurde von erwachsenen, gesunden Probanden 80 ml Blut verwendet. Das Blut wurde mit dem 2- bis 4-fachen Volumen Isolierungspuffer verdünnt. Die PBMCs wurden mittels *Lymphocyte Separation Medium* LSM 1077 (PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland)), welches Ficoll™ enthält, nach Angaben des Herstellers separiert. Durch die unterschiedliche Migration der verschiedenen Zelltypen und aufgrund unterschiedlicher Dichten während der Zentrifugation, führt dies zur Bildung von Zellschichten (Abbildung 8). Die PBMCs sind in der Interphase zwischen Plasma und Separationsmedium angereichert und können für die Weiterverarbeitung entnommen werden.

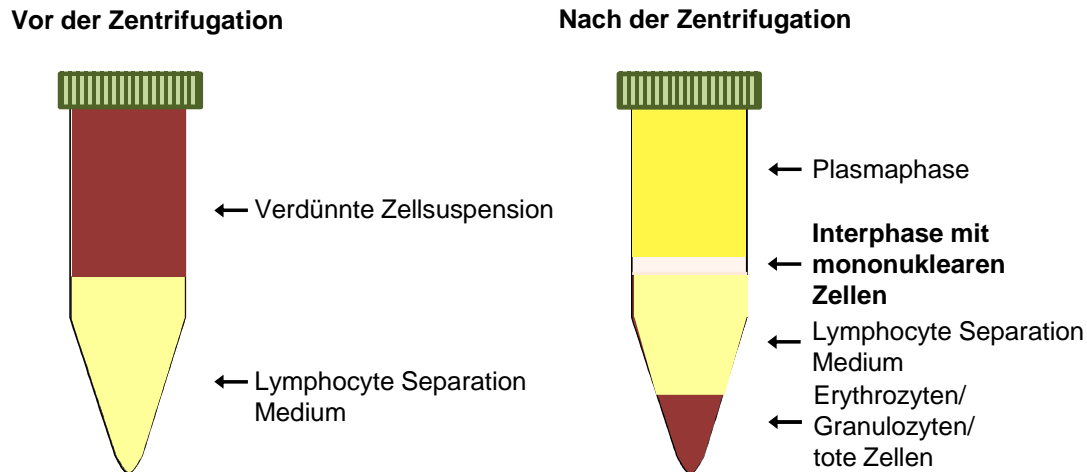


Abbildung 8: Isolierung von PBMCs mittels Ficoll™ Dichtegradientenzentrifugation

2.2.5.2 Magnetisch aktivierte Zellseparation von CD14⁺ Monozyten

Die CD14⁺ Monozyten wurden mittels magnetisch aktivierter Zellsortierung (MACS) isoliert (Miltenyi et al., 1990; Radbruch et al., 1994). Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers der verwendeten MicroBeads™ (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland). MACS® MicroBeads™ sind superparamagnetische Partikel mit einem Durchmesser von 50 nm, an die hochspezifische Antikörper für spezielle Antigene auf der Zelloberfläche gekoppelt sind. Für die Separation von CD14⁺ Monozyten wurden MicroBeads mit einem konjugierten Antikörper gegen CD14 verwendet (Positivselektion). So werden die Antikörper-markierten, also CD14 positiven Zellen, in einem Hochgradienten-Magnetfeld von den CD14 negativen Zellen in der PBMC-Fraktion getrennt (Abbildung 9).

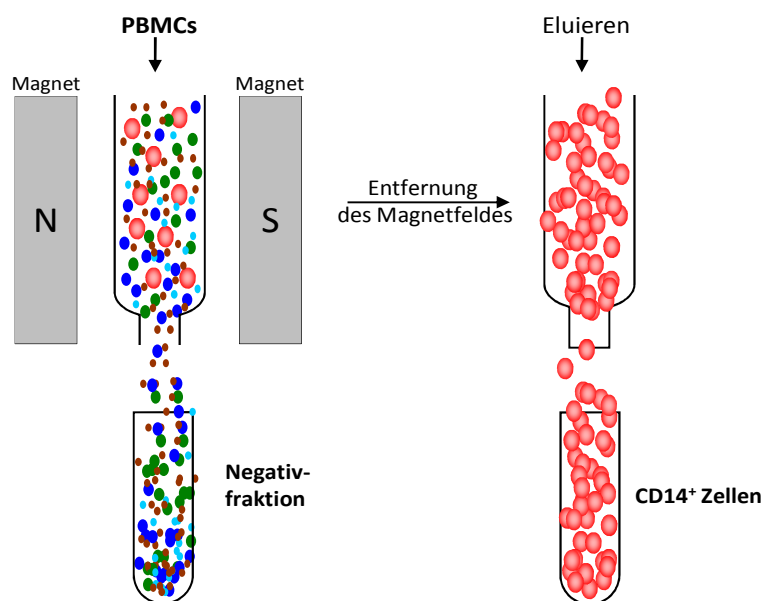


Abbildung 9: Magnetisch aktivierte Zellseparation. N= magnetischer Nordpol, S= magnetischer Südpol.

2.2.5.3 Stimulierung der PBMCs mit Lipopolysaccharid (LPS)

Die isolierten primären Monozyten wurden gezählt und in 12-Well-Platten mit einer Zellzahl von 1×10^6 /Well in 1 ml RPMI 1640 für primäre Monozyten ausgesät. Die Zellen wurden mit 5 μ g/ml Lipopolysaccharid (LPS) für 2, 4, 6, 12, 18 oder 24 h stimuliert. Die Zellen wurden anschließend für die Durchflusszytometrie verwendet und der Zellkulturüberstand wurde im ELISA eingesetzt, um die Konzentration des produzierten TNF α , IL-6 und IL-12 im Zellkulturüberstand zu bestimmen (siehe Abschnitt 2.2.3.5)

2.2.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des ungepaarten Student's *t* Test (Microsoft Excel) vorgenommen. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung und Reinigung eines monoklonalen Antikörpers gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins

Um einen monoklonalen Antikörper gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins herzustellen, wurden *Wistar*-Ratten mit der rekombinanten IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins immunisiert (Abschnitt 2.2.4). Für die Herstellung der rekombinanten IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins wurde zunächst ein Plasmid, das die Aminosäuresequenz für die IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins enthielt, generiert (Abbildung 10). Hierfür wurde die DNA der IgV-Domäne mit Hilfe der Primer 5' IgVhTim-3 und 3' IgVhTim-3 (Tabelle 1) durch PCR (Abschnitt 2.2.1.1) amplifiziert und in den Expressionsvektor pet23a(+) subkloniert. Der Vektor pet23a(+)-hTim-4 (generiert von Olga Braun, Biochemisches Institut, CAU Kiel) und das amplifizierte Insert wurden zunächst mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *NotI* geschnitten. Die DNA wurde daraufhin durch Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach voneinander getrennt und die gewünschten Fragmente ausgeschnitten, bevor sie dann gereinigt und miteinander ligiert wurden. Das entstandene Plasmid wird im Folgenden als pet23a(+)-hTim-3-IgV bezeichnet.

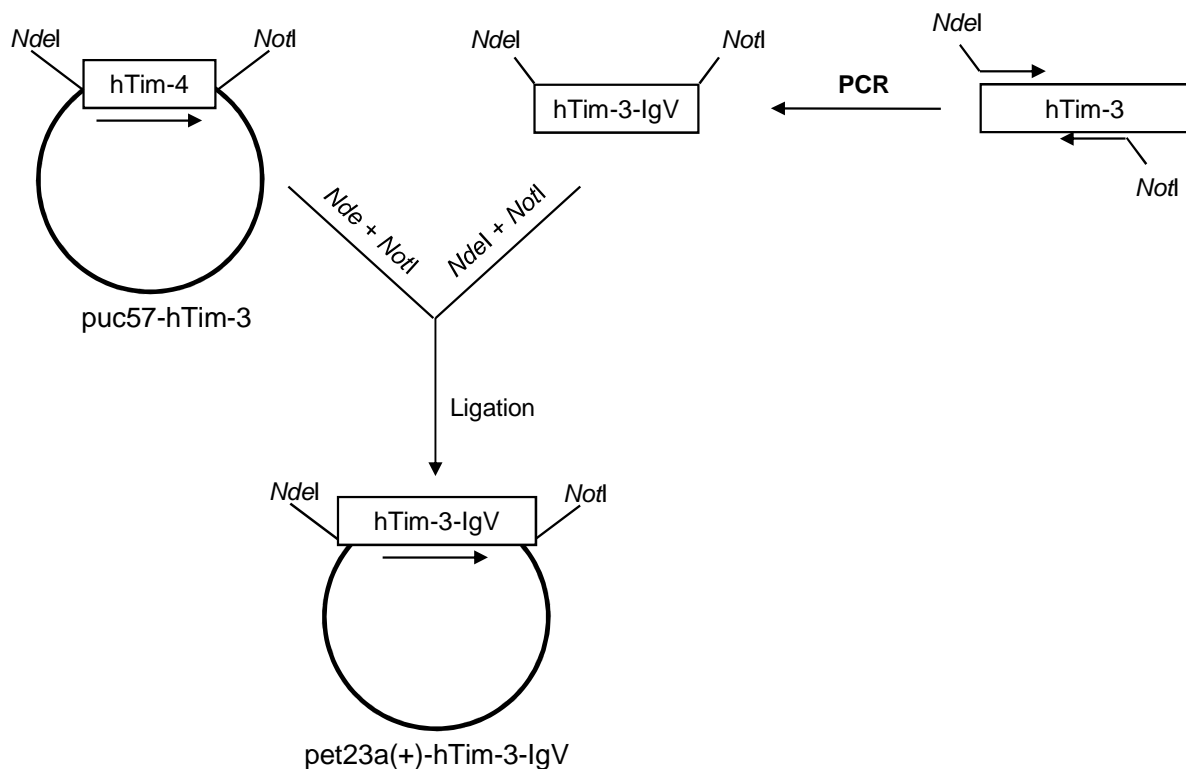


Abbildung 10: Generierung des Expressionsplasmids für die rekombinante IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins. Alle Details sind in Abschnitt 3.2 beschrieben.

Für die Herstellung des monoklonalen Antikörpers wurden *E.coli* BL21 mit dem generierten pet23a(+)-hTim3-IgV transformiert (siehe Abschnitt 2.2.1.9). Die Expression wurde im Anschluss mit 1 mM IPTG induziert und die im Zellysate befindliche Proteine mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung nach 0, 2 und 4 Stunden der Expressionsinduktion visualisiert (Abbildung 11).

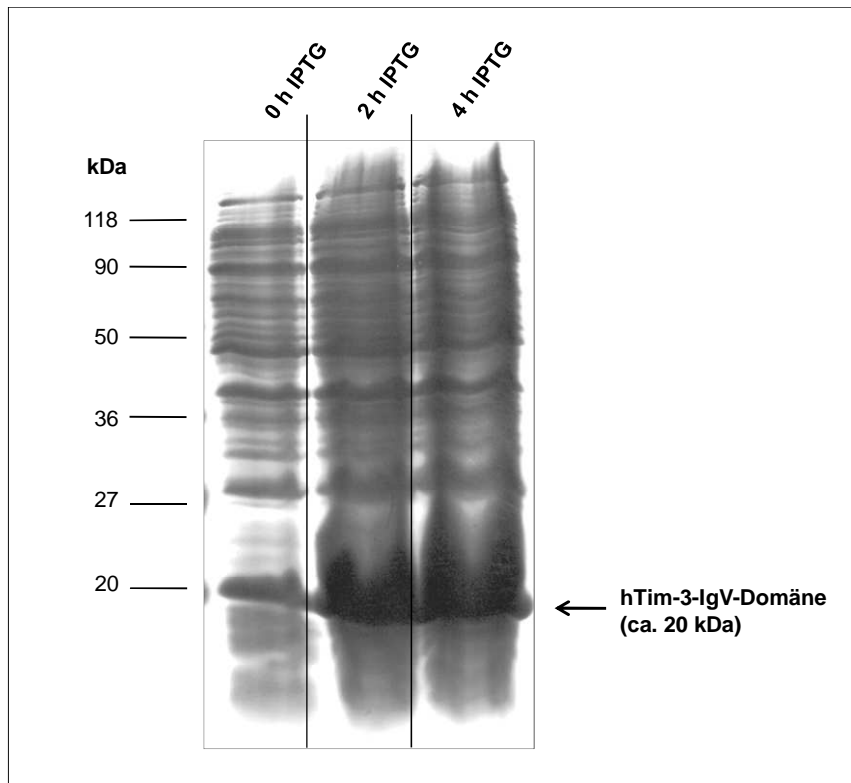


Abbildung 11: Expression der IgV-Domäne des humanen Tim-3 in *E.coli* BL21 nach der Induktion mittels IPTG. *E.coli* BL21 wurden mit dem Expressionsplasmid pet23a(+)-hTim-3-IgV transformiert und die Tim-3-Proteinexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert. Um die Proteinexpression von Tim-3 zu überprüfen, wurden nach 0, 2 und 4 Stunden 1 ml der Bakterienkultur entnommen. Es wurden jeweils 30 µl des in Probenpuffer gelösten Bakteriensediments mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Die sichtbare dominante Proteinbande des mit Coomassie-Lösung gefärbten Gels, war die rekombinante IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins (ca. 20 kDa) (Pfeil). Die Molekulargewichte sind auf der linken Seite angegeben.

Nachdem die rekombinanten Proteine aus *Inclusionbodies* isoliert und mit Hilfe von Renaturierungspuffer rückgefaltet wurden (siehe Abschnitt 2.2.4.1), wurden die rekombinanten Proteine über eine Superdex75 16/60-Säule gereinigt und auf diese Weise die Proteinfractionen der monomeren Proteine von multimeren Proteinen separiert. Die Proteinfractionen wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE und einer anschließenden Coomassie-Färbung analysiert. So konnte gezeigt werden, dass die Proteinfractionen 26 bis 32 die monomere, rekombinante IgV-Domäne des rekombinanten Tim-3-Proteins mit einer ungefähren Größe von 20 kDa enthielten (Abbildung 12). In den Proteinfractionen 21 bis 25 sind zusätzliche Banden mit einem größeren Molekulargewicht zu sehen, was auf eine Multimerisierung des Proteins hindeutet. Die monomeren Proteinfractionen wurden vereinigt und für die Immunisierung verwendet.

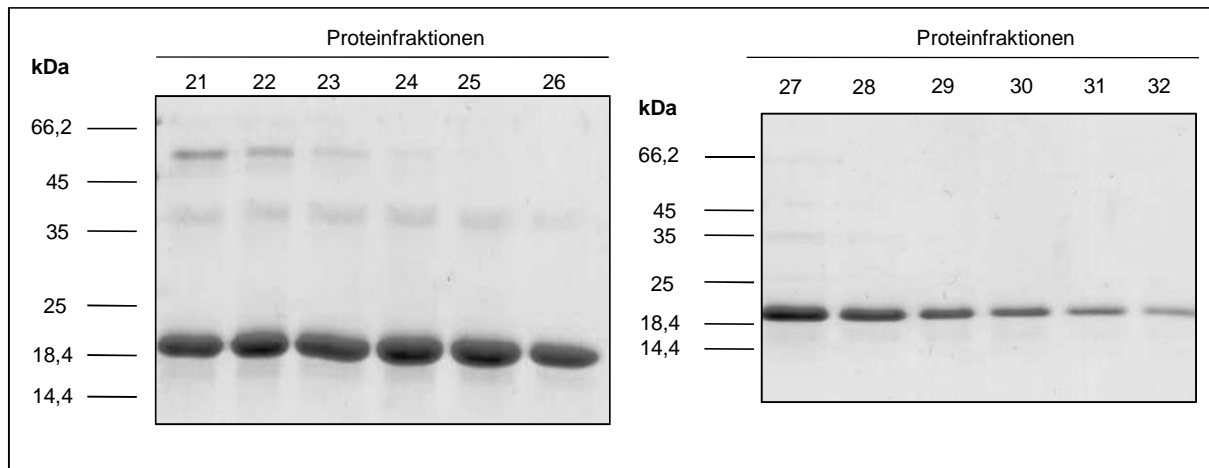


Abbildung 12: SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der Proteinfractionen der in *E. coli* BL21 hergestellten IgV-Domäne des humanen Tim-3-Protein nach der Separation mittels Superdex75 16/60-Säule. Die in *E. coli* BL21 produzierte rekombinante IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins wurde nach der Expression in *Inclusionbodies* zunächst aus diesen isoliert und dann rückgefaltet. Die so entstanden Proteine wurden mit Hilfe der Superdex75 16/60-Säule separiert, um die monomere Fraktion des Proteins für die Immunisierung zu erhalten. Die so separierten Proteinfractionen 21 bis 32 wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE der Größe nach getrennt und mit der Coomassie-Lösung gefärbt. Die sichtbare dominante Proteinbande des mit Coomassie-Färbelösung gefärbten Gels, ist die rekombinante IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins (ca. 20 kDa). Die Molekulargewichte sind auf der linken Seite angegeben.

Die Immunisierung der Ratten und die Herstellung von immortalisierten B-Lymphozyten, die große Mengen der monoklonalen Antikörper produzieren (Hybridomazellen), wurden von Dr. Ahmad Trad (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) durchgeführt. Die Fusion der primären Milz-B-Zellen mit der Myelomzelllinie P3X63-Ag 8.653 ergab zwölf antikörperproduzierende Hybridomazellklone. Die antikörperenthaltenden Zellkulturüberstände der Hybridomazellklone wurden auf ihre Antigen-spezifität im ELISA getestet (Abbildung 13A). Hierfür wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit 1 µg/ml der rekombinanten IgV-Domäne des rekombinanten, humanen Tim-3-Proteins beschichtet. Zusätzlich wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Hierzu wurden Zelllysate von Tim-3 transfizierten HEK293-Zellen verwendet.

Wie Abbildung 13A zeigt, produzierten alle getesteten Hybridomazelllinien Antikörper gegen die rekombinante IgV-Domäne des rekombinanten Tim-3-Proteins. Allerdings erkannte Klon Nummer 12 das Antigen nur in sehr geringem Maß und kam daher nicht für die weitere Verwendung in Frage. Zur Kontrolle der Spezifität wurde rekombinantes Tim-2-Protein verwendet (hergestellt von Christin Dewitz, Biochemisches Institut, CAU Kiel). Dieses wurde von allen getesteten Antikörpern nicht erkannt. Für den immunochemischen Nachweis der Spezifität der generierten Hybridomazellklone wurden HEK293-Zellen mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1-hTim-3 transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE ihrer Größe nach getrennt. Wie Abbildung 13B zeigt, konnte mit den Zellkulturüberständen der Hybridomazellklone 8 und 9 das humane Tim-3-Protein, welches eine Größe von etwa 60 kDa aufweist, detektiert werden. Als Kontrolle wurden Lysate von HEK293-Zellen verwendet, die mit dem pcDNA3.1-mTim-2-Expressionsplasmid (hergestellt

von Christin Dewitz, Biochemisches Institut, CAU Kiel) transfiziert wurden. Dieses wurde von den verwendeten Zellkulturüberständen der Hybridomazellklone nicht erkannt.

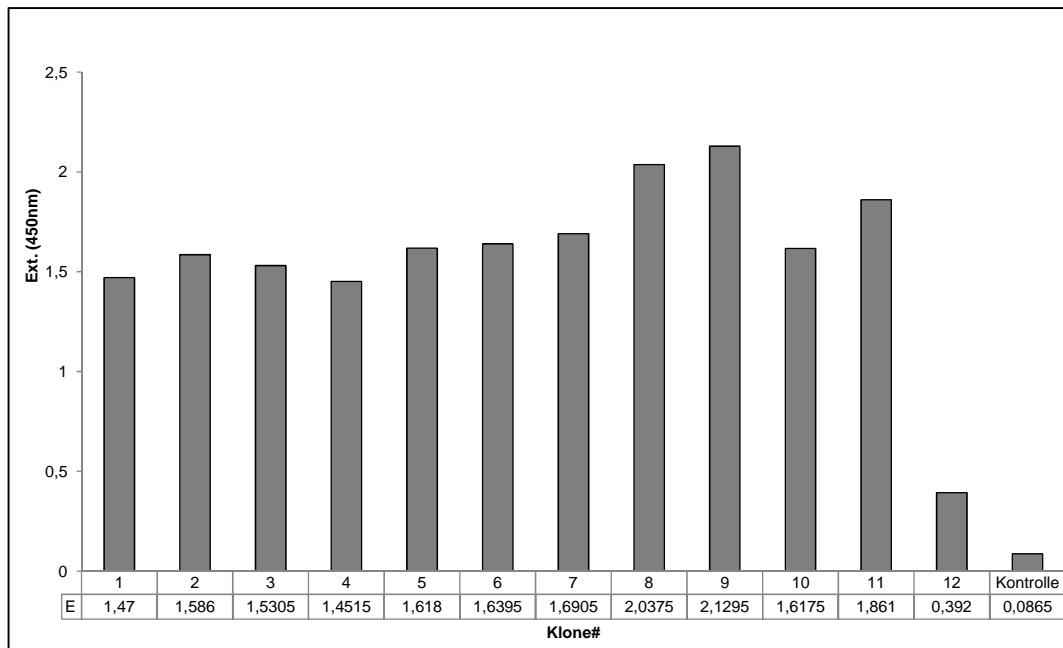
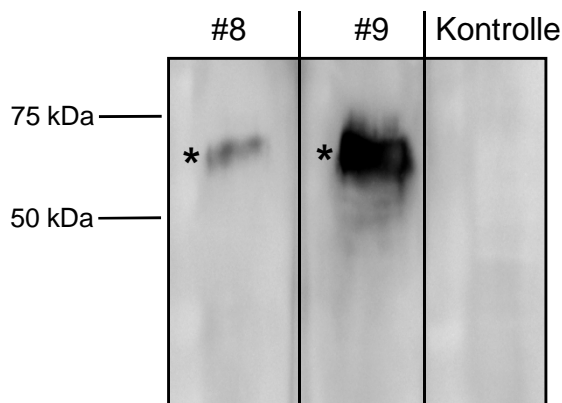
A**B**

Abbildung 13: Immunochemischer Nachweis des humanen Tim-3 mit monoklonalen Antikörpern produziert von Hybridomaklonen

A. Im ELISA wurde 1 µg/ml der rekombinanten IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins zur Beschichtung der Platte verwendet. Diese wurde mit den Antikörper-enthaltenden Zellkulturüberständen der Hybridomazellklone (1:1.000) und dem Anti-Ratte IgG-POD als sekundären Antikörper (1:5.000) detektiert. Die colorimetrische Auswertung wurde bei einer Wellenlänge von λ 450 nm durchgeführt. Als Spezifitätskontrolle wurde rekombinantes, murines Tim-2-Protein verwendet (von Christin Dewitz, Biochemisches Institut, CAU Kiel, hergestellt).

B. HEK293-Zellen wurden transient mit dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1-hTim-3 transfiziert und nach 48 h lysiert. Die immunochemische Detektion wurde mit den Zellkulturüberständen der Hybridomazellklone 8 und 9 (1:33) und Anti-Ratte IgG-POD als sekundärem Antikörper (1:3.000) durchgeführt. (*) mature Form des humanen Tim-3. Das Molekulargewicht ist auf der linken Seite angegeben. Kontrolle: HEK293-Zellen wurden transient mit dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1-mTim-2 transfiziert, alle weiteren Schritte wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Zur Reinigung des anti-Tim-3-Antikörpers mittels Affinitätschromatographie wurde 1 l Zellkulturüberstand von Hybridomaklon Nr. 9 gesammelt, sterilfiltriert und anschließend auf 100 ml konzentriert. Im Anschluss wurde die Antikörperlösung auf eine HiTrap Protein G-Säule geladen, um den Antikörper zu reinigen (siehe Abschnitt 2.2.4.4). Nach dem Waschen wurden die gebundenen Antikörper durch Nutzung eines sauren Puffers, der Glycin enthält, eluiert. Glycin löst die meisten Protein-Protein- und Antikörper-Antigen-Interaktionen und fördert so die Eluierung des Antikörpers. Alle eluierten Proteinfractionen wurden mittels SDS-PAGE der Größe nach getrennt und mit Coomassie-Lösung gefärbt. Nach der Reinigung waren zwei Proteinbanden, mit einer ungefähren Größe von 50 kDa und 25 kDa sichtbar, welche die schwere und die leichte Kette des gereinigten Antikörpers darstellten (Abbildung 14).

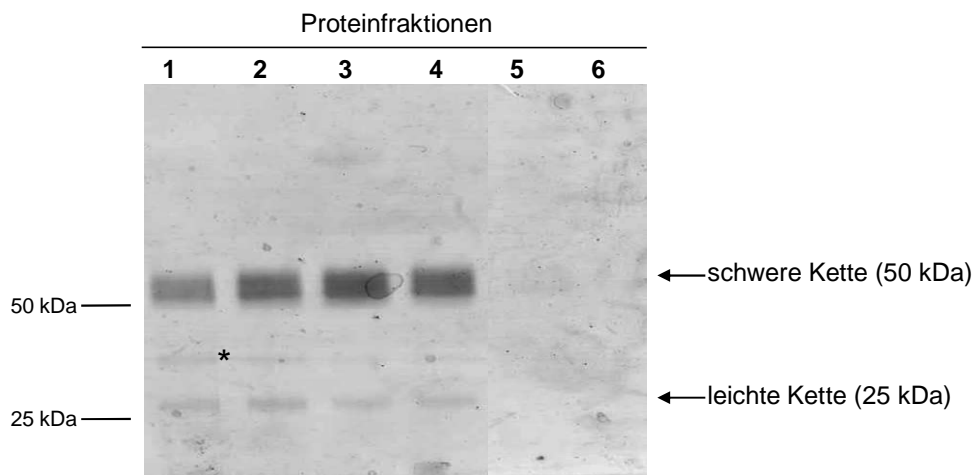


Abbildung 14: Reinigung der monoklonalen Antikörper gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins. 100 ml des von Hybridomaklon Nr. 9 produzierten Zellkulturüberstandes wurden auf eine HiTrap Protein G-Säule geladen. Die gebundenen Antikörper wurden mit 20 ml Elutionspuffer eluiert. Die sechs eluierten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Die zwei sichtbaren dominanten Proteinbanden des mit Coomassie-Lösung gefärbten Gels, entsprechen der schweren (50 kDa) und der leichten (25 kDa) Kette des gereinigten Antikörpers (Pfeile). Der gereinigte Antikörper enthält ein unspezifisches Protein (*), bei dem es sich wahrscheinlich um ein Degradationsprodukt handelt. Die Molekulargewichte sind auf der linken Seite angegeben.

Die Proteinfractionen 1 bis 4 wurden vereinigt und der Puffer wurde mit Hilfe einer NAP-10 Säule gegen 3 ml PBS ausgetauscht. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels UV-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von λ 280 nm bestimmt und die Antikörperlösung auf eine Konzentration von 1 g/l eingestellt.

Der anti-IgV-hTim-3-Antikörper Klon 9 wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit zur Detektion des membrangebundenen und des löslichen humanen Tim-3-Proteins mittels Western Blot verwendet.

3.2 Generierung von Expressionsplasmiden für das humane Tim-3

Um zu untersuchen, ob das humane Tim-3-Protein durch Proteasen von der Zelloberfläche proteolytisch gespalten wird, wurde zunächst ein Plasmid, das die komplette Aminosäuresequenz für das humane Tim-3 ohne Signalpeptid enthielt, durch die Firma GeneScript (Piscataway, NJ, USA) synthetisiert. Die vollständige Aminosäuresequenz befindet sich in Abschnitt 8.4. Um humane und murine Zellkulturzelllinien transient und stabil mit dem Expressionsplasmid transfizieren zu können, wurde die DNA für das humane Tim-3 in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) eingebracht. Hierfür wurde der Vektor puc57-hTim-3 (GeneScript, Piscataway, NJ, USA) mit den beiden Endonukleasen *AfeI* und *AflIII* geschnitten, um das Insert hTim-3 zu erhalten. Der Vektor pcDNA3.1-mTim-2 wurde mit den beiden Restriktionsendonukleasen *NotI* und *AflIII* geschnitten und mit Hilfe des Klenow-Fragments wurden die 5'-überstehenden einzelsträngige DNA-Sequenzen aufgefüllt. Es entstand eine neue *NotI*-Schnittstelle, da *AfeI* ein 5'-AGC-3' am Insert hinterlässt, was dann mit dem 5'-GGCCGC-3' der aufgefüllten *NotI*-Schnittstelle wieder eine neue 5'-GCGGCCGC-3'-*NotI*-Schnittstelle ergibt. Die DNA-Fragmente wurden daraufhin durch Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach voneinander getrennt und die gewünschten Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten, bevor sie dann miteinander ligiert wurden. Das entstandene Plasmid enthält ein Signalpeptid der murinen Immunoglobulin- κ -Kette und kodiert ebenfalls für einen N-terminalen FLAG-Tag und einen C-terminalen Myc- und 6xHis-Tag. Im Folgenden wird der Expressionsvektor als pcDNA3.1-hTim-3 bezeichnet (Abbildung 15). Um die proteolytische Spaltung des humanen Tim-3 zu untersuchen, wurde die humane Tim-3-cDNA in einen Expressionsvektor eingebracht, der für die alkalische Phosphatase (AP) kodiert. So entstand ein Plasmid, indem sich N-terminal die DNA-Sequenz der AP gefolgt von der DNA-Sequenz für das humane Tim-3 befindet und somit für das AP-hTim-3-Fusionsprotein kodiert. Hierzu wurden die Vektoren pcDNA3.1-AP-mTim-2 (generiert von Christin Dewitz, Biochemisches Institut, CAU Kiel) und pcDNA3.1-hTim-3 mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* geschnitten. Die DNA wurde daraufhin durch Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach voneinander getrennt und die gewünschten Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten, bevor der geschnittene pcDNA3.1-AP-mTim-2-Vektor dephosphoryliert und mit dem hTim-3-Insert ligiert wurde. Das entstandene Plasmid wird im Folgenden als pcDNA3.1-AP-hTim-3 bezeichnet (Abbildung 15).

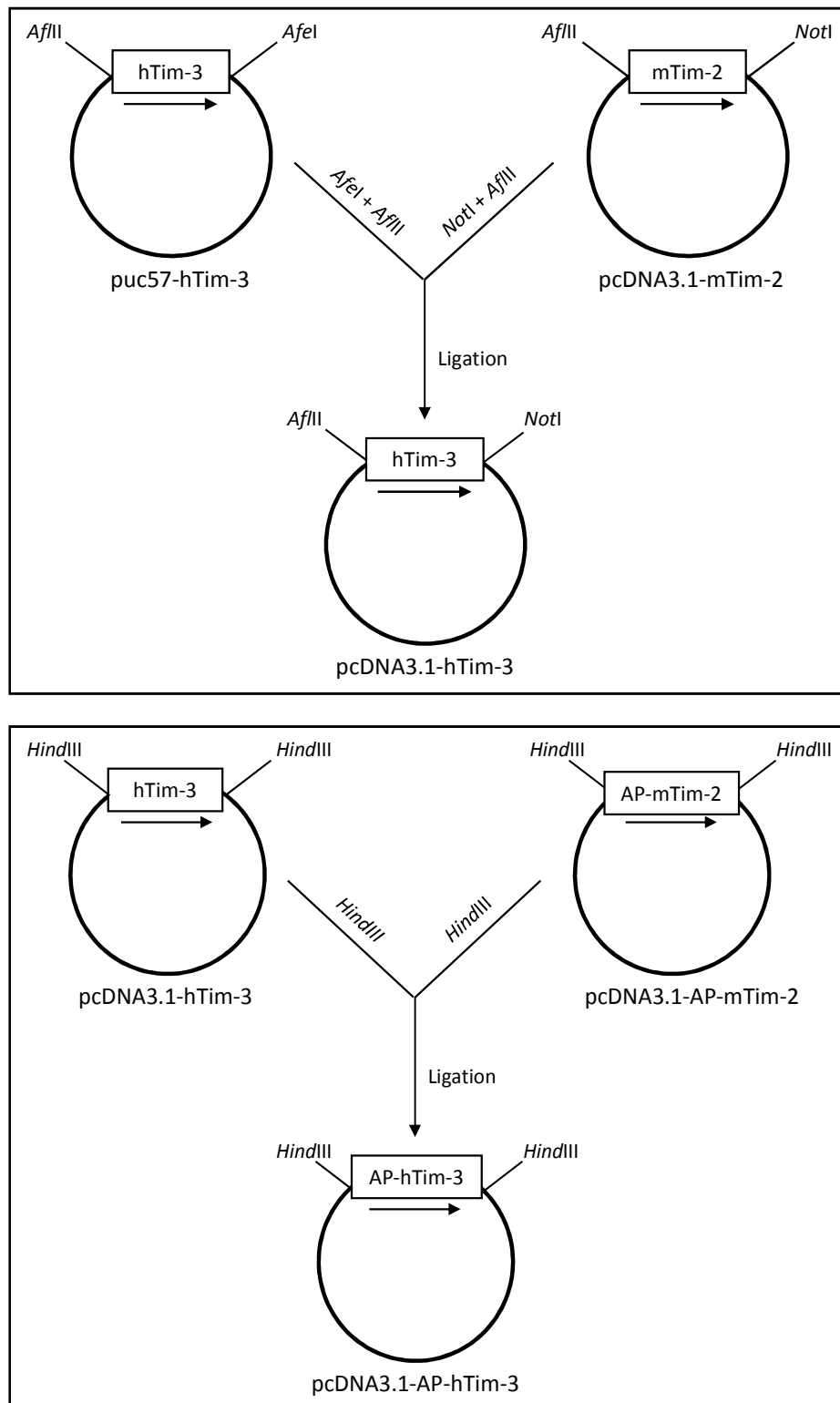


Abbildung 15: Generierung der Expressionsplasmide pcDNA3.1-hTim-3 und pcDNA3.1-AP-hTim-3. Alle Details sind in Abschnitt 3.2 beschrieben. Die Plasmide kodieren ebenfalls für einen N-terminalen FLAG-Tag und einen C-terminalen Myc- und 6xHis-Tag, die hier nicht dargestellt sind. Die vollständige Sequenz befindet sich im Anhang unter Abschnitt 8.4.

Zur Analyse spezieller Bereiche der Tim-3 DNA-Sequenz wurden gezielte Mutationen mittels *Splicing by overlapping Extension PCR (SOE-PCR)* (Warrens et al., 1997) in diese eingebracht. Hierzu wurden unterschiedliche Primer erstellt, die die gewünschte Mutation in

der Mitte tragen und komplementär zu einander sind (Abschnitt 2.2.1.1.1). Im ersten Schritt wurde für die PCR jeweils ein äußerer Primer (1 oder 4) und je ein Primer mit der entsprechenden Mutation (2 oder 3) eingesetzt. Im Anschluss wurden die beiden PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach getrennt und aus dem Gel ausgeschnitten. Danach wurden sie als Template für eine abschließende PCR nur mit den beiden äußeren Primern (1 und 4) verwendet. Das PCR-Produkt, welches nun die gewünschte Mutation enthält, wurde dann mit den beiden Restriktionsendonukleasen *NotI* und *AflII* geschnitten. Zur Präparation des Vektors wurde das Plasmid pcDNA3.1-hTim-3 mit den gleichen Enzymen geschnitten, dephosphoryliert und mittels Gelelektrophorese der Größe nach getrennt und anschließend mit dem PCR-Produkt ligiert (Abbildung 16). Auf diese Weise wurden die Deletionsmutanten pcDNA3.1-hTim-3- Δ S1, pcDNA3.1-hTim-3- Δ S2, pcDNA3.1-hTim-3- Δ S3, pcDNA3.1-hTim-3- Δ I3, pcDNA3.1-hTim-3- Δ I4 und pcDNA3.1-hTim-3- Δ I5 generiert.

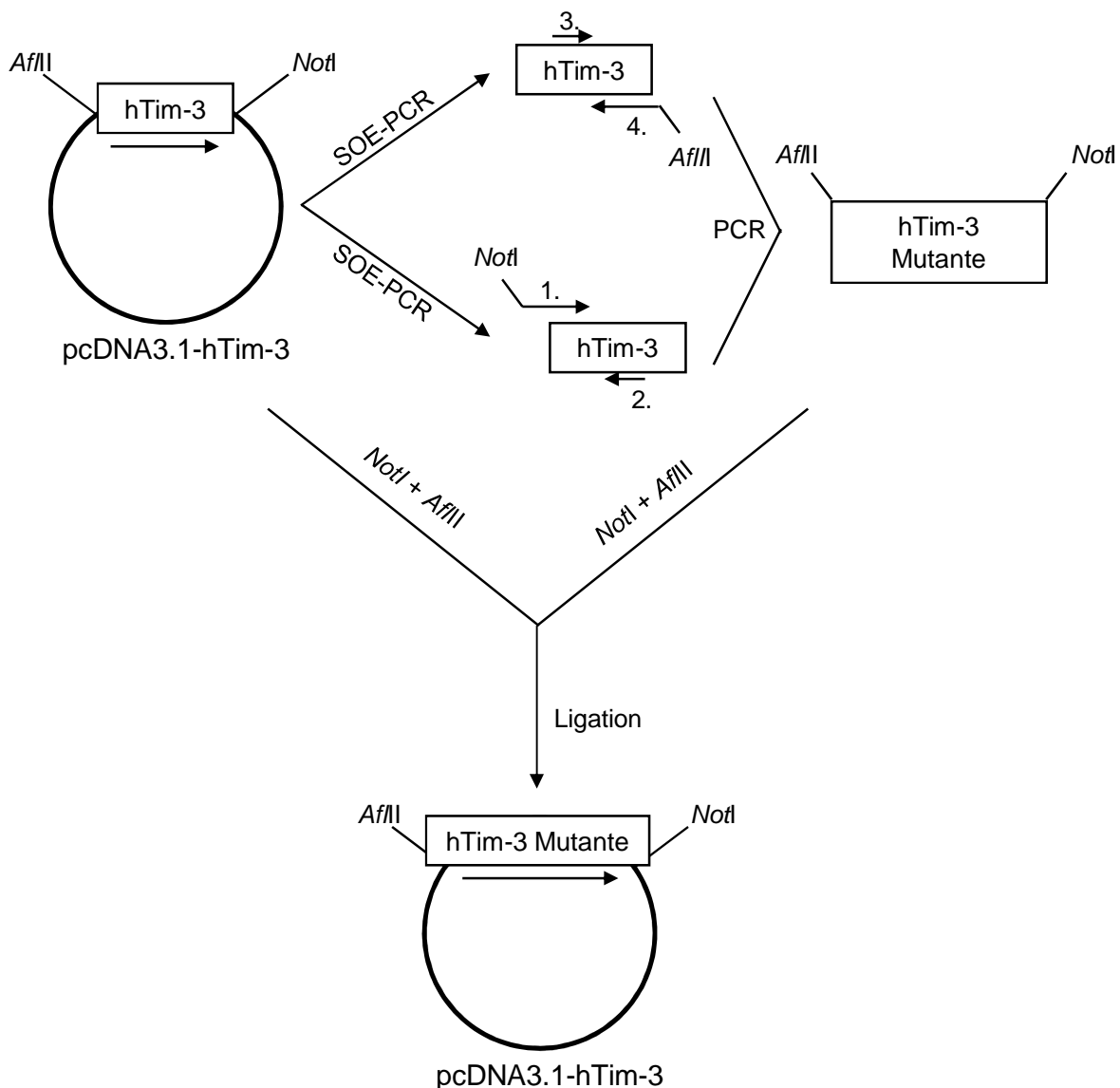


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Generierung von Deletionsmutanten mittels *Splicing by overlapping Extension PCR (SOE-PCR)*. Alle Details sind in Abschnitt 3.2 beschrieben.

3.3 ADAM10 und ADAM17 prozessieren humanes Tim-3

In diesem ersten Versuch sollte untersucht werden, ob das humane Tim-3 durch Ektodomänen-*Shedding* prozessiert wird und welche Protease für dieses verantwortlich ist. Da bereits gezeigt werden konnte, dass Tim-1 durch Metalloproteasen proteolytisch gespalten wird (Lim et al., 2012b; Zhang et al., 2007), sollte die Hypothese geprüft werden, ob auch Tim-3 als weiteres Mitglied der Tim-Familie durch Metalloproteasen prozessiert wird. Dabei ging es zunächst um die Frage, ob bekannte Stimuli von ADAM-Proteasen, wie PMA und Ionomycin, die Entstehung von löslichem Tim-3 induzieren können.

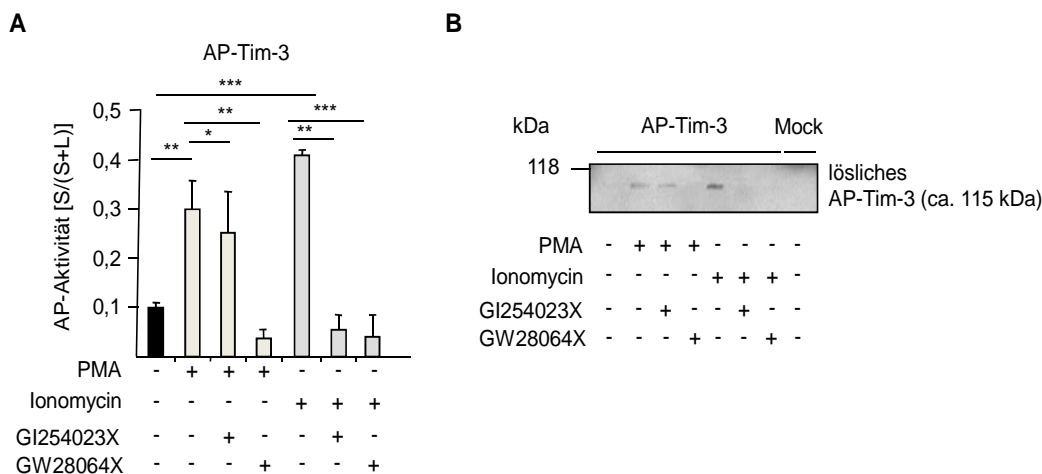


Abbildung 17: Analyse des Ionomycin- und PMA-induzierten *Sheddings* des humanen Tim-3 durch ADAM-Metalloproteasen. HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid, das für das AP-Tim-3 Fusionsprotein kodiert, transfiziert und für 1 h mit PMA (100 μ M) oder für 30 min mit Ionomycin (5 μ M) stimuliert. GI254023X (3 μ M) oder GW280264X (3 μ M) wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. (A) Die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase wurde im Zelllysat (L) und im Zellkulturüberstand (S) gemessen und somit der Anteil des löslichen Tim-3 bestimmt. Die Enzymaktivität der Alkalische Phosphatase (AP-Aktivität) wurde aus dem Verhältnis der Enzymaktivität im Zelllysat und Zellkulturüberstand berechnet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p > 0,01$, *** $p > 0,001$ (ungepaarter Student's t Test) (B) Die Zellen wurden, wie unter (A) beschrieben, behandelt und das lösliche Tim-3-Protein in den Zellkulturüberständen mittels Western Blot detektiert. Hierfür wurde der monoklonale Antikörper gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins verwendet (siehe Abschnitt 2.2.4). Das Molekulargewicht ist auf der linken Seite angegeben. Mock: GFP-transfizierte HEK293-Zellen dienten als Kontrolle.

Um zu untersuchen, ob das humane Tim-3-Protein ein Substrat der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 ist, wurden HEK293-Zellen mit dem Expressionsplasmid, das für das AP-Tim-3 Fusionsprotein kodiert, transfiziert und 48 h nach der Transfektion mit PMA oder mit Ionomycin stimuliert. Die Inhibitoren GI254023X (GI, spezifisch für ADAM10) und GW280264X (GW, inhibiert ADAM10 und ADAM17) wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. Ionomycin und BzATP sind Aktivatoren des ADAM10-vermittelten Ektodomänen-*Sheddings* und PMA gilt als genereller Aktivator des ADAM17-vermittelten *Sheddings* (Scheller et al., 2011a). Wie Abbildung 17 zeigt, führte die Behandlung mit PMA und Ionomycin zur Freisetzung von löslichem AP-Tim-3 in den Zellkulturüberstand

(Abbildung 17A und B). Das durch PMA-induzierte *Shedding* lässt sich vollständig mit GW280264X, nicht jedoch mit GI254023X hemmen. Das durch Ionomycin stimulierte *Shedding* wurde sowohl durch den kombinierten ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW als auch durch den ADAM10-Inhibitor GI stark gehemmt. Dies konnte sowohl durch die Messung der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase als auch im Western Blot gezeigt werden. Diese Versuche zeigen, dass ADAM17 für das PMA-induzierte *Shedding* des humanen Tim-3 verantwortlich ist, und dass ADAM10 das Ionomycin-induzierte Ektodomänen-*Shedding* vermittelt.

Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde ADAM10 durch die rekombinante Pro-Domäne von ADAM10 (A10pro) inhibiert. Die isolierten Pro-Domänen können durch Bindung an die katalytische Domäne der Proteasen als potente und spezifische Inhibitoren der aktiven Enzyme wirken, wie es für ADAM10 und ADAM17 gezeigt wurde (Gonzales et al., 2004; Moss et al., 2007). Hierfür wurden HEK293-Zellen mit dem Expressionsplasmid, das für das AP-Tim-3 Fusionsprotein kodiert, transfiziert und 48 h nach der Transfektion mit PMA oder mit Ionomycin stimuliert. Die ADAM10-Prodomäne wurde 30 min vor der Stimulation zugegeben. Es konnte gezeigt werden, dass das Ionomycin-induzierte *Shedding* durch die Pro-Domäne von ADAM10 komplett inhibiert wurde.

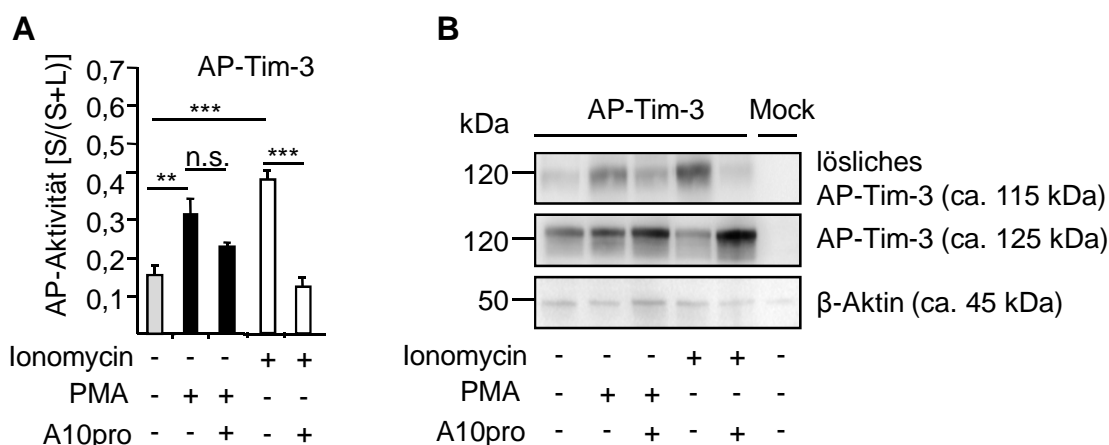


Abbildung 18: Analyse des Ionomycin- und PMA-induzierten *Sheddings* des humanen Tim-3 durch ADAM10. HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid, das für das AP-Tim-3 Fusionsprotein kodiert, transfiziert und für 1 h mit PMA (100 μ M) oder für 30 min mit Ionomycin (5 μ M) stimuliert. Die ADAM10 Prodomäne (A10pro, 10 μ M) wurde 30 min vor der Stimulation zugegeben. (A) Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde im Zelllysat (L) und im Zellkulturüberstand (S) gemessen und somit der Anteil des löslichen Tim-3-Proteins bestimmt. Die Enzymaktivität der Alkalische Phosphatase (AP-Aktivität) wurde aus dem Verhältnis der Enzymaktivität im Zelllysat und Zellkulturüberstand berechnet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten \pm SD. n.s. = nicht signifikant, ** $p > 0,01$, *** $> 0,001$ (ungepaarter Student's *t* Test) (B) Die Zellen wurden, wie unter (A) beschrieben, behandelt und das lösliche Tim-3-Protein in den Zellkulturüberständen mittels Western Blot detektiert. Die Zellen wurden nach der Stimulation lysiert und das membrangebundene, humane Tim-3-Protein im Western Blot visualisiert. Hierfür wurde der monoklonale Antikörper gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3 verwendet (Abschnitt 2.2.4). Die gleichmäßige Beladung wurde durch Visualisierung von β -Aktin sichergestellt. Die Molekulargewichte sind auf der linken Seite angegeben. Mock: GFP-transfizierte HEK293-Zellen dienten als Kontrolle.

Allerdings konnte auch das PMA-induzierte ADAM17-vermittelte *Shedding*, wenn auch nur in geringem Maß, gehemmt werden. Dies könnte an der Hemmung von ADAM17 durch A10pro liegen (Gonzales et al., 2008). Dies konnte sowohl durch die Messung der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase als auch im Western Blot gezeigt werden (Abbildung 18A und B). Um zu testen, ob die alkalische Phosphatase einen Einfluss auf das Ektodomänen-*Shedding* des Tim-3-Proteins hat, wurden HEK293-Zellen mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1-hTim-3, der für das humane Tim-3 kodiert (siehe Abschnitt 2.2.2.2), stabil transfiziert und mit PMA oder mit Ionomycin stimuliert. Die Inhibitoren GI254023X (GI) und GW280264X (GW) sowie die Prodomäne von ADAM10 (A10pro) wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. Wie Abbildung 19 zeigt, führte die Behandlung mit PMA und Ionomycin zur Freisetzung von löslichem AP-Tim-3 Fusionsprotein in den Zellkulturüberstand (Abbildung 19A und B). Das durch PMA-induzierte *Shedding* lässt sich vollständig mit dem kombinierten ADAM10/ADAM17 Inhibitor GW, jedoch nicht mit dem ADAM10 Inhibitor GI oder der ADAM10 Pro-Domäne hemmen. Das durch Ionomycin induzierte *Shedding* konnte sowohl durch GW als auch durch GI und die Pro-Domäne von ADAM10 gehemmt werden. Diese Resultate bestätigen die zuvor erhaltenen Ergebnisse der Messung der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase, dass ADAM17 für das PMA-induzierte *Shedding* des humanen Tim-3-Proteins verantwortlich ist, und dass ADAM10 das Ionomycin-induzierte Ektodomänen-*Shedding* von Tim-3 vermittelt. Desweiteren kann hierdurch ein Einfluss der Alkalischen Phosphatase auf das Ektodomänen-*Shedding* des humanen Tim-3 ausgeschlossen werden.

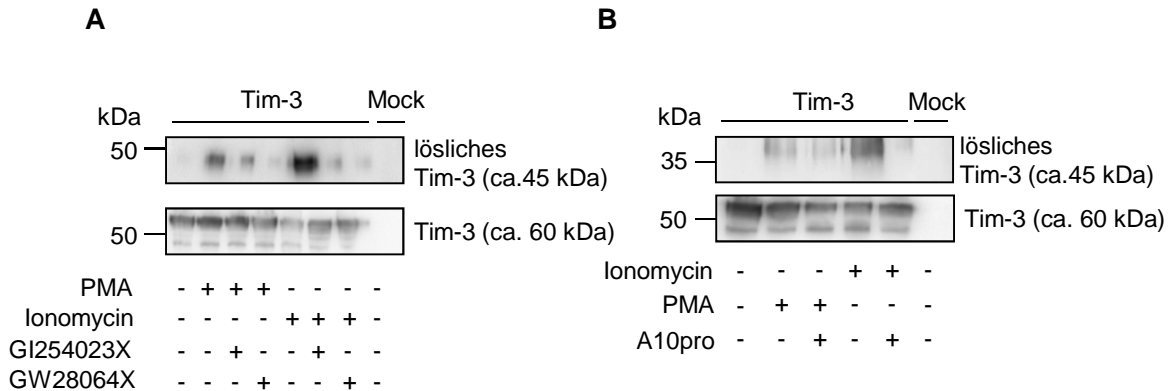


Abbildung 19: Analyse des Ionomycin- und PMA-induzierten *Sheddings* des humanen Tim-3-Proteins und der Einfluss der Alkalischen Phosphatase. HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid, das für das humane Tim-3-Protein kodiert, stabil transfiziert und für 1 h mit PMA (100 μ M) oder für 30 min mit Ionomycin (5 μ M) stimuliert. (A) GI254023X (3 μ M), GW28064X (3 μ M) oder (B) die ADAM10 Prodomäne (A10pro, 10 μ M) wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. Das lösliche Tim-3-Protein in den Zellkulturüberständen wurde dann mittels Western Blot visualisiert. Die Zellen wurden nach der Stimulation lysiert und das membrangebundene, humane Tim-3-Protein ebenfalls im Western Blot visualisiert. Hierfür wurde der monoklonale Antikörper gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins verwendet (siehe Abschnitt 2.2.4). Die Molekulargewichte sind auf der linken Seite angegeben. Mock: GFP-transfizierte HEK293-Zellen dienten als Kontrolle.

3.4 Analyse des Tim-3 *Sheddings* in ADAM10- und ADAM17-Protease-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Um zu analysieren welche Metalloproteasen am Ektodomänen-*Shedding* des Tim-3-Proteins beteiligt sind, können, wie bisher beschrieben, verschiedene Proteaseinhibitoren mit unterschiedlicher Selektivität verwendet werden. Allerdings sind die meisten Inhibitoren nicht nur für eine Protease spezifisch, sondern inhibieren meist unterschiedliche Proteasen. Der in den zuvor durchgeführten Experimenten verwendeten Inhibitoren GI254023X inhibiert mit einer 100-fach größeren Affinität ADAM10 im Vergleich zu ADAM17, besitzt aber ebenfalls die Fähigkeit MMP13 und MMP9 zu inhibieren. Wohingegen GW280264X mit der gleichen Spezifität ADAM10 und ADAM17 inhibiert, aber auch MMP3, 9 und 13 durch dieses Hydroxamat spezifisch gehemmt werden können (Ludwig et al., 2005), sodass von einer 100%igen Spezifität nicht ausgegangen werden kann. Alternativ können aus *Knockout*-Mäusen für die entsprechenden Proteasen Fibroblasten gewonnen und immortalisiert werden, die sogenannten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs). Für die folgenden Experimente wurden Wildtyp-MEFs, bzw. MEFs, die für ADAM10 (ADAM10^{-/-}), ADAM17 (ADAM17^{-/-}) oder für beide Proteasen (ADAM10^{-/-}/ADAM17^{-/-}) defizient sind, verwendet (Garbers et al., 2011; Reiss et al., 2006).

Zunächst wurden die Wildtyp-MEFs und die ADAM10 (ADAM10^{-/-}), ADAM17 (ADAM17^{-/-}) defizienten MEFs sowie MEFs, die für ADAM10 und ADAM17 defizient sind, (ADAM10^{-/-}/ADAM17^{-/-}), transient mit dem Expressionsplasmid, das für das AP-Tim-3 Fusionsprotein kodiert, transfiziert. Die Stimulation erfolgte entweder mit PMA oder Ionomycin. Abbildung 20 zeigt das Ergebnis der Messung der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase. Ionomycin führte in ADAM10^{-/-} MEFs nur zu einer geringen Freisetzung des löslichen Tim-3-Proteins. Allerdings führte auch die Stimulation mit PMA zu einer reduzierten, wenn auch signifikanten, Freisetzung des löslichen Tim-3-Proteins im Vergleich zu den Wildtyp-MEFs. Im nächsten Schritt wurden ADAM17^{-/-} MEFs transient mit dem Expressionsvektor, der für das humane Tim-3 kodiert, transfiziert und mit PMA stimuliert. Dies führte erwartungsgemäß nicht zum *Shedding* des humanen Tim-3-Proteins. Ionomycin stimulierte hingegen das Freisetzen von löslichem Tim-3-Protein. Abschließend wurden MEFs, denen sowohl ADAM10 als auch ADAM17 fehlt (ADAM10^{-/-}/ADAM17^{-/-}), transient mit demselben Expressionsplasmid transfiziert und die AP-Aktivität gemessen. Abbildung 20A zeigt, dass weder PMA noch Ionomycin in diesen Zellen zur Freisetzung des löslichen, humanen Tim-3-Proteins führten, und somit ADAM10 und ADAM17 die beiden für die Prozessierung verantwortlichen Proteasen in diesen Experimenten darstellen. Dies konnte sowohl durch die Messung der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase als auch im Western Blot gezeigt werden (Abbildung 20B). Zusammenfassend zeigten die Experimente, dass eine Stimulation mit Ionomycin selektiv ADAM10 aktiviert, während das *Shedding* des humanen Tim-3-Proteins nach PMA-Stimulation über ADAM17 erfolgte.

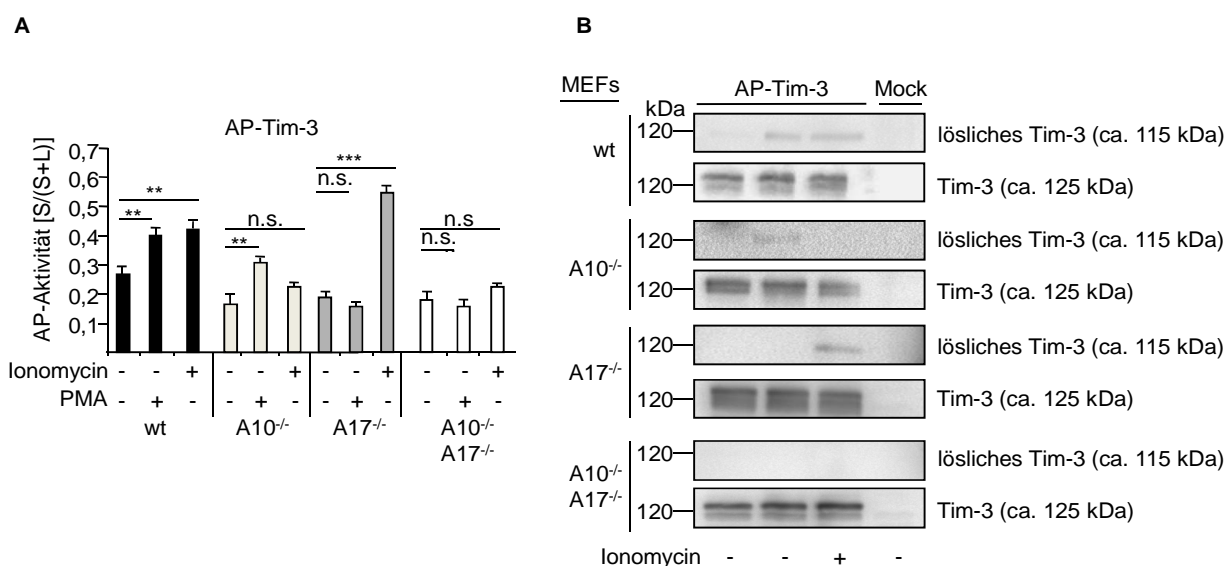


Abbildung 20: Analyse des Sheddings in Wildtyp (wt) MEFs, sowie in MEFs, die defizient für ADAM10 (A10^{-/-}), ADAM17 (A17^{-/-}) oder für ADAM10 und ADAM17 (A10^{-/-}A17^{-/-}) sind. Die MEFs wurden mit dem Expressionsplasmid, das für das AP-Tim-3 Fusionsprotein kodiert, transfiziert und für 1 h mit PMA (100 µM) oder für 30 min mit Ionomycin (5 µM) stimuliert. (A) Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde im Zelllysat (L) und im Zellkulturüberstand (S) gemessen und somit der Anteil des löslichen Tim-3-Proteins bestimmt. Die Enzymaktivität der Alkalische Phosphatase (AP-Aktivität) wurde aus dem Verhältnis der Enzymaktivität im Zelllysat und Zellkulturüberstand berechnet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten ± SD. n.s. = nicht signifikant, **p>0,01, ***p>0,001 (ungepaarter Student's *t* Test) (B) Die Zellen wurden, wie unter (A) beschrieben, behandelt und das lösliche Tim-3-Protein in den Zellkulturüberständen dann mittels Western Blot visualisiert. Die Zellen wurden nach der Stimulation lysiert und das membrangebundene, humane Tim-3-Protein ebenfalls im Western Blot visualisiert. Hierfür wurde der monoklonale Antikörper gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins verwendet (siehe Abschnitt 2.2.4). Die Molekulargewichte sind auf der linken Seite angegeben. Mock: GFP-transfizierte HEK293-Zellen dienen als Kontrolle.

3.5 PMA-induziertes *Shedding* von Tim-3 konnte durch die Deletion von zehn Aminosäuren der Mucin-Domäne verhindert werden

Es wurde bereits in früheren Studien beschrieben, dass ADAM-Proteasen häufig in Nähe der Transmembrandomäne (Juxtaposition) ihre Substrate schneiden (Scheller et al., 2011a). Ein prominentes Beispiel hierfür ist der IL-6-Rezeptor, dessen Schnittstelle für ADAM17 zwischen den Aminosäuren Glutamin357 und Aspartat358 liegt, die etwa acht Aminosäuren von der Transmembran-Domäne entfernt liegt. Eine Deletion von zehn Aminosäuren in dieser Region (Serin353-Valin362) inhibiert das PMA-induzierte *Shedding* von ADAM17 vollständig (Müllberg et al., 1994), aber nicht das von ADAM10 (Baran et al., 2013). Die Mucin-Domäne von Tim-3 besteht aus 70 Aminosäuren von Alanin132 bis Isoleucin201. Um die Schnittstelle(n) für ADAM10 und ADAM17 einzugrenzen, wurden mittels *SOE*-PCR drei Deletionsmutanten des humanen Tim-3-Proteins generiert (Δ S1, Δ 191-201; Δ S2, Δ 181-190; Δ S3, Δ 171-180), bei denen jeweils zehn Aminosäuren der Mucin-Domäne in direkter Nähe zur Transmembrandomäne deletiert sind (Abbildung 21A). Zunächst wurde die Expression

der Deletionsmutanten auf der Zelloberfläche von transient transfizierten HEK293-Zellen mittels durchflusszytometrischer Messung bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass alle Deletionsmutanten auf der Zelloberfläche der HEK293-Zellen exprimiert wurden.

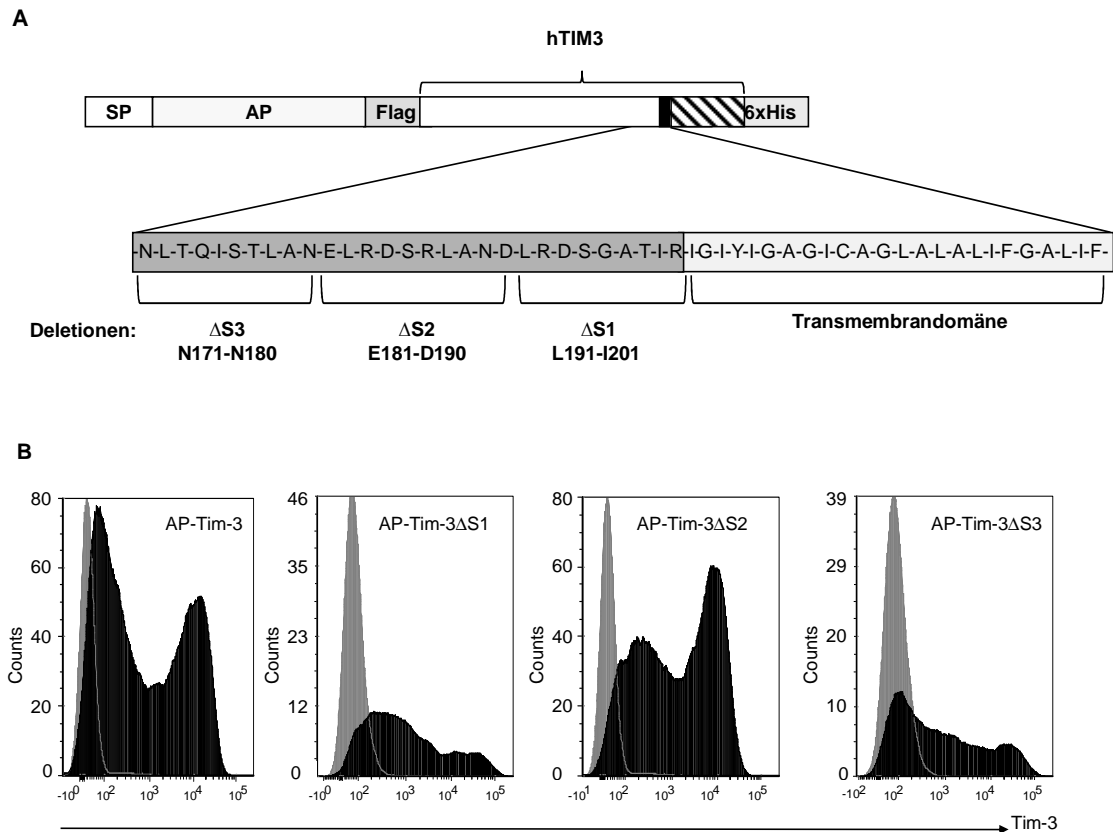


Abbildung 21: Generierung und Zelloberflächenexpression der Tim-3-Deletionsmutanten Tim-3ΔS1 bis Tim-3ΔS3. (A) Schematische Übersicht der generierten AP-Tim-3 Deletionsmutanten, die in dieser Analyse verwendet wurden. Drei Tim-3 cDNAs mit drei unterschiedlichen Deletionen von jeweils 10 Aminosäuren in der Mucin-Domäne (Tim-3ΔS1 bis Tim-3ΔS3) wurden mit Hilfe der SOE-PCR generiert (siehe Abschnitt 3.2). Alle Deletionsmutanten besitzen eine alkalische Phosphatase am N-Terminus. (B) HEK293-Zellen wurden mit den Expressionplasmiden der AP-Tim-3-Deletionsmutanten AP-Tim-3ΔS1 bis AP-Tim-3ΔS3 und Wildtyp-AP-Tim-3 transfiziert. Die Oberflächenexpression wurde mit Hilfe eines PE-markierten Antikörpers detektiert (siehe Abschnitt 2.1.2). Als Negativkontrolle diente der entsprechende Isotyp als Antikörper (graue Histogramme). SP = Signalpeptid.

Als nächstes wurden HEK293-Zellen mit dem Expressionsplasmid, das für das AP-Tim-3 Fusionsprotein kodiert und den Expressionsplasmiden, die für die AP-Tim-3-Deletionsmutanten (AP-Tim-3ΔS1 bis AP-Tim-3ΔS3) kodieren, transfiziert und 48 h nach der Transfektion mit PMA oder mit Ionomycin stimuliert. Wie Abbildung 22A zeigt, führte die Behandlung mit PMA und Ionomycin zur Freisetzung des löslichen AP-Tim-3-Proteins in den Zellkulturüberstand. Die Mutanten AP-Tim-3Δ1 und AP-Tim-3Δ3 werden ebenfalls nach Ionomycin- und PMA-Stimulation proteolytisch prozessiert. Auch wenn bei der Mutante AP-Tim-3ΔS1 die Stimulation mit PMA und Ionomycin zu einer leicht reduzierten, wenn auch signifikanten, Freisetzung des löslichen Tim-3-Proteins im Vergleich zu Wildtyp führte, und

die AP-Tim-3 Δ S3 ein erhöhtes konstitutives als auch induziertes *Shedding* zeigte, kann von diesen Ergebnissen nicht auf eine putative Schnittstelle für ADAM10 oder ADAM17 geschlossen werden. Allerdings zeigte die Messung der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase, dass das durch PMA-induzierte *Shedding* in der Deletionsmutante AP-Tim-3 Δ S2 stark reduziert war. Jedoch wurde das Ionomycin-stimulierte *Shedding* durch die Deletion dieser Aminosäuresequenz nicht beeinflusst. Dies lässt darauf schließen, dass sich in diesem Aminosäuresequenzbereich der Mucin-Domäne eine mögliche Schnittstelle oder eine Erkennungssequenz für ADAM17 jedoch nicht für ADAM10 befinden könnte. Dieses Resultat konnte ebenfalls im Western Blot (Abbildung 22B) bestätigt werden. Um sicherzustellen, dass die alkalische Phosphatase keinen Einfluss auf das Ektodomänen-*Shedding* hat, wurden HEK293-Zellen mit den drei Deletionsmutanten (Tim-3 Δ S1 bis Tim-3 Δ S3) ohne alkalische Phosphatase transient transfiziert und mit PMA oder mit Ionomycin stimuliert. Wie Abbildung 22C zeigt, führt die Behandlung mit PMA und Ionomycin zur Freisetzung von löslichem Tim-3 Δ S1- und Tim-3 Δ S3-Protein in den Zellkulturüberstand. Erwartungsgemäß konnte in Folge der PMA-Stimulation kein lösliches Tim-3 Δ S2-Protein im Western Blot detektiert werden. Diese Resultate bestätigen die zuvor erhaltenen Ergebnisse der Messung der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase. Somit kann ein Einfluss der alkalischen Phosphatase auf das Ektodomänen-*Shedding* des humanen Tim-3-Proteins ausgeschlossen werden. Obwohl die Schnittstelle für ADAM10 und ADAM17 nicht direkt bestimmt wurde, kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass die Schnittstelle für die PMA-induzierte Proteolyse durch ADAM17 zwischen den Aminosäuren 181 und 190 des humanen Tim-3-Proteins liegt. Alternativ könnte sich in diesem Sequenzabschnitt eine regulatorische Erkennungssequenz für ADAM17 befinden. Weiter kann man aus diesem Ergebnis schließen, dass sehr wahrscheinlich unterschiedliche Schnittstellen für ADAM10 und ADAM17 im humanen Tim-3-Protein vorliegen.

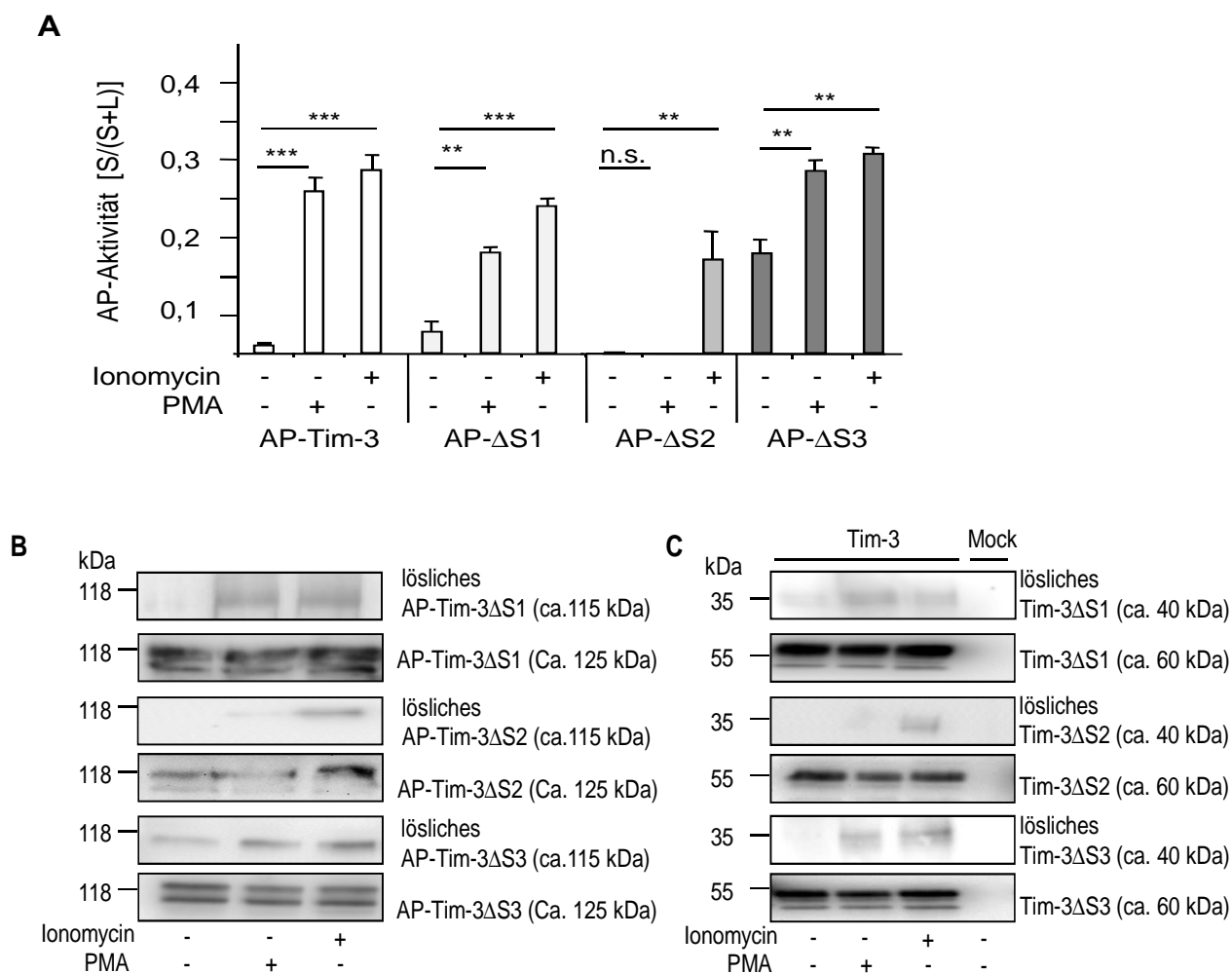


Abbildung 22: PMA-induziertes *Shedding* von Tim-3 konnte durch die Deletion von 10 Aminosäuren in der Mucin-Domäne reduziert werden. HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid, das für das AP-Tim-3 Fusionsprotein kodiert oder den Expressionsplasmiden, die für die AP-Tim-3-Deletionsmutanten (AP-Tim-3ΔS1 bis AP-Tim-3ΔS3) kodieren, transfiziert und für 1 h mit PMA (100 μM) oder für 30 min mit Ionomycin (5 μM) stimuliert. (A) Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde im Zelllysat (L) und im Zellkulturüberstand (S) gemessen und somit der Anteil des löslichen Tim-3-Proteins bestimmt. Die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase (AP-Aktivität) wurde aus dem Verhältnis der Enzymaktivität im Zelllysat und Zellkulturüberstand berechnet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten ± SD. n.s. = nicht signifikant, ** $p > 0,01$, *** $p > 0,001$ (ungepaarter Student's *t* Test) (B) Die Zellen wurden, wie unter (A) beschrieben, behandelt und membrangebundenes Tim-3-Protein in den Zelllysaten und lösliches Tim-3-Protein im Zellkulturüberstand wurden mittels Western Blot visualisiert. Hierfür wurde der monoklonale Antikörper gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3 verwendet (siehe Abschnitt 2.2.4). (C) HEK293-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden, die für die Tim-3-Deletionsmutanten (Tim-3ΔS1 bis Tim-3ΔS3) ohne AP kodieren, transfiziert und für 1 h mit PMA (100 μM) oder für 30 min mit Ionomycin (5 μM) stimuliert. Membrangebundenes Tim-3-Protein in den Zelllysaten und lösliches Tim-3-Protein im Zellkulturüberstand wurden mittels Western Blot, wie unter (B) beschrieben, visualisiert. Das Molekulargewicht ist auf der linken Seite angegeben. Mock: GFP-transfizierte HEK293-Zellen dienten als Kontrolle.

3.6 Generierung von Expressionsplasmiden für das humane Tim-3 ohne intrazelluläre Domäne und intrazelluläre Deletionsmutanten

Das einzige bekannte Beispiel, bei dem die intrazelluläre Domäne für das Ektodomänen-*Shedding* eine Rolle spielt, ist L-Selektin. Hier ist das PMA-induzierte *Shedding* von der Interaktion der intrazellulären Domäne über das Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Protein mit dem Aktin des Zytoskeletts abhängig (Ivetic et al., 2004). Um zu überprüfen, ob die intrazelluläre Domäne des humanen Tim-3 ebenfalls einen Einfluss auf das Ektodomänen-*Shedding* hat, wurde zunächst eine Deletionsmutante generiert, bei der die komplette intrazelluläre Domäne deletiert ist (Tim-3 Δ ICD). Ausgangspunkt für die Konstruktion der Expressionsmutanten waren die Plasmide pcDNA3.1-AP-hTim-3 oder pcDNA3.1-hTim-3 (siehe Abschnitt 3.2). Für die Deletion der kompletten intrazellulären Domäne von Tim-3 oder der intrazellulären Domäne bis auf eine Aminosäure (Tim-3 Δ ICD+1) sowie für die Mutanten Tim-3 Δ I1 und Tim-3 Δ I2 wurden spezifische Primer verwendet (Tabelle 1). Zur Generierung der Expressionsplasmide wurden mittels PCR die gewünschten Sequenzen des humanen Tim-3 unter Verwendung der in Tabelle 1 aufgelisteten Primer amplifiziert. Drei weitere Deletionsmutanten (Tim-3 Δ I3 bis Tim-3 Δ I5) wurden mit Hilfe der SOE-PCR generiert (siehe Abschnitt 3.2). Diesen Mutanten fehlen jeweils zwischen 10 und 12 Aminosäurereste (Abbildung 23). Anschließend wurden die erhaltenen PCR-Fragmente sowie die Plasmide pcDNA3.1-AP-hTim-3 oder pcDNA3.1-hTim-3 mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *NotI* und *AflIII* verdaut. Nach der Dephosphorylierung der Plasmide wurden die entstandenen PCR-Fragmente mit diesen ligiert.

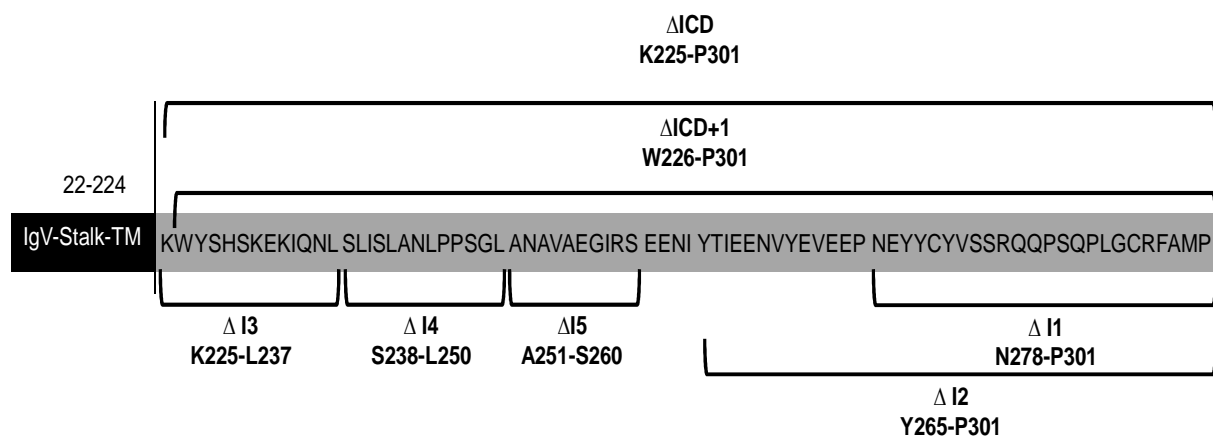


Abbildung 23: Generierung von Expressionsplasmiden für das humane Tim-3 ohne intrazelluläre Domäne (Tim-3 Δ ICD und Tim-3 Δ ICD+1) und intrazelluläre Deletionsmutanten (Tim-3 Δ I1 bis AP-Tim-3 Δ I5). Schematische Übersicht der generierten Tim-3-Deletionsmutanten, die in dieser Analyse verwendet wurden. Drei Tim-3 cDNAs mit drei unterschiedlichen Deletionen von jeweils 10-12 Aminosäuren in der intrazellulären Domäne (Tim-3 Δ I3 bis Tim-3 Δ I5) sowie zwei Deletionsmutanten, denen unterschiedliche Phosphorylierungsstellen fehlen (Tim-3 Δ I1 und Tim-3 Δ I2) wurden mit Hilfe der SOE-PCR generiert (siehe Abschnitt 3.2). Weiter wurden zwei Mutanten generiert, denen die komplette oder die komplette intrazelluläre Domäne bis auf ein Lysinrest fehlt (Tim-3 Δ ICD und Tim-3 Δ ICD+1). ICD = *intracellular domain*.

3.7 Analyse der intrazellulären Domäne von Tim-3

Um zu analysieren, ob die intrazelluläre Domäne des humanen Tim-3 einen Einfluss auf die proteolytische Spaltung durch die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 hat, wurden zunächst HEK293-Zellen transient mit einer AP-Tim-3 cDNA, der die komplette intrazelluläre von K225 bis Q301 (AP-hTim-3 Δ ICD) fehlt, transfiziert. Wie Abbildung 24 zeigt wurde dieses Expressionsplasmid auf der Zelloberfläche der HEK293-Zellen exprimiert. Als nächstes wurden die transfizierten HEK293-Zellen 48 h nach der Transfektion mit PMA oder mit Ionomycin stimuliert. Wie Abbildung 25A zeigt, führte die Behandlung mit PMA und Ionomycin zur Freisetzung von löslichem AP-Tim-3-Protein in den Zellkulturüberstand. Allerdings zeigte die Messung der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase, dass das durch PMA-induzierte *Shedding* der Deletionsmutante AP-Tim-3 Δ ICD vollständig inhibiert war. Jedoch wurde das Ionomycin-stimulierte *Shedding* durch die Deletion der intrazellulären Domäne nicht beeinflusst. Dies lässt darauf schließen, dass die intrazelluläre Domäne eine Rolle beim ADAM17- jedoch nicht beim ADAM10-vermittelten Ektodomänen-*Shedding* spielen könnte. Dieses Resultat konnte ebenfalls im Western Blot (Abbildung 25B) bestätigt werden.

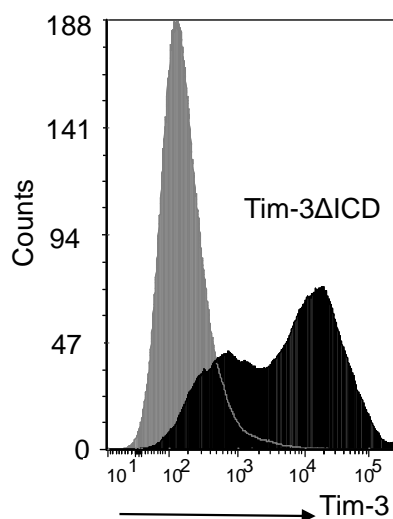


Abbildung 24: Oberflächenexpression des AP-Tim-3 Δ ICD-Fusionsprotein in HEK293-Zellen transfizierten Zellen. HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid, das für die AP-Tim-3 Δ ICD kodiert, transfiziert. Die Oberflächenexpression wurde mit Hilfe eines PE-markierten Antikörpers detektiert (siehe Abschnitt 2.1.2). Als Negativkontrolle diente der entsprechende Isotyp als Antikörper (graue Histogramme).

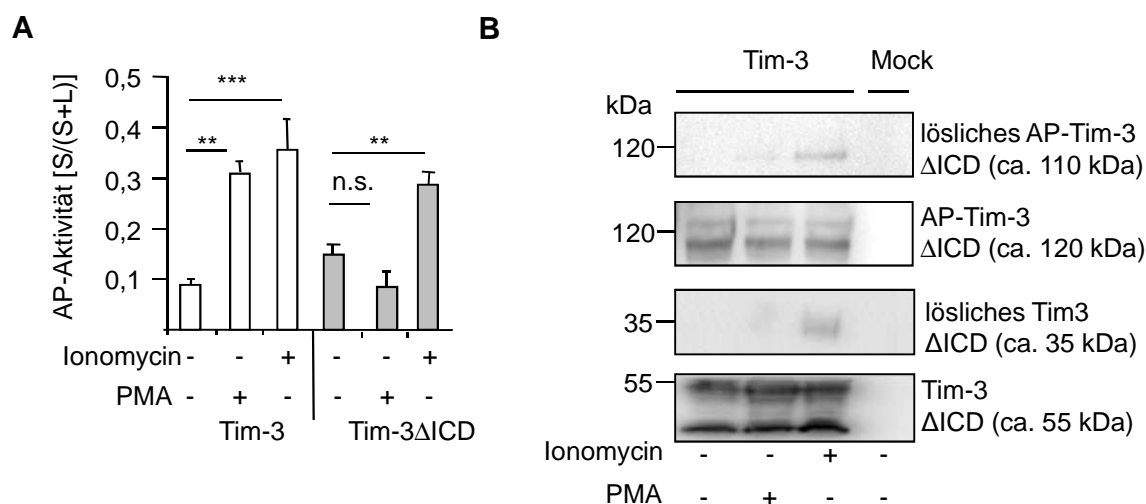


Abbildung 25: PMA-induziertes *Shedding* des Tim-3-Proteins konnte durch die Deletion der intrazellulären Domäne inhibiert werden. HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid, das für das AP-Tim-3ΔICD-Fusionsprotein kodiert, transfiziert und für 1 h mit PMA (100 μM) oder für 30 min mit Ionomycin (5 μM) stimuliert. (A) Die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase wurde im Zelllysat (L) und im Zellkulturüberstand (S) gemessen und somit der Anteil des löslichen Tim-3 bestimmt. Die Enzymaktivität der Alkalische Phosphatase (AP-Aktivität) wurde aus dem Verhältnis der Enzymaktivität im Zelllysat und Zellkulturüberstand berechnet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten ± SD. n.s. = nicht signifikant, **p>0,01, ***p>0,001 (ungepaarter Student's *t* Test). (B) Die Zellen wurden, wie unter (A) beschrieben, behandelt und das membrangebundene Tim-3-Protein in den Zelllysaten und lösliches Tim-3-Protein im Zellkulturüberstand wurden mittels Western Blot visualisiert. Hierfür wurde der monoklonale Antikörper gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3 verwendet (siehe Abschnitt 2.2.4). Weiter wurden HEK293-Zellen mit dem Expressionplasmid, das für Tim-3ΔICD ohne AP kodiert, transfiziert und für 1 h mit PMA (100 μM) oder für 30 min mit Ionomycin (5 μM) stimuliert. Membrangebundenes Tim-3-Protein in den Zelllysaten und lösliches Tim-3-Protein im Zellkulturüberstand wurden mittels Western Blot wie unter (B) beschrieben visualisiert. Das Molekulargewicht ist auf der linken Seite angegeben. Mock: GFP-transfizierte HEK293-Zellen dienten als Kontrolle.

Da die ersten Versuche gezeigt haben, dass die intrazelluläre Domäne von Tim-3 eine Rolle beim PMA-induzierten Ektodomänen-*Shedding* durch ADAM17 zu spielen scheint, sollte nun im nächsten Schritt untersucht werden, welche Sequenz in der intrazellulären Domäne entscheidend ist. Hierzu wurden, wie in Abschnitt 3.6 beschrieben, weitere Deletionsmutanten generiert. Zunächst sollte nun analysiert werden, ob die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne einen möglichen regulatorischen Mechanismus für das Tim-3-*Shedding* durch ADAM17 darstellt. Hierfür wurden die Deletionsmutanten AP-Tim-3Δ278-301 (ΔI1) und AP-Tim-3Δ264-301 (ΔI2) verwendet. Der Mutante AP-Tim-3ΔI1 fehlen die drei C-terminalen Tyrosinreste, sodass sie drei Phosphorylierungsstellen enthält. Während die Mutante AP-Tim-3ΔI2 nur eine Phosphorylierungsstelle besitzt, die sich nah der Transmembrandomäne befindet (siehe Abbildung 26). In einer früheren Veröffentlichung konnte gezeigt werden, dass die Tyrosinreste an den Positionen 256 und 263, die in der Mutante AP-Tim-3ΔI2 fehlen, nach ihrer Phosphorylierung zu einer verstärkten NFAT/AP-1-Aktivierung führten (Lee et al., 2011). HEK293-Zellen wurden transient mit den beiden Expressionsplasmiden, die für die Deletionsmutanten (AP-hTim-3ΔI1 und AP-hTim-3ΔI2) kodieren, transfiziert und 48 h nach

der Transfektion mit PMA oder mit Ionomycin stimuliert. Wie Abbildung 26A zeigt, führte die Behandlung mit PMA und Ionomycin, wie beim Wildtyp-hTim-3, zur Freisetzung von löslichem AP-Tim-3 Δ I1- und AP-hTim-3 Δ I2-Protein in den Zellkulturüberstand. Dieses Resultat konnte ebenfalls im Western Blot (Abbildung 26B) bestätigt werden. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass die Phosphorylierung von Tyrosinresten in der intrazellulären Domäne bei der Regulation des Ektodomänen-*Sheddings* durch ADAM17 keinen Einfluss zu haben scheint.

Aus diesem Grund wurden weitere Mutationen in die restliche intrazelluläre Domäne von Tim-3 eingefügt (AP-hTim-3 Δ 225-237(Δ I3), AP-hTim-3 Δ 238-250(Δ I4) und AP-hTim-3 Δ 251-260(Δ I5)). HEK293-Zellen wurden, wie schon zuvor beschrieben, transfiziert und mit PMA und Ionomycin stimuliert. Wie Abbildung 26C zeigt, führte die Behandlung mit PMA und Ionomycin wie beim Wildtyp-Tim-3 ebenfalls zur Freisetzung von löslichem AP-Tim-3 Δ I3-, AP-Tim-3 Δ I4- und AP-hTim-3 Δ I5-Fusionsproteins in den Zellkulturüberstand. Dieses Resultat konnte im Western Blot (Abbildung 26D) bestätigt werden. Obwohl gezeigt werden konnte, dass das Fehlen der kompletten intrazellulären Domäne dazu führte, dass das PMA-induzierte *Shedding* durch ADAM17 inhibiert wurde, scheint das Deletieren einzelner Sequenzen in diesem Bereich keinen Einfluss auf die proteolytische Spaltung von Tim-3 zu haben.

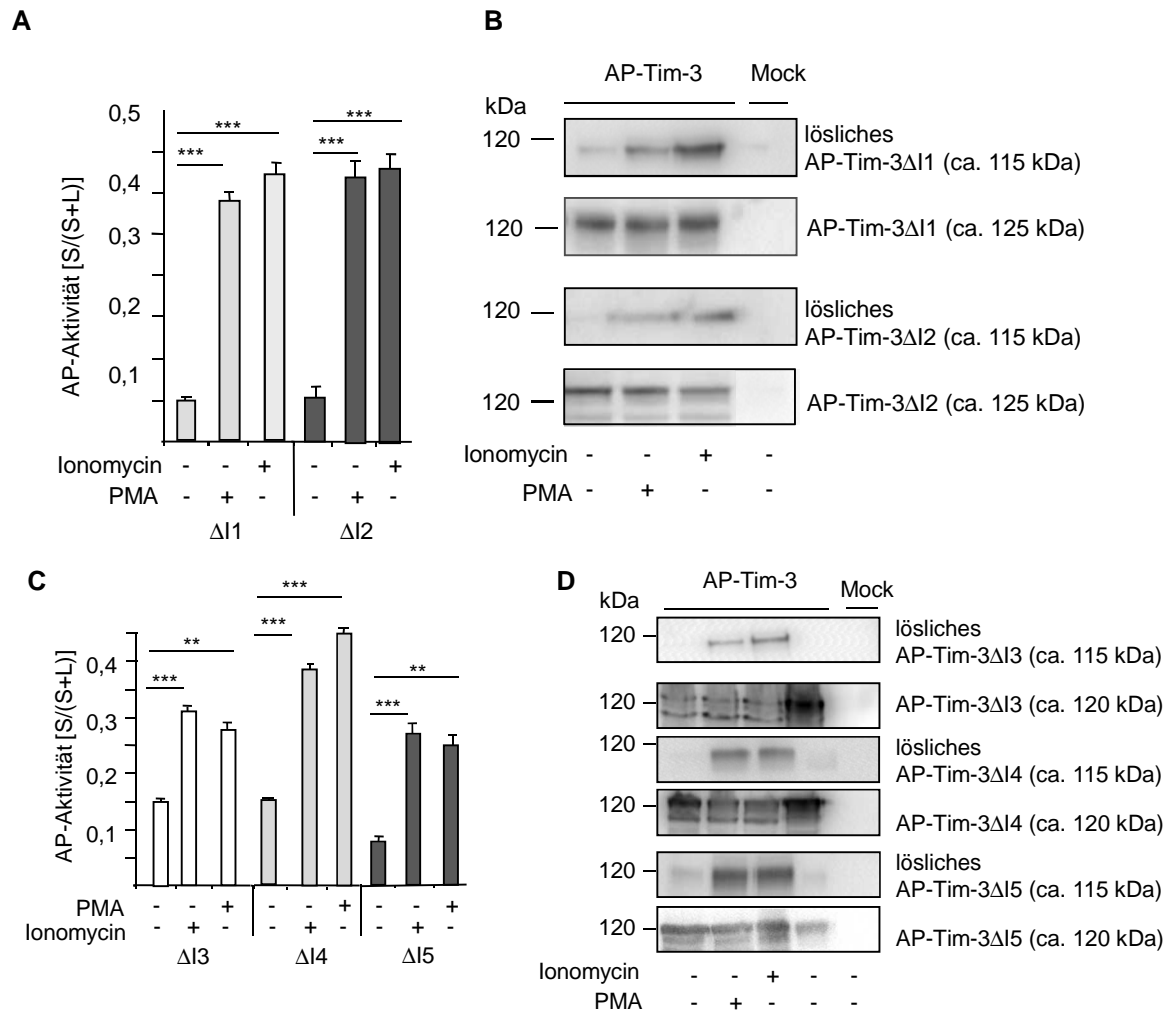


Abbildung 26: PMA-induziertes *Shedding* von Tim-3 konnte nicht durch die Deletion von unterschiedlichen Aminosäuresequenzen in der intrazellulären Domäne inhibiert werden. HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmiden für die AP-Tim-3ΔI1 bis AP-Tim-3ΔI5 Fusionsproteine transfiziert und für 1 h mit PMA (100 μM) oder für 30 min mit Ionomycin (5 μM) stimuliert. (A) HEK293-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für die AP-Tim-3ΔI1 und AP-Tim-3ΔI2 transfiziert. Die Aktivität der AP wurde im Zelllysat (L) und im Zellkulturüberstand (S) gemessen und somit der Anteil des löslichen Tim-3 bestimmt. Die Enzymaktivität der Alkalische Phosphatase (AP-Aktivität) wurde aus dem Verhältnis der Enzymaktivität im Zelllysat und Zellkulturüberstand berechnet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten ± SD. ***p>0,001 (ungepaarter Student's *t* Test) (B) Die Zellen wurden, wie unter (A) beschrieben, behandelt und das membrangebundene Tim-3-Protein im Zelllysat und das lösliche Tim-3-Protein in den Zellkulturüberständen mittels Western Blot visualisiert. Hierfür wurde der monoklonale Antikörper gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3 verwendet (siehe Abschnitt 2.2.4). (C) Weiter wurden HEK293-Zellen mit den Expressionplasmiden für die AP-Tim-3ΔI3 bis AP-Tim-3ΔI5 transfiziert. Die Enzymaktivität der AP wurde wie unter (A) beschrieben, gemessen und berechnet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten ± SD. ***p>0,01, ***p>0,001 (ungepaarter Student's *t* Test). (D) Die Zellen wurden, wie unter (A) beschrieben, behandelt und das membrangebundene Tim-3-Protein im Zelllysat und das lösliche Tim-3-Protein in den Zellkulturüberständen dann, wie unter (B) beschrieben, mittels Western Blot visualisiert. Das Molekulargewicht ist auf der linken Seite in kDa angegeben. Mock: GFP-transfizierte HEK293-Zellen dienten als Kontrolle.

Da die Deletion verschiedener Sequenzbereiche der intrazellulären Domäne von Tim-3 nicht zur Hemmung der proteolytischen Spaltung durch ADAM17 führte, wurde eine weitere

Mutante generiert. Bei dieser Mutante wurde die komplette intrazelluläre Domäne bis auf die erste Aminosäure nach der Transmembrandomäne (Lysin 225) deletiert (Abbildung 23). HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor, der für das AP-hTim-3 Fusionsprotein und mit dem Expressionsplasmid, das für die Mutante AP-hTim-3 Δ ICD+1 kodiert, transient transfiziert und 48 h nach der Transfektion mit PMA oder mit Ionomycin stimuliert. Überraschenderweise führte die Behandlung der Deletionsmutante AP-Tim-3 Δ ICD+1 mit PMA und Ionomycin wie beim Wildtyp-Tim-3 zur Freisetzung von löslichem Tim-3-Protein in den Zellkulturüberstand. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls im Western Blot bestätigt (Abbildung 27B). Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Deletion der kompletten, aber nicht von Teilen der intrazellulären Domäne, zur Hemmung des PMA-induzierten ADAM17-*Sheddings* führte, und dass diese Hemmung durch Addition einer einzigen Aminosäure aufgehoben werden konnte.

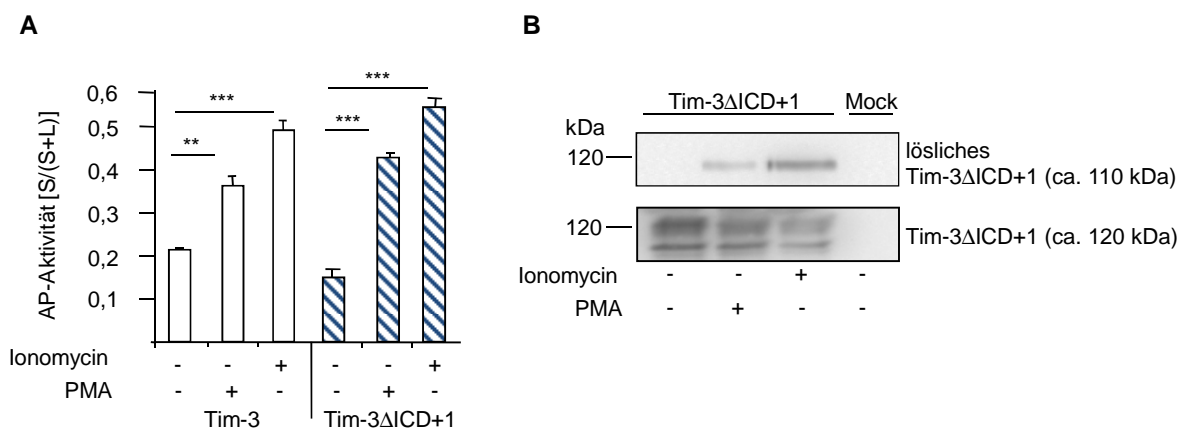


Abbildung 27: PMA-induziertes *Shedding* von Tim-3 konnte durch Addition der ersten Aminosäure der intrazellulären Domäne (K225) erreicht werden. HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid, das für die AP-Tim-3 und AP-Tim-3 Δ ICD+1 Fusionsproteine kodiert, transfiziert und für 1 h mit PMA (100 μ M) oder für 30 min mit Ionomycin (5 μ M) stimuliert. (A) Die Aktivität der AP wurde im Zelllysat (L) und im Zellkulturüberstand (S) gemessen und somit der Anteil des löslichen Tim-3 bestimmt. Die Enzymaktivität der Alkalische Phosphatase (AP-Aktivität) wurde aus dem Verhältnis der Enzymaktivität im Zelllysat und Zellkulturüberstand berechnet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten \pm SD. ** $p > 0,01$, *** $p > 0,001$ (ungepaarter Student's t Test) (B) Die Zellen wurden wie unter (A) beschrieben behandelt und das membrangebundene Tim-3-Protein im Zelllysat und das lösliche Tim-3-Protein in den Zellkulturüberständen dann mittels Western Blot visualisiert. Hierfür wurde der monoklonale Antikörper gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3 verwendet (siehe Abschnitt 2.2.4). Das Molekulargewicht ist auf der linken Seite angegeben. Mock: GFP-transfizierte HEK293-Zellen dienten als Kontrolle.

3.8 Calmodulin reguliert die Tim-3 Expression auf der Zelloberfläche

Wie in den vorherigen Abschnitten gezeigt, gibt es einige Gemeinsamkeiten zwischen der proteolytische Spaltung des humanen Tim-3-Proteins und dem Ektodomänen-*Shedding* von L-Selektin. Zum einen sind beide Rezeptoren Substrate der Metalloprotease ADAM17 und

zum anderen scheint für die enzymatische Prozessierung von Tim-3 ebenfalls wie bei L-Selektin die intrazelluläre Domäne eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Expression von L-Selektin wird als Folge der Zellaktivierung durch Proteolyse in der Nähe der Transmembrandomäne stark herunterreguliert (Ivetic et al., 2002). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Calmodulin direkt mit der zytoplasmatischen Domäne und mit einem Teil der Transmembrandomäne des L-Selektins assoziiert ist. Wenn die Bindung des CaM an L-Selektin durch einen CaM-Antagonisten, wie zum Beispiel N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalensulphonamid (W7), inhibiert wird, kommt es zur proteolytischen Freisetzung des L-Selektins von der Zelloberfläche. Dieser Effekt konnte durch Metalloproteaseinhibitoren verhindert werden. Die Bindung von CaM an weitere Proteine, wie zum Beispiel Kollagenrezeptoren oder das APP, hemmt die proteolytische Spaltung. Die Hemmung dieser Interaktion führt dann zur Aktivierung des ADAM-vermittelten Ektodomänen-*Sheddings* (Canobbio et al., 2011). Für L-Selektin wurde weiter gezeigt, dass die Aufhebung der CaM-Bindung durch eine starke Erhöhung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration zu einer Veränderung der extrazellulären Domäne führt, die die proteolytische Spaltung durch ADAM17 begünstigt (Gifford et al., 2012).

Da gezeigt werden konnte, dass die intrazelluläre Domäne von Tim-3 einen Einfluss auf die proteolytische Prozessierung durch ADAM17 zu haben scheint, und eine Rolle der Aktivierung durch Phosphorylierung der intrazellulären Domäne ausgeschlossen wurde, wurde nun im nächsten Versuch überprüft, ob eine mögliche Regulation über die Bindung von Calmodulin an die intrazelluläre Bindung des humanen Tim-3-Proteins vorliegt. Hierzu wurden HEK293-Zellen zunächst mit dem Expressionsvektor, der für das AP-hTim-3 Fusionsprotein kodiert und dem Expressionsplasmid, das für die Deletionsmutante AP-Tim-3 Δ S2, die eine Deletion von 10 Aminosäureresten in der Mucin-Domäne enthält, kodiert (siehe Abbildung 21A), welche dazu führt, dass ADAM17 diese Mutante nicht proteolytisch spalten kann, transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit dem CaM-Antagonisten N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalensulphonamid (W7) stimuliert. Dieses führte zur proteolytischen Prozessierung des AP-hTim-3-Fusionsproteins und somit zur Freisetzung von löslichem Tim-3-Protein in den Zellkulturüberstand. Das Ektodomänen-*Shedding* von Tim-3 konnte durch die Zugabe der Metalloproteaseinhibitoren GI254023X (inhibiert ADAM10) und GW280264X (inhibiert ADAM10 und ADAM17) reduziert werden, wobei die stärkere Hemmung durch GW280264X entstand. Die Bindung von Calmodulin an Proteine kann durch Ca^{2+} -Fluktuationen und Phosphorylierung der CaM-Binderegion reguliert werden. Um zu untersuchen, ob die potentielle Interaktion von Tim-3 und Calmodulin Calcium-abhängig ist, wurde der Ca^{2+} -Chelator EDTA verwendet. EDTA verstärkt höchstwahrscheinlich die Bindung von CaM an Tim-3 und inhibiert auf diese Weise die proteolytische Prozessierung von Tim-3 (Abbildung 28A). Bei der Deletionsmutante AP-Tim-3 Δ S2 konnte infolge der Inhibierung der CaM-Bindung an Tim-3 nur eine sehr geringe proteolytische Spaltung beobachtet werden. Da in vorherigen Analysen bereits gezeigt werden konnte, dass diese Mutante nicht durch ADAM17 prozessiert werden konnte, da sich in diesem Bereich der Mucin-Domäne eine mögliche Erkennungs- oder Spaltregion befindet, kann gefolgert werden, dass die CaM-Bindung vorwiegend das ADAM17-vermittelte Ektodomänen-*Shedding* von Tim-3 reguliert (Abbildung 28C). Alle Ergebnisse konnten auch im Western Blot bestätigt werden (Abbildung 28B, D). Zusammenfassend konnte gezeigt

werden, dass der CaM-Antagonist W7 höchstwahrscheinlich ADAM17-vermitteltes *Shedding* von Tim-3 induziert.

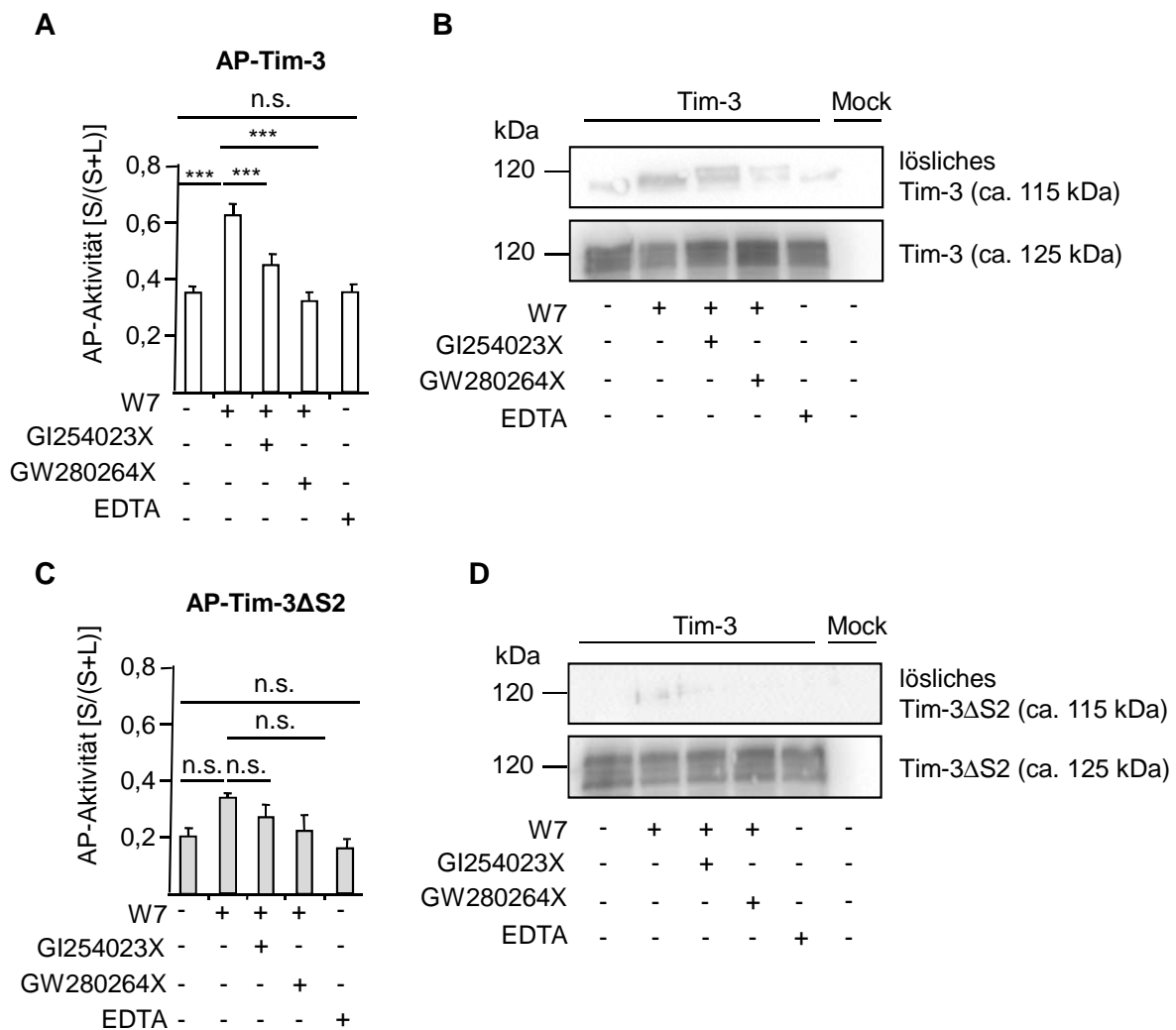


Abbildung 28: Die Proteolyse von Tim-3 wird durch Calmodulin (CaM) reguliert. HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid, das für die AP-Tim-3 und dem AP-Tim-3ΔS2 Fusionsproteine kodiert, transfiziert und für 1 h mit W7 (100 μM) stimuliert. Die Hydroxamate GI254023X und GW280264X (3 μM, 30 min) oder der Calcium-Chelator EDTA (10 mM, 10 min) wurden vor der Stimulation zugegeben. (A, C) Die Aktivität der AP wurde im Zelllysate (L) und im Zellüberstand (S) gemessen und somit der Anteil des löslichen Tim-3-Proteins bestimmt. Die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase (AP-Aktivität) wurde aus dem Verhältnis der Enzymaktivität im Zelllysate und Zellkulturüberstand berechnet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten ± SD. n.s. = nicht signifikant, ***p>0,001 (ungepaarter Student's *t* Test) (B, D) Die Zellen wurden, wie unter (A, C) beschrieben, behandelt und das membrangebundene Tim-3-Protein im Zelllysate und das lösliche Tim-3-Protein in den Zellkulturüberständen dann mittels Western Blot visualisiert. Hierfür wurde der monoklonale Antikörper gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3 verwendet (siehe Abschnitt 2.2.4). Das Molekulargewicht ist auf der linken Seite angegeben. Mock: GFP-transfizierte HEK293-Zellen dienten als Kontrolle.

Wie bereits erwähnt, bindet Calmodulin an Regionen der cytoplasmatischen Domäne seiner Interaktionspartner, die nahe der Transmembrandomäne liegen, oder sogar an Teile dieser Domäne, die sich in der Zellmembran befinden (Gifford et al., 2012). Um zu untersuchen, ob die potentielle Bindungsstelle für CaM ebenfalls in der intrazellulären Domäne des humanen Tim-3 lokalisiert ist, wurden HEK293-Zellen mit dem Expressionsplasmid transient transfiziert, das für das humane Tim-3 kodiert, dessen komplette intrazelluläre Domäne (AP-Tim-3 Δ ICD) oder dessen komplette intrazelluläre Domäne bis auf eine Aminosäure (AP-Tim-3 Δ ICD+1) fehlt. Wie Abbildung 29 zeigt, induzierte die Stimulation mit dem CaM-Antagonisten W7 der Deletionsmutante ohne intrazelluläre Domäne, AP-Tim-3 Δ ICD, keine proteolytische Spaltung. Die ADAM10/ADAM17-Inhibierung durch GW280264X führte ebenfalls wie der Ca²⁺-Chelator EDTA allerdings zu einer Reduktion der konstitutiven proteolytischen Prozessierung dieser Mutante. Die Analyse der Deletionsmutante AP-Tim-3 Δ ICD+1 zeigte ein ähnliches Bild wie das Wildtyp-Tim-3-Protein (Abbildung 28A). Durch die Inhibierung der CaM-Bindung durch Zugabe des CaM-Antagonisten W7 kam es zur proteolytischen Spaltung, die durch GI254023X und GW280264X gehemmt werden konnten. Im Unterschied zum Wildtyp-Tim-3 hatte EDTA keinen signifikanten inhibitorischen Effekt durch eine verstärkte Bindung von Calmodulin an seinen Interaktionspartner (Abbildung 29B). Um auszuschließen, dass diese Resultate durch die N-terminale alkalische Phosphatase beeinflusst wurden, wurden HEK293-Zellen mit den Deletionsmutanten Tim-3 Δ S2 und Tim-3 Δ ICD, sowie mit dem Expressionsplasmid, das für das Wildtyp-Tim-3 (pcDNA3.1-Tim3) kodiert, transfiziert und die proteolytische Spaltung nach der Behandlung mit W7 und den Hydroxamaten GI254023X und GW280264X sowie mit und ohne EDTA analysiert (Abbildung 29D). Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten die zuvor getätigten Aussagen. Da die Bindung von Calmodulin die Inhibierung der proteolytischen Spaltung seiner Interaktionspartner durch Proteasen bewirkt, würde man erwarten, dass eine fehlende CaM-Bindung dazu führen würde, dass der Bindungspartner konstitutiv gespalten wird. Da dieser Effekt in den durchgeführten Analysen nicht gezeigt werden konnte, kann geschlossen werden, dass Calmodulin höchstwahrscheinlich nicht an die intrazelluläre Domäne von Tim-3 bindet.

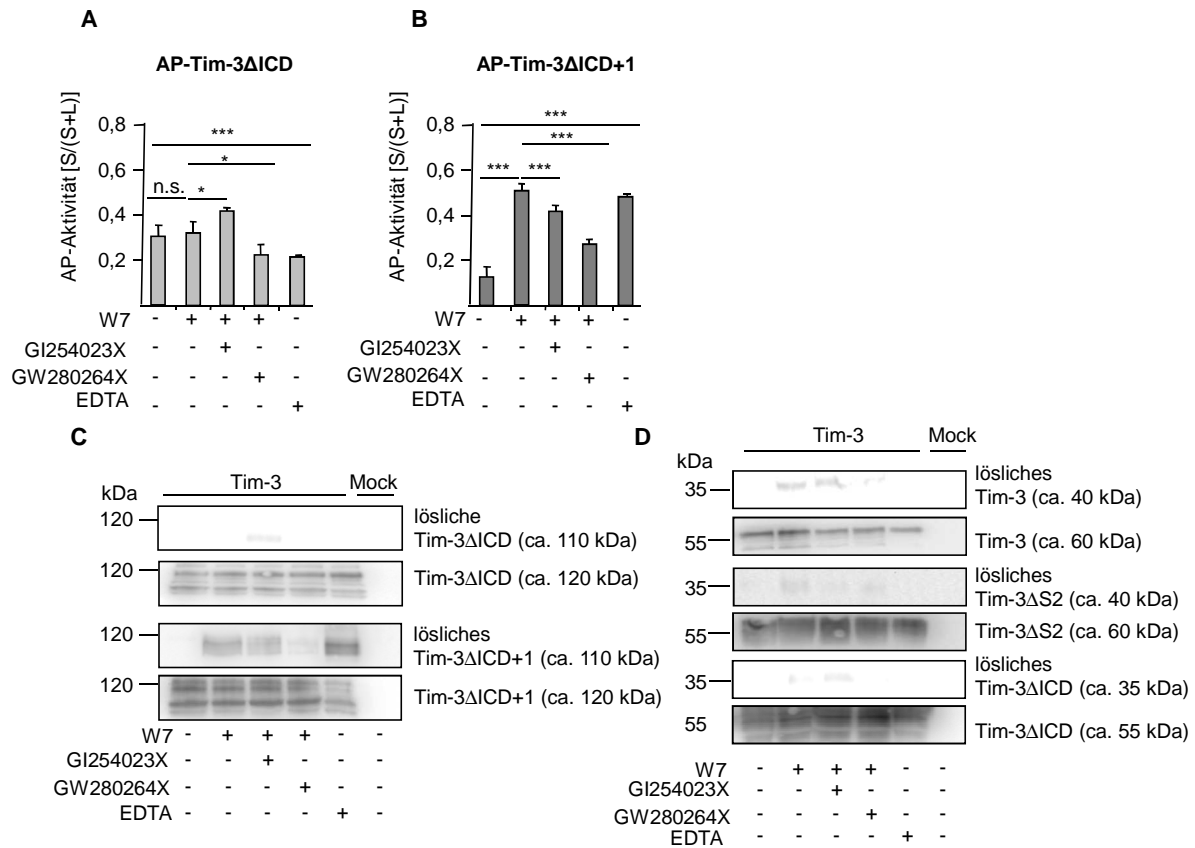


Abbildung 29: W7-induziertes Shedding von Tim-3 konnte durch die Deletion der intrazellulären Domäne inhibiert werden. HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid, das für die Deletionsmutanten AP-Tim-3ΔICD oder AP-Tim-3ΔICD+1 kodiert, transfiziert und für 1 h mit W7 (100 μM) stimuliert. Die Hydroxamate GI254023X und GW280264X (3 μM, 30 min) oder der Calcium-Chelator EDTA (10 mM, 10 min) wurden vor der Stimulation zugegeben. (A, B) Die Aktivität der AP wurde im Zelllysat (L) und im Zellkulturüberstand (S) gemessen und somit der Anteil des löslichen Tim-3-Proteins bestimmt. Die Enzymaktivität der Alkalische Phosphatase (AP-Aktivität) wurde aus dem Verhältnis der Enzymaktivität im Zelllysat und Zellkulturüberstand berechnet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten ± SD. n.s. = nicht signifikant, * $p > 0,5$, *** $p > 0,001$ (ungepaarter Student's t Test) (C) Die Zellen wurden, wie unter (A, B) beschrieben, behandelt und das membrangebundene Tim-3-Protein im Zelllysat und das lösliche Tim-3-Protein in den Zellkulturüberständen dann mittels Western Blot visualisiert. Hierfür wurde der monoklonale Antikörper gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3 verwendet (siehe Abschnitt 2.2.4). (D) HEK293-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden, die für die Tim-3-Deletionsmutanten (Tim-3ΔS2 und Tim-3ΔICD), sowie für hTim-3 ohne AP kodieren, transfiziert und für 1 h mit W7 (100 μM) stimuliert. GI254023X, GW280264X (3 μM, 30 min) oder EDTA (10 mM, 10 min) wurden vor der Stimulation zugegeben. Membrangebundenes Tim-3-Protein in den Zelllysaten und lösliches Tim-3-Protein im Zellkulturüberstand wurden mittels Western Blot, wie unter (B) beschrieben, visualisiert. Das Molekulargewicht ist auf der linken Seite angegeben. Mock: GFP-transfizierte HEK293-Zellen dienten als Kontrolle.

Um zu überprüfen, ob eine direkte Interaktion zwischen Calmodulin und Tim-3 stattfindet, wurde ein *Pull down-Assay* durchgeführt. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit dem Expressionplasmid, das für das AP-hTim-3-Fusionsprotein kodiert, oder mit den Expressionsvektoren, die für die Deletionsmutanten AP-Tim-3ΔS2, AP-Tim-3ΔICD und AP-Tim-3ΔICD+1 kodieren, transfiziert. Die Zelllysate wurden dann mit einer Sepharose

inkubiert, an die Calmodulin gebunden ist. Als Kontrolle diente eine Sepharose, an die kein CaM gebunden ist. Um nachzuweisen, dass Tim-3 und/oder die Mutanten mit CaM direkt interagiert, wurde das Präzipitat nachfolgend mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins im Western Blot visualisiert. Wie Abbildung 30 zeigt, bindet das Wildtyp-Tim-3-Protein als auch die Deletionsmutanten an Calmodulin. Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass Calmodulin höchstwahrscheinlich mit dem humane Tim-3 direkt interagiert, und dass die proteolytische Spaltung durch ADAM17 über diese Bindung reguliert zu sein scheint.

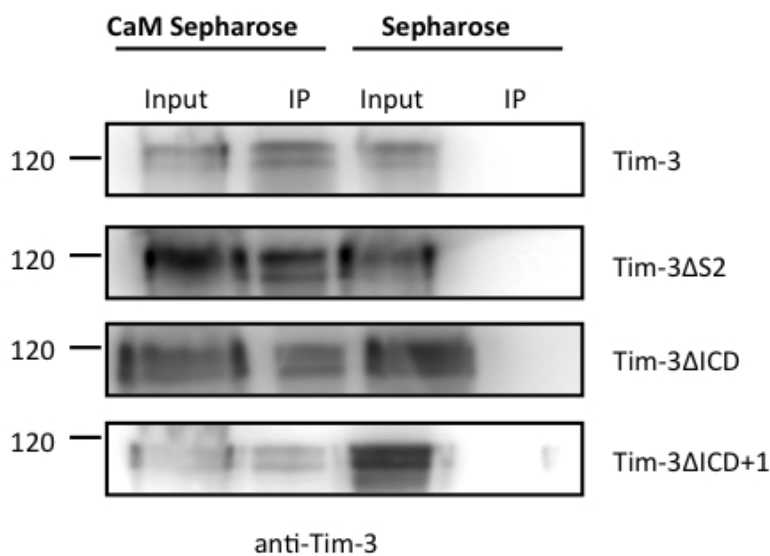


Abbildung 30: Calmodulin bindet an Tim-3. HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid, das für das AP-Tim-3-Fusionsprotein kodiert und mit den Expressionsvektoren, die für die Deletionsmutanten AP-Tim-3ΔS2, AP-Tim-3ΔICD, welcher die komplette intrazelluläre Domäne fehlt, und AP-Tim-3ΔICD+1, bei der die intrazelluläre Domäne bis auf ein Lysinrest an Position 226 deletiert ist, kodieren, transfiziert. Nach 48 h wurden die transfizierten Zellen lysiert und mit der Calmodulin-Sepharose 4B (CaM-Sepharose) oder mit einer equivalenten Menge der Sepharose 4B (Sepharose) für 24 h inkubiert. Proteine, die durch Calmodulin präzipitiert wurden, wurden anschließend mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3 mittels Western Blot visualisiert (siehe Abschnitt 2.2.4). Das Molekulargewicht ist auf der linken Seite in kDa angegeben.

3.9 PMA- und Ionomycin-induziertes *Shedding* des endogenen Tim-3 von primären humanen CD14⁺ Monozyten

Um zu untersuchen, ob das endogene humane Tim-3-Protein ebenfalls ein Substrat für ADAM-vermitteltes *Shedding* ist, wurden CD14⁺ Monozyten aus peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) aus dem Blut von gesunden Probanden isoliert, da diese endogenes Tim-3 exprimieren (Zhang et al., 2012). Wie gezeigt werden konnte, exprimierten bis zu 77% der isolierten CD14⁺ Monozyten (dieser Wert variiert zwischen 49 und 77% von Experiment zu Experiment) Tim-3 auf ihrer Zelloberfläche (Abbildung 31 und Abbildung 32). In Folge der Stimulation mit Ionomycin kommt es zu einer starken Reduktion dieser Expression auf 7,4%. Diese starke Verminderung konnte durch die Zugabe der Hydroxamate GI254023X (inhibiert ADAM10) und GW280264X (ADAM10/ADAM17-Inhibitor) gehemmt werden (Abbildung 31A, B). Die Verwendung von GI254023X führte zu einer stärkeren Inhibierung (53,2%) als die Verwendung von GW280264X (41,6%). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Stimulation mit Ionomycin zu einer ADAM10-vermittelten proteolytischen Spaltung des endogenen Tim-3-Proteins auf CD14⁺ Monozyten führt. Die durchgeführte PMA-Stimulation resultierte ebenfalls in einer Reduktion der Zelloberflächenexpression von Tim-3 auf CD14⁺ Monozyten (30,9%), diese war aber im Vergleich zur Ionomycin-induzierten Verminderung (7,4%) vergleichsweise gering. Der durch PMA-induzierte Effekt auf die Tim-3 Oberflächenexpression konnte durch die Verwendung der Proteaseinhibitoren gehemmt werden, wobei die Hemmung durch GW280264X (50,6%) stärker war als die durch GI254023X (42,7%) induzierte Inhibierung. Zusammenfassend kann aus diesen Resultaten geschlossen werden, dass das endogene Tim-3-Protein ein Substrat von ADAM10 nach der Stimulation mit Ionomycin darstellt, während die Behandlung mit PMA eher zu einer ADAM17-vermittelten proteolytischen Prozessierung des endogenen Tim-3-Proteins auf der Zelloberfläche von CD14⁺ Monozyten führte, auch wenn diese Daten ebenfalls zeigen, dass ADAM10 auch in das PMA-induzierte *Shedding* von Tim-3 involviert zu sein scheint.

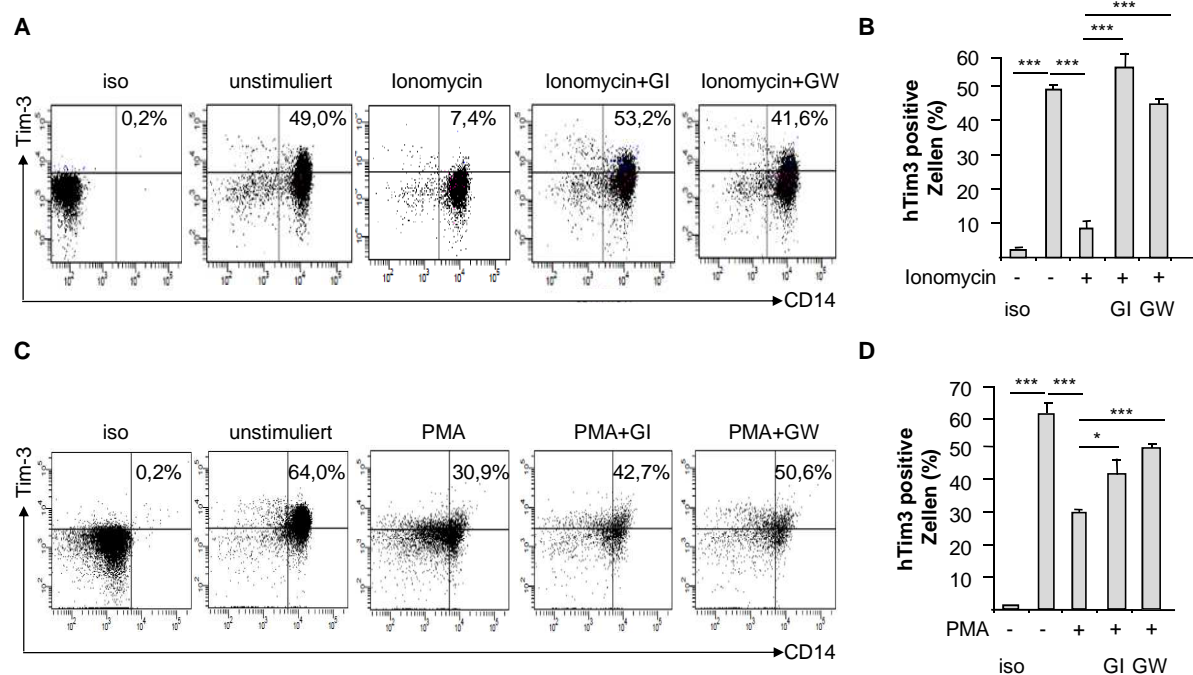


Abbildung 31: Expression des endogenen Tim-3 auf humanen primären CD14⁺ Monozyten nach PMA- und Ionomycin-Stimulierung. Zunächst wurden die peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) aus dem Blut von gesunden Probanden mittels Ficoll™ Dichtegradientenzentrifugation isoliert (siehe Abschnitt 2.2.5.1), und im Anschluss wurden mit Hilfe magnetisch aktivierter Zellsortierung (MACS) CD14⁺ Monozyten aus diesen gewonnen (siehe Abschnitt 2.2.5.2). Die isolierten CD14⁺ Monozyten wurden 1 h mit PMA (100 nM) oder 30 min mit Ionomycin (1 μM) stimuliert. GI254023X (9 μM) oder GW280264X (9 μM) wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. Die Oberflächenexpression von Tim-3 und CD14 wurde mit Hilfe von FITC- bzw. PE-markierten Antikörpern detektiert (siehe Abschnitt 2.1.2). Als Negativkontrolle dienten die entsprechenden Isotypen (iso). Die Expression erfolgte mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Messung (FACS). Hierbei wurde zuerst die monozytäre Zellpopulation festgelegt und dann der prozentuale Anteil der Tim-3 exprimierenden CD14⁺ Monozyten bestimmt. (B, D). Zusammenfassendes Ergebnis (Mittelwert ± SD von 4 gesunden Probanden) der Tim-3 exprimierenden Zellen, angegeben in Prozent. *p<0,05, ***p<0,001 (ungepaarter Student's t Test).

3.10 Toll-like Rezeptor (TLR)-Aktivierung von CD14⁺ Monozyten führt zum ADAM10-vermittelten Shedding von Tim-3

LPS führt zur Toll-like-Rezeptor-vermittelten Aktivierung von CD14⁺ Monozyten und zur verstärkten Expression von Zytokinen wie TNFα, IL-6 und IL-12. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass eine schnelle Herunterregulation der Tim-3-Expression auf LPS-aktivierten CD14⁺ Monozyten mit einer Hochregulation von IL-6 und IL-12 verbunden ist (Zhang et al., 2012). Der Mechanismus, der zum Verlust von auf der Zellmembran lokalisiertem Tim-3-Protein führte, wurde allerdings nicht untersucht. Außerdem führte die Blockade des Tim-3-Signallings oder das Silencing von Tim-3 zu einer signifikanten Beschleunigung der LPS-vermittelten Expression von IL-6 und IL-12 (Zhang et al., 2012), was darauf hindeutet, dass

Tim-3 die angeborene Immunantwort von CD14⁺ Monozyten reguliert. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob diese starke Reduktion der Tim-3-Expression von der Zelloberfläche von CD14⁺ Monozyten in Folge der LPS-Stimulation durch die ADAM-vermittelte proteolytische Spaltung von Tim-3 zu Stande kommt, und ob dieser Prozess funktionell mit der Expression von Zytokinen verbunden ist. Hierzu wurden CD14⁺ Monozyten aus peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) aus dem Blut von gesunden Probanden isoliert und ihre Tim-3-Expression mittels durchflusszytometrischer Messung (FACS) bestimmt. CD14⁺ Monozyten exprimierten, wie Abbildung 32 zeigt, Tim-3 (77,4%) auf ihrer Zelloberfläche. Nach einer zweistündigen Stimulation mit LPS exprimierten nur noch 35,4% der CD14⁺ Monozyten Tim-3 auf ihrer Zelloberfläche. Diese starke Verminderung konnte durch die Zugabe von GI254023X (inhibiert ADAM10) und GW280264X (ADAM10/ADAM17-Inhibitor) gehemmt werden (Abbildung 32A, B). Die Verwendung von GW280264X führt zu einer stärkeren Inhibition (71,6%) als die Verwendung von GI254023X (57,8%). Allerdings führte auch die Verwendung der rekombinanten Pro-Domäne von ADAM10 ebenfalls zu einer starken Inhibition (66,4%). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Stimulation mit LPS zu einer Aktivierung von ADAM17 und ADAM10 führte und diese die proteolytische Spaltung des endogenen Tim-3-Proteins auf CD14⁺ Monozyten vermitteln. ADAM10 scheint allerdings einen größeren Einfluss auf das Ektodomänen-*Shedding* von Tim-3 infolge der LPS-Stimulation zu besitzen. Weiter konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen zeitabhängigen Prozess handelte (Abbildung 32C). Während nach 2 h der LPS-Aktivierung die Tim-3-Expression auf der Oberfläche von CD14⁺ Monozyten um etwa 25% reduziert war, kam es nach 18 h zu einer ca. 75%igen Reduktion. Diese Kinetik der Oberflächenexpression von Tim-3 zeigt einen fast linearen Verlauf, der zu jedem Zeitpunkt durch die ADAM-Inhibitoren gehemmt werden konnte. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die schon zuvor beobachtete schnelle Runterregulation von Tim-3 von der Zelloberfläche von TLR-aktivierten CD14⁺ Monozyten durch die von ADAM10- und ADAM17-vermittelte proteolytische Spaltung von Tim-3 erfolgte.

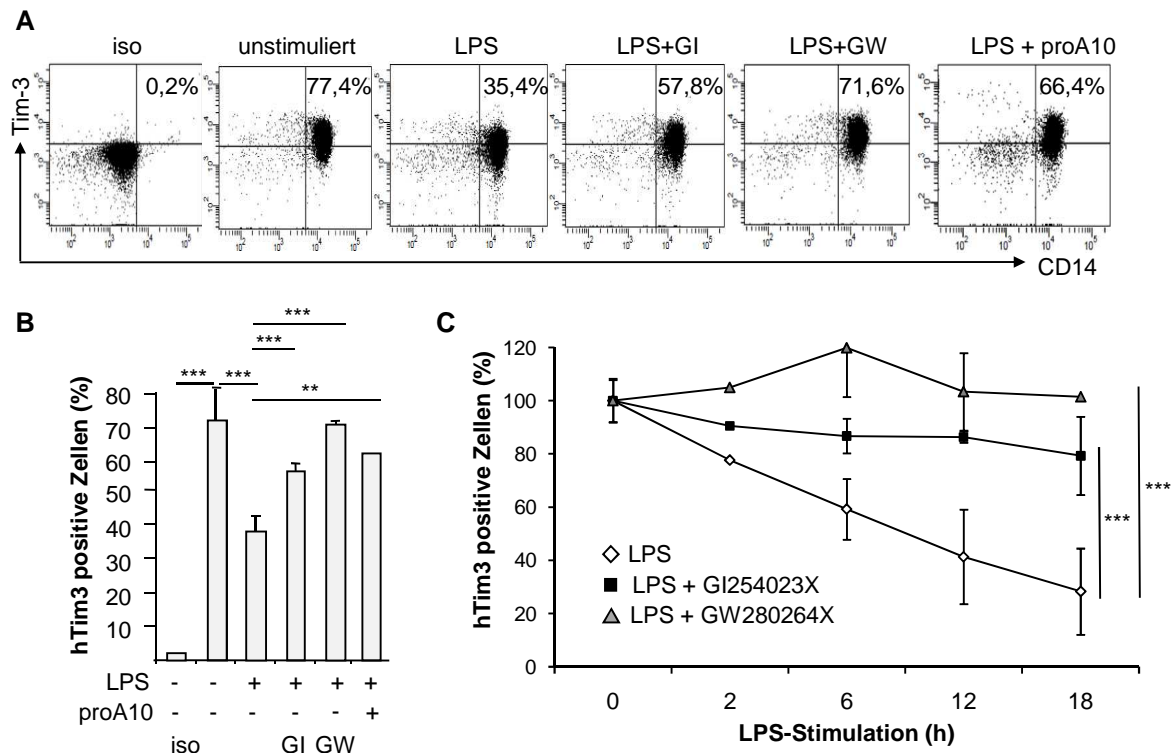


Abbildung 32: Expression des endogenen Tim-3 auf humanen primären CD14⁺ Monozyten nach Toll-like Rezeptor (TLR)-Aktivierung. Zunächst wurden die peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) aus dem Blut von gesunden Probanden mittels Ficoll™ Dichtegradientenzentrifugation isoliert (siehe Abschnitt 2.2.5.1), und im Anschluss wurden mit Hilfe magnetisch aktivierter Zellsortierung (MACS) CD14⁺ Monozyten aus diesen gewonnen (siehe Abschnitt 2.2.5.2). (A) Die isolierten CD14⁺ Monozyten wurden 2 h mit LPS (5 µg/µl) stimuliert. (A, B) GI254023X (9 µM), GW280264X (9 µM) oder die ADAM10 Prodomäne (A10pro, 10 µM) wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. Die Oberflächenexpression von Tim-3 und CD14 wurde mit Hilfe von FITC- bzw. PE-markierten Antikörpern detektiert (siehe Abschnitt 2.1.2). Als Negativkontrolle dienen die entsprechenden Isotypen (iso). Die Expression erfolgte mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Messung (FACS). Hierbei wurde zuerst die monozytäre Zellpopulation festgelegt und dann der prozentuale Anteil der Tim-3 exprimierenden CD14⁺ Monozyten bestimmt. (B) Zusammenfassendes Ergebnis (Mittelwert ± SD von 4 gesunden Probanden) der Tim-3 exprimierenden Zellen, angegeben in Prozent. **p<0,01, ***p<0,001 (ungepaarter Student's *t* Test). (C) Kinetik der Tim-3 Expression auf TLR-aktivierten CD14⁺ Monozyten. Die isolierten CD14⁺ Monozyten wurden für 0 bis 18 h mit LPS (5 µg/µl) stimuliert. GI254023X (9 µM) oder GW280264X (9 µM) wurden jeweils 30 min vor der Stimulation zugegeben. Die Oberflächenexpression wurde, wie unter (A, B) beschrieben, bestimmt.

Im nächsten Schritt sollte nun analysiert werden, ob die proteolytische Spaltung des endogenen Tim-3-Proteins von der Zelloberfläche der CD14⁺ Monozyten einen regulatorischen Einfluss auf die Expression der Zytokine TNF α , IL-6 und IL-12 hat. Mononukleäre Zellen, wie CD14⁺ Monozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der angeborenen Immunantwort durch LPS. Sie setzen zum einen pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-1, IL-6 und TNF α frei, aber auch andere Zytokine wie IL-12, IL-15 und IL-18 werden von ihnen verstärkt produziert (Cohen, 2002). IL-6 ist sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch und fördert beispielsweise Entzündungsprozesse durch die Vermehrung und Aktivierung von T-Zellen, die Differenzierung von B-Zellen und die Induktion von Akute-

Phase-Proteinen. Auf der anderen Seite besitzt IL-6 ebenfalls eine schützende Funktion. Beispielsweise unterdrückt IL-6 nach intratrachealer Gabe eines Endotoxins zur Induktion eines septischen Schocks die Akkumulation von Neutrophilen (Jones et al., 2001).

Für den durchgeführten Versuch wurden CD14⁺ Monozyten aus dem Blut von gesunden Probanden isoliert und anschließend für 2 bis 24 h mit LPS stimuliert. Desweiteren wurde die Wirkung der Proteaseinhibitoren GI254023X und GW280264X auf die Expression der untersuchten Zytokine analysiert. Die Bildung der Zytokine wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mit Hilfe des entsprechenden ELISAs im Zellkulturüberstand von jeweils 1×10^6 Monozyten quantifiziert. Die TLR-Aktivierung führte nach 2 bis 4 h zu einer verstärkten Freisetzung von IL-6. Der Höhepunkt der IL-6-Sekretion von 1 ng/ml wurde nach 6 h erreicht. Die Proteaseinhibitoren GI254023X und GW280264X zeigten keinen Einfluss auf die IL-6-Freisetzung in den Zellkulturüberstand durch die CD14⁺ Monozyten (Abbildung 33A).

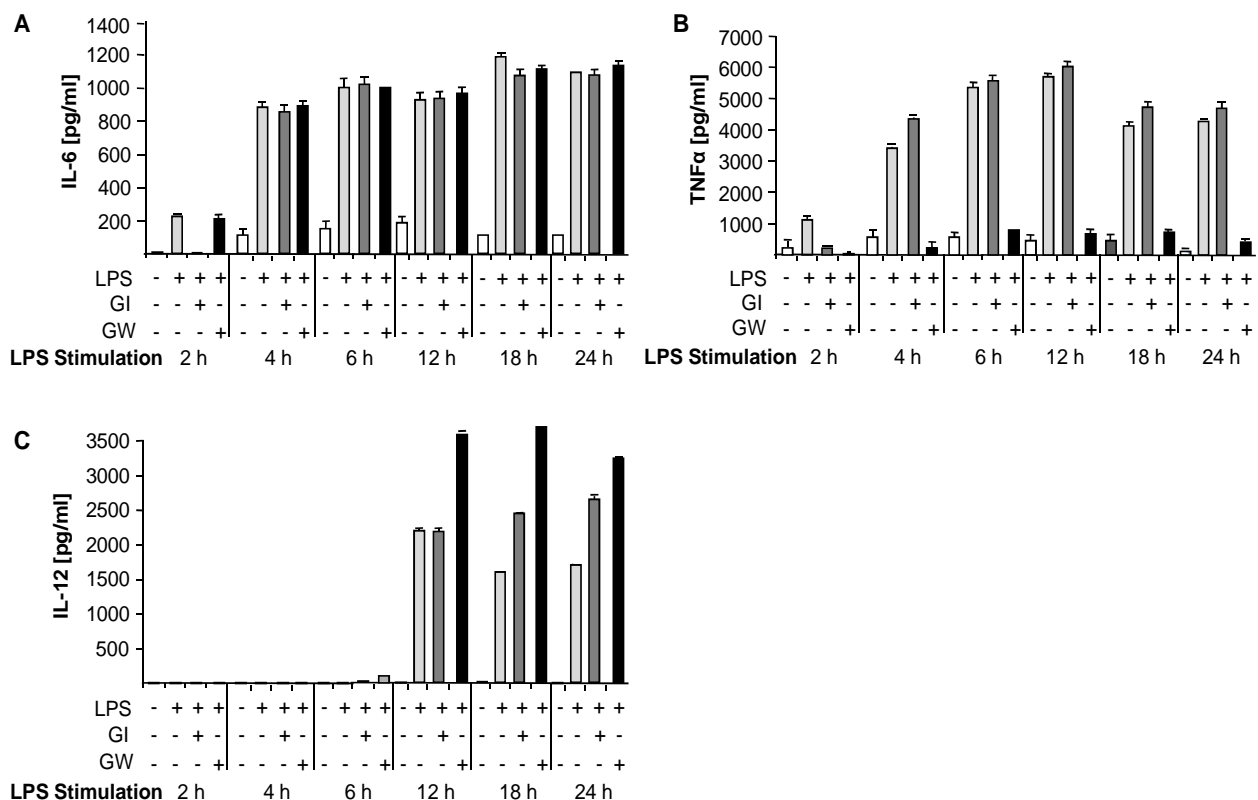


Abbildung 33: Konzentration der sezernierten Zytokine IL-6, TNFα und IL-12 durch primäre CD14⁺ Monozyten nach Toll-like Rezeptor (TLR)-Aktivierung. Zunächst wurden die peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) aus dem Blut von gesunden Probanden mittels Ficoll™ Dichtegradientenzentrifugation isoliert (siehe Abschnitt 2.2.5.1), und im Anschluss wurden mit Hilfe der magnetisch aktivierter Zellsortierung (MACS) die CD14⁺ Monozyten aus diesen gewonnen (siehe Abschnitt 2.2.5.2). 1×10^6 CD14⁺ Monozyten wurden für 2 h bis 24 h mit LPS (5 µg/µl) stimuliert. GI254023X (9 µM) und GW280264X (9 µM) wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. Die entsprechenden Zytokine im Zellkulturüberstand wurden dann zu den angegebenen Zeitpunkten gesammelt und mit den entsprechenden ELISAs quantifiziert (Mittelwert ± SD von 4 gesunden Probanden).

Lösliches TNFα induziert viele typische immunopathologische Eigenschaften des LPS-induzierten Schocks und wird sehr schnell nach der LPS-Stimulation freigesetzt, um so eine

Kaskade von Entzündungsantworten, die weitere Zytokine, Lipide sowie Zelladhensionsmoleküle und reaktive Sauerstoffspezies beinhaltet, zu aktivieren (Dinarello, 1997). Abbildung 33B zeigt, dass die Stimulation der CD14⁺ Monozyten mit LPS ebenfalls bereits nach 2 h zu einer gesteigerten Freisetzung von TNF α in den Zellkulturüberstand führte. Die Zugabe von GI254023X hatte keinen signifikanten Einfluss auf die gemessene TNF α -Konzentration, wenn überhaupt, war ein sehr geringer Konzentrationsanstieg nachweisbar. Der ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW280264X hingegen führte zu einer drastischen Reduktion des freigesetzten TNF α . Die gemessene Konzentration sinkt zu allen Zeitpunkten auf oder unter das Niveau der unstimulierten CD14⁺ Monozyten. Allerdings ist in diesem Fall eher ein Zusammenhang mit der Inhibierung des ADAM17-vermittelten *Sheddings* des membranständigen Vorläuferproteins des löslichen TNF α anzunehmen, als dass die Hemmung der proteolytische Spaltung von Tim-3 diesen starken Effekt bedingt.

Als nächstes wurde die Konzentration des sezernierten IL-12 im Zellkulturüberstand der TLR-aktivierten CD14⁺ Monozyten gemessen. IL-12 wird in Folge der LPS-Stimulation verstärkt produziert (Cohen, 2002) und ist an der Kommunikation zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem beteiligt (Zhang et al., 2012). Die Konzentration stieg in Folge der LPS-Simulation deutlich an (Abbildung 33C). Im Unterschied zu den Zytokinen IL-6 und TNF α war dieser Anstieg allerdings erst nach 12 h messbar. Wie Abbildung 33C zeigt, führte die Inhibierung von ADAM10 durch GI254023X nach 18 und 24 h zu einer leichten Steigerung und GW280264X sogar zu einer starken Erhöhung der IL-12-Freisetzung durch TLR-aktivierte CD14⁺ Monozyten. Zusammenfassend konnte mit diesem Versuch nicht eindeutig geklärt werden, ob die Inhibierung der proteolytischen Prozessierung von Tim-3 durch die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 von LPS-stimulierten CD14⁺ Monozyten einen funktionellen Einfluss auf die induzierte Immunantwort von CD14⁺ Monozyten hat. Falls das *Shedding* von Tim-3 die IL-6 und IL-12-Produktion negativ beeinflussen würde, würden wir erwarten, dass die Inhibierung dieses Prozesses zu einer reduzierten Freisetzung dieser Zytokine führen würde. Dieses konnte durch die hier verwendeten Inhibitoren nicht bestätigt werden. Abschließend liefern diese Analysen keinen eindeutigen Hinweis auf eine Beteiligung der enzymatischen Prozessierung von Tim-3 an der Regulation der Produktion der Zytokine IL-6, IL-12 und TNF α infolge der LPS-Stimulation.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der proteolytische Spaltungsmechanismus des humanen Typ-I-Transmembranrezeptors Tim-3 untersucht. Hierbei sollte die für die proteolytische Spaltung verantwortliche(n) Protease(n) und mögliche regulatorische Interaktionspartner identifiziert werden. Desweiteren sollte eine mögliche biologische Funktion des löslichen Rezeptors in humanen CD14⁺ Monozyten analysiert werden.

Da es zu Beginn der Arbeit noch keinerlei Erkenntnisse zur proteolytischen Spaltung von Tim-3 gab, wurde zunächst überprüft, ob die membranassoziierte Form des humanen Tim-3 durch die Stimulation von ADAM-Proteasen mit dem Ionophor Ionomycin und/oder dem Phorbolster PMA durch die proteolytische Spaltung der Ektodomäne in eine lösliche Form überführt werden kann.

Der Einsatz von spezifischen Inhibitoren, sowie von ADAM-defizienten Zellen, sollten die am Ektodomänen-*Shedding* beteiligten Metalloproteasen identifizieren helfen.

Desweiteren sollte die putative Spaltungsstelle der beteiligten ADAM-Protease(n) und mögliche Regulationsmechanismen analysiert werden. Außerdem sollte das Ektodomänen-*Shedding* des endogenen Tim-3 in primären CD14⁺ Monozyten nach der TLR-Aktivierung dieser Zellen und dessen Auswirkungen auf das angeborene Immunsystem analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zur proteolytischen Spaltung des humanen Tim-3 sowie mögliche Konsequenzen für die *in vivo*-Funktion sollen im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

4.1 Das humane Tim-3 wird von ADAM10 und ADAM17 proteolytisch prozessiert

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit war, dass das humane Tim-3-Protein durch die Aktivität von mindestens zwei Metalloproteasen prozessiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Spaltung des humanen Tim-3 sowohl konstitutiv erfolgte als auch durch Ionomycin und PMA induziert wurde, wobei ADAM10 und ADAM17 weitgehend getrennte Aufgaben übernahmen.

Die Aktivität von ADAM-Proteasen kann durch diverse Stimuli, wie beispielsweise mechanischen oder osmotischen Stress, der Aktivierung von GPCRs oder der PKC, Serum- und Wachstumsfaktoren sowie den Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration durch Ionophore und andere experimentelle und natürliche Stimuli reguliert werden (Huovila et al., 2005). Die am häufigsten verwendeten experimentellen Stimuli zur Aktivierung der ADAM-Proteasen sind Phorbolster, wie PMA, deren genauer Mechanismus der ADAM-Aktivierung bisher nicht eindeutig geklärt ist, aber wahrscheinlich über die Aktivierung der PKC induziert werden kann. Eine weitere Möglichkeit, um die Aktivität von ADAM-Proteasen experimentell zu induzieren, ist der Einsatz von Calcium-Ionophore, wie Ionomycin, die einen rapiden Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bewirken und auf diese Weise zur Aktivierung

der Enzyme führen (Horiuchi et al., 2007). Diese beiden Stimuli wurden in dieser Arbeit verwendet.

Dabei ergab die Stimulation mit PMA von HEK293-Zellen, die mit einem Expressionsplasmid, das für das humane Tim-3-Protein kodiert, transfiziert wurden, eine Anhäufung des löslichen Tim-3-Proteins im Zellkulturüberstand. Dieses konnte mit Hilfe des generierten monoklonalen Antikörpers gegen die IgV-Domäne von Tim-3 im Western Blot detektiert werden und ebenfalls durch die Messung der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden. PMA ist als Induktor der ADAM17-Aktivität beschrieben worden. So zeigten auch die in dieser Studie verwendeten Inhibitoren, dass die Stimulation mit PMA zur Aktivierung des ADAM17-vermittelten *Sheddings* von Tim-3 führte. Während der selektive ADAM10-Inhibitor GI254023X die Spaltung des Rezeptors nur sehr gering reduzierte, führte die Inhibierung mit Hilfe des Inhibitors GW280264X, der sowohl ADAM10 als auch ADAM17 hemmt, zu einer vollständigen Blockierung des PMA-induzierten *Sheddings*.

Insbesondere Ionomycin verursachte eine rapide Freisetzung des löslichen Tim-3 innerhalb weniger Minuten. In den Zellkulturüberständen transfizierter HEK293-Zellen konnte bereits nach 30 min die Akkumulation des löslichen Tim-3-Proteins mit Hilfe der Messung der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase und dem Western Blot-Verfahren festgestellt werden. Da der ADAM10-spezifische Inhibitor GI254023X die durch Ionomycin stimulierte Freisetzung des löslichen Tim-3 vollständig inhibierte und auch der kombinierte ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW280264X den gleichen Effekt erzielte, scheint Ionomycin im Gegensatz zu PMA allerdings hauptsächlich das ADAM10-vermittelte *Shedding* von Tim-3 zu aktivieren und nicht über die Aktivität von ADAM17 zu wirken. Bereits in früheren Studien konnte an Beispielen, wie N-Cadherin, gezeigt werden, dass es sich bei Ionomycin um einen Aktivator des ADAM10-vermittelten Ektodomänen-*Sheddings* handelt (Reiss et al., 2005).

Desweiteren konnte diese unterschiedliche Regulation der Aktivität von ADAM10 und ADAM17 durch den Einsatz der rekombinanten ADAM10-Pro-Domäne, die spezifisch die Aktivität von ADAM10 inhibiert (Moss et al., 2007), bestätigt werden, da durch diese vor allem das Ionomycin-stimulierte Ektodomänen-*Shedding* von Tim-3 inhibiert wurde, und die durch PMA-induzierte Freisetzung nur in geringem Maße reduziert wurde.

Ferner bestätigte die Verwendung von Zellen, die für ADAM10-, ADAM17- oder beide Proteasen defizient sind und mit Tim-3-Expressionsplasmiden transfiziert wurden, die Funktion der beiden Proteasen. Die für ADAM10 defizienten Zellen zeigten nach der Stimulation mit Ionomycin eine stark reduzierte proteolytische Freisetzung des löslichen Tim-3-Proteins im Vergleich zu Wildtyp-MEFs. Aber auch das durch PMA induzierte Ektodomänen-*Shedding* war leicht vermindert. In den Zellen, die kein ADAM17 exprimieren, konnte durch PMA hingegen keine proteolytische Spaltung von Tim-3 induziert werden, während die Stimulation mit Ionomycin, sogar zu einer gesteigerten Freisetzung des löslichen Tim-3-Proteins führte. Dies könnte darauf hinweisen, dass durch das Fehlen von ADAM17, die Aktivität von ADAM10 gesteigert wird, wie es auch schon für andere Substrate von ADAM17, wie TGF α , L-Selektin oder TNF α gezeigt werden konnte (Le Gall et al., 2009). In

Zellen, die defizient für ADAM10 und ADAM17 sind, konnten weder Ionomycin noch PMA die proteolytische Freisetzung von Tim-3 induzieren. Dieses Ergebnis zeigt, dass ADAM10 und ADAM17 die Hauptsheddasen des humanen Tim-3-Proteins sind. Im Vergleich zu den Wildtyp-MEFs zeigten alle verwendeten Protease-defizienten-MEFs auch eine signifikante Reduktion des konstitutiven *Sheddings*, was darauf hindeutet, dass ADAM10 und ADAM17 ebenfalls für den konstitutiven Spaltungsmechanismus von Tim-3 verantwortlich sind. Es kann jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Proteasen in diesen Prozess involviert sind. Geringere Abweichungen der gemessenen AP-Aktivität könnten allerdings eher durch Ungenauigkeiten in der Zellzahl, der Transfektionseffizienz oder der Methode erklärt werden, als durch eine weitere unbekannte, an diesem Prozess beteiligte, Protease.

Festzuhalten bleibt, dass die Stimulation mit dem Phorbolster PMA keinen Einfluss auf die ADAM10 vermittelte Spaltung von Tim-3 hatte, während der durch Ionomycin ausgelöste Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, keine proteolytische Prozessierung durch ADAM17 induzieren konnte. Somit konnte geklärt werden, dass es sich bei dem humanen Tim-3 um ein Substrat der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 handelt. Dieser beobachtete Effekt der differentiellen Aktivierung und Regulation von ADAM10 und ADAM17 konnte schon in früheren Studien festgestellt werden. So zeigten Sahin et al., dass ADAM10-vermitteltes *Shedding* vor allem durch Calcium-Ionophore induziert wird, während PMA ADAM10 nur in einem sehr geringen Maße aktiviert. Im Kontrast dazu wurde beschrieben, dass das ADAM17-vermittelte Ektodomänen-*Shedding* von EGFR-Liganden, wie Heparin-*binding* (HB)-EGF, TGF α und AR ausschließlich durch PMA-induziert werden konnte (Horiuchi et al., 2007; Sahin et al., 2004). Mittlerweile ist für eine Vielzahl transmembraner Substrate gezeigt worden, dass sie sowohl durch ADAM10- als auch durch ADAM17-vermittelte Proteolyse freigesetzt werden, wobei die Induktion der *Shedding*-Aktivität durch unterschiedliche Stimuli erreicht wird. So wurde zum Beispiel für APP (Buxbaum et al., 1998) und die transmembranen Chemokine CXCL1 und CXCL16 beschrieben (Hundhausen et al., 2003), dass der konstitutive Spaltungsmechanismus von ADAM10, während das induzierte proteolytische Prozessieren von ADAM17 vermittelt wurde. Dies bestätigt eine differentielle Regulation der unterschiedlichen Formen des *Sheddings* durch ADAM10 und ADAM17. Da es sich bei PMA und Ionomycin um experimentelle Stimuli handelt, wäre es von großem Interesse physiologischere Stimuli, wie Zytokine oder Chemokine zu verwenden und zu untersuchen, ob diese ebenfalls die proteolytische Spaltung von Tim-3 induzieren und ob weiterhin ADAM10 und ADAM17 das Ektodomänen-*Shedding* von Tim-3 vermitteln. Außerdem wären die Bestimmung der Funktion des löslichen Tim-3-Proteins und die Analyse der Interaktion mit bereits identifizierten Bindungspartnern, wie PtdSer oder Gal-9, das Ziel weiterer Arbeiten.

Eine weitere wichtige Frage ist, auf welche Weise die Metalloproteasen ihr Substrat erkennen und ob sich möglicherweise Erkennungs- oder Spaltstellen unterscheiden. In den meisten Fällen ist allerdings nicht die Primärsequenz, sondern vielmehr die räumliche Struktur und damit die Zugänglichkeit der Domänen des Substrates für das Ektodomänen-*Shedding* entscheidend. Dies konnte bereits am Beispiel des Tim-Familienmitglieds Tim-1 gezeigt werden. Die durch Pervanadat-induzierte proteolytische Spaltung konnte durch die Deletion

von sechs Aminosäuren in der juxtamembranen Region von Tim-1 ($\Delta 278-283$) inhibiert werden, da diese Deletion zu einer kompletten Veränderung der helikalen Sekundärstruktur führte und somit die Zugänglichkeit für die involvierte(n) Protease(n) wahrscheinlich inhibiert wurde (Zhang et al., 2007). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden ebenfalls Deletionen in die membranproximale Region des humanen Tim-3-Proteins experimentell eingebracht. Zur Analyse der Spalt- bzw. Erkennungsstelle der Metalloproteasen wurden drei Expressionsplasmide generiert, denen jeweils zehn Aminosäuren in der juxtamembranen Region des Tim-3-Proteins fehlten. Die Transfektion von HEK293-Zellen mit den Plasmiden, die für diese Deletionsmutanten von Tim-3 kodieren, und die Untersuchung des freigesetzten, löslichen Tim-3-Proteins mittels Western Blot und die Messung der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase infolge der Stimulation mit PMA und Ionomycin, ergab, dass die Entfernung der Aminosäuren $\Delta 181-190$ eine stark reduzierte proteolytische Freisetzung des löslichen Tim-3-Proteins infolge der Stimulation mit PMA bewirkte. Dies deutet auf eine putative Erkennungs- oder Spaltstelle für ADAM17 in diesem Bereich der Mucin-Domäne hin. Allerdings führte die Stimulation mit Ionomycin zu keiner Änderung der proteolytischen Spaltung durch ADAM10.

Obwohl ADAM10 und ADAM17 zusammen über 100 Substrate haben, von denen viele von beiden Proteasen proteolytisch gespalten werden, gibt es keine definierte, gemeinsame Konsensus-Spaltsequenz (Caescu et al., 2009; Pang et al., 2001). Wie die *Shedding*-Analyse der Tim-3-Deletionsmutanten zeigte, scheinen ADAM10 und ADAM17 auch in diesem Fall nicht dieselbe Spaltstelle zu nutzen. Obwohl die beiden beteiligten Proteasen unterschiedliche Spaltstellen zu nutzen scheinen, konnten im Western Blot sowohl durch das Ionomycin- als auch durch das PMA-induzierte *Shedding* nur ein lösliches Tim-3-Protein derselben Größe detektiert werden. Allerdings ist es auch fragwürdig, ob mit Hilfe dieser Methode bei einem Protein mit einer Größe von ca. 60 kDa ein Unterschied von wenigen kDa nachweisbar wäre. Falls es tatsächlich zu einer Veränderung der Sekundärstruktur durch die Deletion von Aminosäuren gekommen sein sollte, wäre dies nicht durch die verwendeten Methoden nachweisbar. Um dies eindeutig zu klären, müssten weitere Verfahren, wie beispielsweise spektroskopische Methoden, wie die *Nuclear magnetic resonance* (NMR)-Spektroskopie, angewendet werden, um die Struktur des Tim-3-Proteins nach Einführung der Deletion im Vergleich zum Wildtyp-Tim-3 zu analysieren. Da in dieser Arbeit nur indirekt eine mögliche Erkennungs- oder Spaltregion für ADAM17 identifiziert wurde, wäre das Ziel weiterer Arbeiten die Identifikation dieser Spaltsequenz mit Hilfe von Proteinsequenzierungstechniken oder mittels Massenspektroskopie. Desweiteren wäre es, in Hinsicht auf die regulatorische Funktion von Tim-3 bei Immunantworten und Tumorstadium, von großem Interesse zu untersuchen, ob das nicht spaltbare Tim-3 *in vivo* einen positiven oder negativen Einfluss auf die bisher bekannten Funktionen und Signalwege von Tim-3 hat. Dies könnte zunächst in Mausmodellen für Tumorstadium oder EAE untersucht werden. Hierzu müssten in weiteren Arbeiten *Knockin*-Mäuse mit der murinen Form des nicht spaltbaren Tim-3 generiert werden. Anhand der bisherigen Studien mit dem sTim-3-Ig-Fusionprotein, könnte man vermuten, dass das durch Ektodomänen-*Shedding* entstandene lösliche Tim-3 ebenfalls die Hyperproliferation von T-Zellen und die spontane Produktion von T-Zell-spezifischen Zytokinen induzieren könnte. Außerdem könnte es ebenfalls an CD4⁺-T-Zellen binden und so, wie schon für das sTim-3-Ig gezeigt, einen regulatorischen Effekt auf Auto- und Alloimmunantworten haben (Sabatos et al., 2003). Da die lösliche *Splicevariante* bisher nur in

Milzzellen nachgewiesen werden konnte, wäre es von großem Interesse zu untersuchen, welche Bedeutung/Funktion das durch proteolytische Spaltung entstandene lösliche Tim-3 *in vivo* besitzt. Eine weitere Frage wäre, in welchen Konzentrationen es *in vivo* vorliegt, um zu untersuchen, ob die Menge des löslichen Tim-3 mit Krankheitszuständen assoziiert ist. Hierzu würde die Entwicklung eines spezifischen ELISAs von großem Vorteil sein.

4.2 Einfluss der intrazellulären Domäne von Tim-3 auf die Regulation des Ektodomänen-*Sheddings*

Da das Ektodomänen-*Shedding* ein streng regulierter Prozess ist, der eine Reihe von Signalwegen involviert (Hayashida et al., 2010), stellt sich auch im Fall von Tim-3 die Frage, auf welche Weise die gezeigte proteolytische Spaltung durch ADAM10 und ADAM17 reguliert wird. Da bereits bekannt ist, dass die cytoplasmatische Domäne der ADAMs aufgrund ihrer putativen Erkennungsmotive eine wichtige regulatorische Rolle spielt, ist diese Domäne ein wahrscheinlicher Interaktionspartner für Adapter- oder *Trafficking*-Proteine, wodurch höchstwahrscheinlich die Substratinteraktion oder die Lokalisierung der ADAMs beeinflusst werden kann. Beispielsweise besitzen ADAMs prolinreiche SH3-Bindestellen, sowie Phosphorylierungsstellen in ihrer cytoplasmatischen Domäne (Seals and Courtneidge, 2003) und könnten somit eine Funktion bei der Kontrolle der Signalregulation besitzen. So konnte bereits gezeigt werden, dass die intrazelluläre Domäne von ADAM17 mit der p38/MAPK interagiert und dass das Threonin⁷³⁵ dadurch phosphoryliert wurde. Dies führte wiederum zum Ektodomänen-*Shedding* von Liganden des EGFR (Xu and Derynck, 2010). Weiter konnte auch gezeigt werden, dass die PMA-Stimulation zur PKC-abhängigen Aktivierung von ADAM17 führte, hierfür allerdings die cytoplasmatische Domäne nicht benötigt wurde (Reddy et al., 2000).

Um zu überprüfen, ob die intrazelluläre Domäne von Tim-3 eine Rolle bei der proteolytischen Spaltung durch ADAM10 und ADAM17 spielt, wurden HEK293-Zellen zunächst mit einem Expressionsplasmid, das für eine Deletions-Mutante kodiert, der die komplette cytoplasmatische Domäne fehlt (hTim-3 Δ ICD), transfiziert. Interessanterweise führte die Stimulation mit PMA nicht zur Freisetzung des löslichen Tim-3-Proteins. Dies deutet daraufhin, dass die intrazelluläre Domäne eine wichtige Funktion für das ADAM17-vermittelte *Shedding* von Tim-3 besitzt. Das durch Ionomycin stimulierte Freisetzen der Tim-3-Ektodomäne wurde hingegen durch das Fehlen der intrazellulären Domäne nicht beeinträchtigt, das wiederum auf einen unterschiedlichen Regulationsmechanismus im Vergleich zu ADAM17 hindeutet. Es wäre also möglich, dass nach der Stimulation mit PMA nicht nur ADAM17, sondern auch Tim-3 phosphoryliert wird und dieses zum Ektodomänen-*Shedding* beiträgt. Dies würde bedeuten, dass ein intrazellulärer Signalweg für die Regulation der Entstehung des löslichen Tim-3 verantwortlich ist.

Bereits frühere Studien ergaben, dass das Ektodomänen-*Shedding* durch Metalloproteasen Tyrosin-phosphorylierte membranassoziierte Fragmente generieren kann. Beispiele hierfür sind die Heregulin-Rezeptoren ErbB-2 und 4 sowie die *Tyrosine kinase receptor type A* (TrkA)-Neurotrophin-Rezeptoren (Cabrera et al., 1996; Vecchi et al., 1998). Auch für den IL-

6R wurde beschrieben, dass die Stimulation mit PMA zu einer PKC-abhängigen Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne des Rezeptors führte (Mullberg et al., 1994). Durch den Einsatz von Staurosporin in dieser Studie, das neben der PKC auch weitere Kinasen, wie die Tyrosinkinasen Lyn, v-Src und Syk, inhibiert, konnte allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass weitere Kinasen in die Phosphorylierung des IL-6R involviert sind. Somit können auch weitere Aminosäurereste neben Threonin, wie Tyrosinreste, aufgrund der ADAM-Aktivierung phosphoryliert werden.

Phosphorylierung ist ein wichtiges Mittel, um intrazelluläre Signale zu verbreiten, indem die Phosphorylierungsstelle als Bindungsstelle für *Downstream-Transducer* oder Effektoren dienen könnte, um auf diese Weise spezifische Zellfunktionen zu regulieren.

Aufgrund der konservierten SH2-Bindungsstellen in der cytoplasmatischen Domäne der meisten Tim-Familienmitglieder, wurden bereits Studien zur Phosphorylierung von intrazellulären Tyrosinresten durchgeführt. So wurde gezeigt, dass die Bindung des Tim-2-Liganden Semaphorin4A an Tim-2 zur intrazellulären Phosphorylierung des Rezeptors führte und dies die T-Zellaktivierung verstärkte (Kumanogoh et al., 2002).

Da die cytoplasmatische Domäne von Tim-3 sechs Tyrosinreste aufweist, einschließlich der konservierten SH2-Bindungsstelle, bietet sie ein hohes Regulationspotential. Eine *in vivo*-Studie ergab, dass die Bindung von Gal-9 zur Phosphorylierung des Tyrosinrestes Tyr²⁶⁵ in der SH2-Bindungssequenz des murinen Tim-3-Proteins durch die *interleukin inducible T cell kinase* (ITK) führte, wie auch die Stimulation mit Pervanadat (van de Weyer et al., 2006). Da die Interaktion von Tim-3 mit seinem Liganden Gal-9 die Apoptose von T-Zellen induziert, könnte die intrazelluläre Phosphorylierung von Tim-3 Signalwege regulieren, die diese begünstigen.

Weiter wurde für Tim-3 beschrieben, dass die direkte Interaktion der cytoplasmatischen Domäne mit den Tyrosinkinasen Fyn und Lck der Src-Familie die Phosphorylierung der Tyrosinreste Tyr²⁵⁶ und Tyr²⁶³ in T-Zellen bewirkte und dies die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *Nuclear factor of activated T cells* (NFAT)/*Activation protein-1* (AP-1) und *Nuclear factor-κB* (NF-κB) infolge der Anti-*T cell receptor* (TCR)/CD28-Stimulation verstärken konnte. Die Bindung von Fyn an Tim-3 wiederum führte zur Phosphorylierung der Phospholipase C (PLC)γ1, welche eine Tim-3-abhängige Verstärkung der ERK/MAPK-Phosphorylierung bewirkte (Abbildung 34).

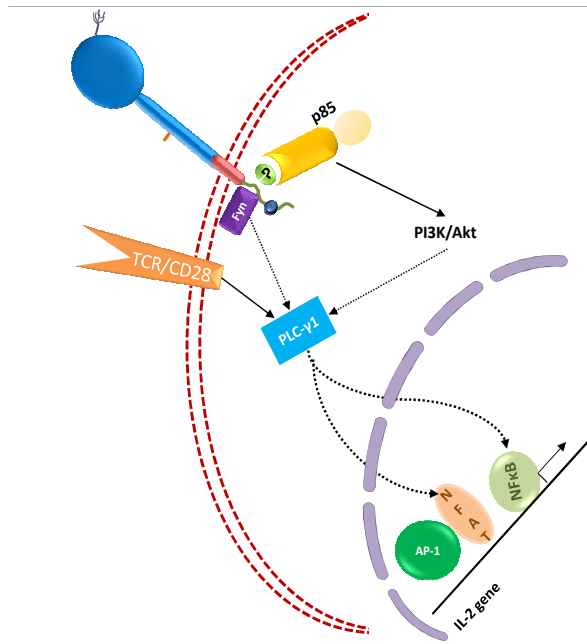


Abbildung 34: Die Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von Tim-3 führt zur Aktivierung von T-Zellen. Die direkte Interaktion der cytoplasmatischen Domäne mit den Tyrosinkinase Fyn und Lck der Src-Familie führte zur Phosphorylierung der Tyrosinreste Tyr²⁵⁶ und Tyr²⁶³ in T-Zellen und zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT/AP-1 und NF- κ B infolge der Anti-TCR/CD28-Stimulation. Die Bindung von Fyn an Tim-3 wiederum führte zur Phosphorylierung der PLC γ 1, welche eine Tim-3-abhängige Verstärkung der ERK/MAPK-Phosphorylierung bewirkte. Die Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von Tim-3 durch Fyn, scheint die Rekrutierung des PI3K-Adapterproteins p85 zu bewirken und auf diese Weise ebenfalls die T-Zell-Aktivierung zu verstärken. NFAT, *Nuclear factor of activated T cells*; AP-1, *Activation protein-1*; NF- κ B, *Nuclear factor- κ B*; TCR, *T cell receptor*; PI3K, *Phosphatidylinositol-3-kinase*; PLC γ 1, *Phospholipase γ 1*.

Da sowohl NFAT/AP-1 als auch NF- κ B infolge der Tim-3-Phosphorylierung verstärkt aktiviert wurden, und es sich hierbei um zwei unterschiedliche Signalwege handelt, deutet dies auf einen konservierten Mechanismus hin (Lee et al., 2011).

Außerdem ergab diese Studie, dass ausschließlich die intrazelluläre Domäne von Tim-3 für die Tim-3-Signalling-vermittelte Aktivierung von NFAT/AP-1 benötigt wird. Weder die IgV-Domäne noch die Mucin-Domäne wurden für diesen Signalweg benötigt (Lee et al., 2011).

Dies könnte auf eine mögliche Funktion des Ektodomänen-*Sheddings* von Tim-3 hinweisen. Falls aus der Prozessierung der Tim-3-Ektodomäne eine Phosphorylierung der cytoplasmatischen Tyrosinreste von Tim-3 resultieren würde, wäre dies eine Möglichkeit, um mit Hilfe des Tim-3 Signalwegs in T-Zellen die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu induzieren, und auf diese Weise gezielt T-Zellantworten zu regulieren. Da bisher nur wenig über den Aktivierungsmechanismus der Tim-3-vermittelten Signalgebung bekannt ist, kann über mögliche regulatorische Mechanismen und deren Folge für die Zellaktivierung nur spekuliert werden (Abbildung 35). Wie bereits beschrieben, führte die T-Zellaktivierung zur Phosphorylierung von Tim-3 und dies wiederum zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Allerdings ist bisher nicht bekannt, ob eine Dimerisierung von Tim-3 ebenfalls zur Aktivierung von Kinasen und so zur intrazellulären Phosphorylierung des Rezeptors führt und auf diese Weise die Transkription wichtiger Proteine oder Zytokine reguliert werden könnte.

Da Studien ergaben, dass das unglykosylierte Tim-3-Ig-Fusionsprotein ebenfalls an vielfältige Zelltypen bindet, deutet dies auf weitere Liganden als Gal-9 hin. Es ist bisher nicht geklärt um welche Interaktionspartner es sich handelt (Cao et al., 2007). Dennoch konnte gezeigt werden, dass diese sowohl auf unterschiedlichen T-Zelltypen, wie Memory-, Effektor- und regulatorischen T-Zellen, aber auch von DCs exprimiert werden (Sabatos et al., 2003). Diese Interaktion könnte ebenfalls zu einer intrazellulären Phosphorylierung von Tim-3 führen und über bisher unbekannte Signalwege Zellfunktionen regulieren. Da sich diese putativen

Liganden höchstwahrscheinlich sowohl auf Zellen des adaptiven als auch angeborenen Immunsystems befinden, ergäbe dies ein sehr breites Wirkungsspektrum.

Weiter wäre es von großem Interesse, die Auswirkungen der Ektodomänen-*Shedding* von Tim-3 auf die intrazelluläre Signalgebung, aber auch auf die Ligandeninteraktion oder die autokrine und parakrine Signalgebung zu untersuchen. Zunächst stellt sich die Frage, ob die proteolytische Spaltung selbst zu einer intrazellulären Modifikation, wie der Tyrosin- oder Serin-Phosphorylierung führt. Allerdings wäre es ebenfalls möglich, dass eine γ -Sekretase, über das sogenannte *RIPpig*, die cytoplasmatische Domäne von der Transmembrandomäne löst und diese dann im Zellkern die Gentranskription reguliert.

Ferner wäre es wichtig die Funktion des löslichen Tim-3 zu untersuchen. Da Zweifel an der Interaktion von Tim-3 mit Gal-9 bestehen (Leitner et al., 2013), wäre es auch möglich, dass das membrangebundene Tim-3 mit dem löslichen Tim-3 interagiert und auf diese Weise, wie schon für die Interaktion mit Gal-9 gezeigt, eine wichtige Rolle bei der Regulation der pathogenen T-Zell-Antwort spielt, indem es zur Reduktion der IFN γ -produzierenden Zellen beiträgt (Zhu et al., 2005). Die Interaktion mit dem löslichen Tim-3-Protein könnte auch zu einer kompetitiven Hemmung anderer Ligandeninteraktionen des membrangebundenen Tim-3 führen und auf diese Weise die Tim-3-Signalgebung beenden und so beispielsweise die Effektorfunktion von T-Zellen wiederherstellen. Da Tim-3 aber auch von APCs exprimiert wird, müssten Studien zunächst diese beiden Signalwege getrennt voneinander betrachten, bevor die tatsächlichen Auswirkungen in *in vivo*-Studien weitergehend untersucht werden könnten. Da Gal-9 als Ligand von Tim-3 durch Immunopräzipitationsanalysen mit dem Tim-3-Ig-Fusionsprotein identifiziert wurde (Wada et al., 1997) und zur Bindung die IgV-Domäne benötigt wird, besteht die Möglichkeit, dass das lösliche Tim-3 auch mit Gal-9 interagieren kann, entweder auf derselben Zelle oder auf anderen Zellen und Zelltypen.

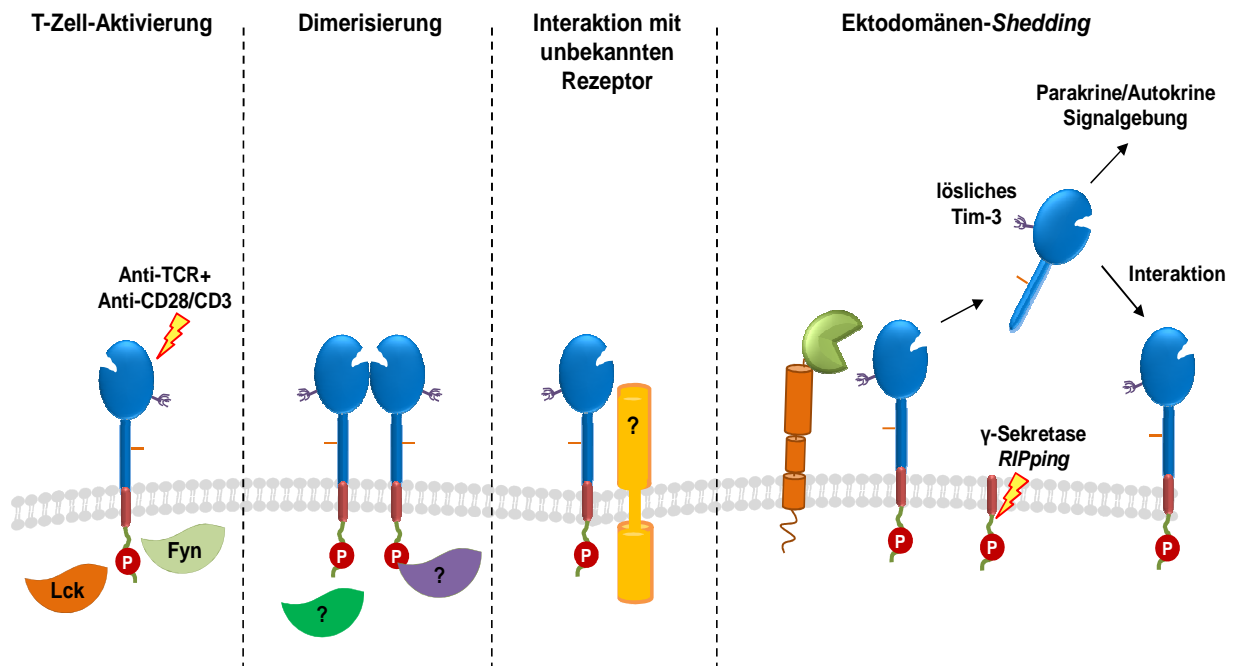


Abbildung 35: Putative Aktivierungsmechanismen für Tim-3.

Um die Hypothese zu untersuchen, ob die proteolytische Spaltung zu einer Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste führt und auf diese Weise mögliche nachgeschaltete Signalwege reguliert werden, wurden weitere Deletionsmutanten generiert. Diese Mutanten besaßen entweder nur einen sehr membranahen Tyrosinrest (hTim-3 Δ I2) oder es fehlten bis auf drei alle konservierten Tyrosinreste (hTim-3 Δ I1) (siehe Abbildung 23). HEK293-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren, die für diese Deletionsmutanten kodieren, transfiziert und Stimulationsversuche mit Ionomycin und PMA durchgeführt. Allerdings konnte kein Regulationsmechanismus des Ektodomänen-*Sheddings* durch die intrazelluläre Phosphorylierung festgestellt werden, da beide Mutanten proteolytisch gespalten wurden. Aus diesem Resultat lässt sich schließen, dass es wahrscheinlich keiner Phosphorylierung der Tyrosinreste der cytoplasmatischen Domäne von Tim-3 zur Aktivierung der proteolytischen Spaltung des Rezeptors bedarf. Bereits für Tim-1 wurde gezeigt, dass die Pervanadat-Stimulierung zwar zum Ektodomänen-*Shedding* und zur Phosphorylierung von Tyr³⁵⁰ und Tyr³⁵⁶ in der cytoplasmatischen Domäne von Tim-1 führte und dies wiederum die Interaktion mit der SH-2-Domäne des PI3K-Adapterproteins p85 ermöglichte. Allerdings spielte diese Phosphorylierung keine Rolle für die proteolytischen Spaltung, da eine *Splicevariante* von Tim-1, der die cytoplasmatische Domäne fehlt, ebenfalls proteolytisch prozessiert wurde (Zhang et al., 2007).

Da die cytoplasmatische Domäne von Tim-3 dennoch eine Funktion bei der proteolytischen Spaltung von Tim-3 zu besitzen scheint, wie mit Hilfe der Deletionsmutante hTim-3 Δ ICD gezeigt werden konnte, wurden drei weitere Deletionsmutanten generiert, denen jeweils von der Transmembrandomäne aus 10 bis 12 Aminosäurereste der cytoplasmatischen Domäne fehlten (siehe Abbildung 23). Allerdings wurden auch diese drei Deletionsmutanten infolge der PMA- und Ionomycin-Stimulation proteolytisch gespalten. Da keine Sequenz in der cytoplasmatischen Domäne gefunden werden konnte, die das ADAM17-vermittelte Ektodomänen-*Shedding* von Tim-3 reguliert, wurde eine weitere Mutante erstellt, der bis auf das membranproximale Lysin²²⁶, die komplette cytoplasmatische Domäne fehlt. Überraschenderweise wurde auch diese Mutante nach der Stimulation mit PMA und Ionomycin enzymatisch gespalten. Da bisher keine Rezeptoren oder andere Substrate beschrieben wurden, bei denen die Addition eines einzigen intrazellulären Aminosäurerestes das Ektodomänen-*Shedding* des Substrates beeinflusst, kann an dieser Stelle nur über einen möglichen Mechanismus spekuliert werden. Zunächst kann aus diesen Resultaten geschlossen werden, dass die intrazelluläre Domäne von Tim-3 einen Einfluss auf die proteolytische Spaltung des Rezeptors hat. Allerdings scheint nur die Deletion der kompletten Domäne das Ektodomänen-*Shedding* zu inhibieren und dieser Prozess nicht von einzelnen Sequenzabschnitten abzuhängen. Die Addition einer einzigen Aminosäure könnte dazu führen, dass der Rezeptor besser in die Zellmembran inseriert oder integriert werden kann und so die Zugänglichkeit für die beteiligte(n) Protease(n) verbessert wird. Weiter könnte das Fehlen der cytoplasmatischen Domäne zu einer Veränderung der Sekundärstruktur der Ektodomäne führen, die wiederum einen Einfluss auf die proteolytische Prozessierung haben könnte (Schlondorff and Blobel, 1999), was mit Hilfe von FACS-Analysen und dem Western Blot-Verfahren nicht ersichtlich wäre. Hier würden NMR-Analysen dieser Mutante Aufschluss geben. Da Membranproteine in die Doppellipidschicht der Zellmembran integriert sind und so der NMR-Spektroskopie in Lösung nicht zugänglich sind, müsste das

Membranprotein in Detergenzmizellen aufgenommen werden, die eine lokale hydrophobe Umgebung liefern, und somit solubilisieren (Gossert et al., 2007).

Auch könnte die Möglichkeit bestehen, dass die fehlende intrazelluläre Domäne zu einem Verbleib des Proteins im ER oder Golgi-Apparat führt. Allerdings haben FACS-Analysen gezeigt, dass beide Deletionsmutanten (hTim-3 Δ ICD und hTim-3 Δ ICD+1) auf der Oberfläche von transfizierten HEK293-Zellen gleich stark exprimiert werden.

Allerdings könnte die intrazelluläre Domäne, wie schon am Beispiel der Integrin-Aktivierung gezeigt, auch eine Rolle beim *Inside-out-Signaling* spielen. So dass die intrazelluläre Bindung von Liganden eine Konformationsänderung der Ektodomäne von Tim-3 bewirkt, und auf diese Weise Tim-3 aktiviert oder die Erkennung durch ADAM-Proteasen erleichtert wird.

Bisher sind nur wenige Substrate der ADAM-Proteasen bekannt, bei denen die cytoplasmatische Region eine regulatorische Funktion besitzt. Das prominenteste Beispiel ist L-Selektin. Es gehört zu den Adhäsionsmolekülen und besteht aus einer großen, stark glykosylierten Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einer kleinen cytoplasmatischen Domäne. Die cytoplasmatische Domäne wird von PKC-Isoenzymen und der Src-Tyrosinkinase p56^{Lck} phosphoryliert (Wedepohl et al., 2012). L-Selektin wird vor allem auf Leukozyten exprimiert und deren *in vivo*-Aktivierung über GPCRs, Zytokine oder auch PMA führt zur Freisetzung der extrazellulären Domäne von L-Selektin durch ADAM17 (Peschon et al., 1998). Das Ektodomänen-*Shedding* von L-Selektin spielt eine wichtige Rolle während der Leukozytenrekrutierung, indem es zur vorübergehenden Aufhebung des Zellkontaktes zum Endothel führt und somit die charakteristische rollende Bewegung der Leukozyten erlaubt (Kahn et al., 1998). Die proteolytische Spaltung von L-Selektin wird durch die Bindung von Calmodulin an eine Aminosäuresequenz, die sich in der cytoplasmatischen Domäne und einem Teil der Transmembrandomäne von L-Selektin befindet, reguliert. Durch die cytoplasmatische Bindung von CaM wird die strukturelle Konformation der Ektodomäne von L-Selektin so verändert, dass die Zugänglichkeit für ADAM-Proteasen stark reduziert wird und so keine Proteolyse stattfindet (Gifford et al., 2012). CaM ist ein ubiquitär exprimiertes, 17 kDa großes Protein, das an unterschiedlichen Arten der Ca²⁺-abhängigen Interaktionen beteiligt ist und mit vielen Effektoren, die in Wachstums- und Bewegungsprozessen sowie Proliferation und Adhäsion involviert sind, interagiert (Chin and Means, 2000). CaM-bindende Regionen sind amphipathische Helices, die reich an basischen Resten sind, wie die Aminosäuren Lysin und Arginin (O'Neil and DeGrado, 1990). Nicht nur für L-Selektin, sondern auch für andere Proteine, wie APP, EGFR oder Semaphorin4D, wurde gezeigt, dass CaM durch seine Ca²⁺-abhängige Interaktion mit der cytoplasmatischen Domäne, das Ektodomänen-*Shedding* negativ reguliert (Canobbio et al., 2011; Matala et al., 2001; Mou et al., 2013). Obwohl das Fehlen der cytoplasmatischen Domäne zu einer Steigerung der proteolytischen Spaltung aufgrund der fehlenden CaM-Regulation führen müsste, ergab die Deletion der intrazellulären Domäne von L-Selektin eine Reduktion des PMA-induzierten Ektodomänen-*Sheddings* um 50% (Zhao et al., 2001). Da in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden konnte, dass die cytoplasmatische Domäne einen regulatorischen Einfluss auf die ADAM17-vermittelte proteolytische Spaltung von Tim-3 hat, könnte die Interaktion mit Calmodulin an diesem Prozess beteiligt sein. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurde der CaM-Antagonist W7 verwendet, der die Bindung von CaM an seinen Interaktionspartner inhibiert. Wie schon für L-Selektin gezeigt, führte die Blockade der CaM-

Bindung durch W7 zur Proteolyse und Freisetzung des löslichen Tim-3-Proteins. Die Verwendung der Metalloprotease-Inhibitoren GI254023X und GW280264X bestätigte, dass die proteolytische Spaltung durch ADAM17 vermittelt wurde. Dies konnte durch die Verwendung der Deletionsmutante hTim-3 Δ S2 bestätigt werden, da diese aufgrund der fehlenden Binde-, Erkennungs- oder Spaltungsstelle von ADAM17 nicht proteolytisch gespalten wird. Auch die Inhibierung der CaM-Assoziation führte nicht zur Freisetzung des löslichen Tim-3. Allerdings ergab die *Shedding*-Analyse der Mutanten hTim-3 Δ ICD und hTim-3 Δ ICD+1 keinen weiteren Aufschluss über eine mögliche Bindung von CaM an die cytoplasmatische Domäne, da beide Deletionsmutanten infolge der Behandlung mit W7 proteolytisch prozessiert wurden. Wobei das Ektodomänen-*Shedding* der Deletionsmutante hTim-3 Δ ICD etwas reduziert war im Vergleich zum Wildtyp-Tim-3. Desweiteren konnte mit Hilfe eines CaM-pull-down-Assays gezeigt werden, dass alle Mutanten direkt mit CaM interagieren. Da die Interaktion zwischen CaM und vielen seiner Zielmoleküle Ca²⁺-abhängig ist, wurde weiter durch den Einsatz des Ca²⁺-Chelators EDTA untersucht, ob auch die Interaktion zwischen CaM und Tim-3 Calcium-abhängig ist. Diese Analyse ergab, dass die Interaktion von CaM und Tim-3 durch EDTA tatsächlich blockiert werden konnte und somit wahrscheinlich Ca²⁺-abhängig ist. Da es sich bei ADAM-Proteasen um Zink-abhängige Enzyme handelt, müsste in weiteren Arbeiten überprüft werden, ob die Verwendung von EDTA tatsächlich die Interaktion mit CaM beeinflusst oder ob dies zur Verminderung der Aktivität der Zink-abhängigen Metalloprotease führt. Hierfür müsste man untersuchen, ob das durch PMA-induzierte Ektodomänen-*Shedding* von Tim-3 ebenfalls durch EDTA inhibiert werden kann. Allerdings konnte bereits für das ADAM17-vermittelte IL-6R-*Shedding* gezeigt werden, dass dieses nicht durch EDTA gehemmt werden konnte, also scheint ein Einfluss von EDTA auf ADAMs eher unwahrscheinlich (Müllberg et al., 1992). In weiteren Versuchen müsste geklärt werden, ob CaM mit Tim-3 in Anwesenheit von EDTA assoziiert ist, um eine tatsächliche Calcium-Abhängigkeit der Interaktion nachzuweisen. Ferner wäre es von Vorteil zu analysieren, ob eine mögliche Bindung des CaM an Tim-3 nicht nur bei überexprimiertem, sondern auch endogenem Tim-3 stattfindet und somit für diese Bindung eventuell auch ein *in vivo*-Ca²⁺-Bedarf besteht. Auf diese Weise könnte diese Interaktion auch weitere Funktionen besitzen, wie zum Beispiel bei der Apoptoseinduktion.

Interessanterweise konnte die Bindung der Deletionsmutante hTim-3 Δ ICD+1 nicht durch EDTA inhibiert werden. Da die Addition eines einzelnen intrazellulären Lysinrestes die PMA-induzierte Spaltung von Tim-3 wiederherstellt, könnte dies natürlich auf eine mögliche Bindungsstelle von CaM in dieser Region hindeuten. Da Lysin einen basischen Rest besitzt und CaM amphipathische positiv-geladene Peptidsequenzen zur Substratbindung benötigt, könnte sich in diesem Bereich eine mögliche Bindungssequenz für das CaM befinden. Wie schon im Fall von L-Selektin gezeigt, könnte diese Stelle bis in die Transmembrandomäne hineinreichen. Dies scheint ein allgemeiner Mechanismus der CaM-vermittelten Regulation des Ektodomänen-*Sheddings* zu sein (Gifford et al., 2012). Um dies im Detail zu klären, müsste man eine weitere Deletionsmutante für diesen Sequenzbereich generieren oder den Lysinrest durch eine negativ geladene oder ungeladene Aminosäure ersetzen und eventuell untersuchen, ob sich dieses Peptid mit CaM immunopräzipitieren lässt.

Da Tim-3 an der Regulation der Apoptose von T-Zellen beteiligt ist und vermutet wird, dass durch diesen Prozess die Immunantwort negativ reguliert wird, um eine Überreaktion des

Immunsystems zu verhindern, könnte die CaM-Interaktion dazu führen, dass das Tim-3-*Shedding* unterdrückt wird, um auf diese Weise die Expression von Tim-3 auf der Zelloberfläche aufrechtzuerhalten und somit die damit verbundenen Funktionen zu regulieren.

4.3 Proteolytische Spaltung des endogenen Tim-3 in primären humanen CD14⁺ Monozyten

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das humane Tim-3, wenn es in HEK293-Zellen überexprimiert wird, nach Stimulation mit PMA von ADAM17 proteolytisch gespalten wird. Eine Behandlung Ionomycin führte zur Induktion des Ektodomänen-*Sheddings* durch ADAM10.

Tim-3 wurde zunächst im adaptiven Immunsystem als spezifischer Marker für Effektor-T-Zellen entdeckt, wird aber ebenfalls auf anderen Zelltypen des Immunsystems, wie APCs und insbesondere Monozyten und Makrophagen, exprimiert. Da es eine sehr komplexe Rolle bei der Regulation der angeborenen Immunität spielt (Anderson et al., 2007), stellten sich die Fragen, ob auch das endogene Tim-3 proteolytisch prozessiert wird, welche Protease(n) an diesem Prozess beteiligt sind und welche Funktion das Ektodomänen-*Shedding* hat.

Studien ergaben, dass Tim-3 zum einen die Aktivierung von Makrophagen negativ reguliert, und zum anderen durch die Tim-3-Expression auf Zellen des angeborenen Immunsystems die Regulation des adaptiven Immunsystems beeinflusst wird (Ju et al., 2010; Monney et al., 2002). Um zu untersuchen, ob das endogene Tim-3-Protein ebenfalls nach der Stimulation mit PMA und Ionomycin proteolytisch gespalten wird, wurden humane CD14⁺ Monozyten aus dem Blut von gesunden Probanden isoliert. Diese Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren bereits im ruhenden Zustand hohe Level an Tim-3 auf ihrer Zelloberfläche, während T-Zellen erst nach ihrer Aktivierung Tim-3 exprimieren.

Die Stimulation mit Ionomycin und PMA führte zu einer starken Reduktion des auf der Zelloberfläche exprimierten Tim-3. Eine Blockierung der ADAM10-Aktivität durch den selektiven ADAM10-Inhibitor GI254023X und den kombinierten ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW280264X bestätigte die Rolle von ADAM10 und ADAM17 für die induzierte Spaltung von Tim-3. Somit konnte gezeigt werden, dass auch das endogene Tim-3 ein Substrat von ADAM10 und ADAM17 ist, wobei die Stimulation mit Ionomycin eher zur Aktivierung des ADAM10-vermittelten *Sheddings* führte, während PMA wie schon in HEK293-Zellen gezeigt, ADAM17 aktivierte. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass das Ektodomänen-*Shedding* des humanen Tim-3 nicht nur aus der Überexpression des Substrates in einem artifiziellen System resultiert.

Sepsis ist ein Zustand, der durch die Invasion von mikrobiellen Pathogenen in den Blutstrom oder sterile Entzündung, zum Beispiel bei schwerwiegenden Traumata, Verbrennungen oder Pankreatitis, entsteht und durch eine systemische pro-inflammatorische Antwort, die zu einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock führen kann, charakterisiert ist (Bone et al.,

1992; Vincent et al., 2013). Allgemein wird Sepsis als Antwort eines Wirts auf die Invasion von Pathogenen oder deren Toxine betrachtet. Das angeborene Immunsystem erkennt eindringende Mikroorganismen über PRRs, die auf dem Epithel und von Immunzellen, wie DCs und Makrophagen, exprimiert werden (Akira et al., 2006). TLRs sind eine spezifische Familie von PRRs, die konservierte makromolekulare Motive von Mikroorganismen, sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), erkennen (Takeda et al., 2003). Beispiele für diese PAMPs sind LPS, Peptidoglykan, Flagellin und bakterielle DNA und RNA (Song, 2012). Die Stimulation der TLRs löst eine Signalkaskade aus, die zur Aktivierung einer transkriptionellen Antwort führt, die Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, AP-1 und Interferon regulatory factor 3 (IRF3) beinhaltet, die wiederum die Produktion und Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Stickoxid (NO) induziert (Schulte et al., 2013).

LPS ist eine Komponente der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien und wird auch als Endotoxin bezeichnet. Die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen durch LPS erfolgt über das *Lipid binding protein* (LBP) und CD14. Die Bindung dieses Komplexes an TLR4 führt zur Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL-6 und IL-1 β sowie weiteren Zytokinen wie IL-12 und IL-18 (Cohen, 2002).

Wie mehrere Studien gezeigt haben, werden ADAM-Protease auf der Zelloberfläche von Monozyten exprimiert (Moreira-Tabaka et al., 2012; Robertshaw and Brennan, 2005) und die Stimulation mit LPS führte, wie am Beispiel von Pro-TNF α gezeigt, zur Aktivierung von ADAM17 (Doedens and Black, 2000; Moreira-Tabaka et al., 2012). Wie bereits beschrieben führte die TLR-Aktivierung mit LPS zu einer schnellen Runterregulation der Tim-3-Expression auf CD14⁺ Monozyten, die mit einer verstärkten Zytokinproduktion assoziiert war. Dies ließ auf eine regulatorische Rolle von Tim-3 bei der Produktion von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen schließen. Hypothese dieser Studie war, dass Tim-3 einige Antworten des angeborenen Immunsystems zunächst inhibiert und die Freisetzung von Tim-3, aufgrund der TLR-Aktivierung, dann zu einer regulierten und verstärkten inflammatorischen Antwort von Monozyten und Makrophagen führte (Zhang et al., 2012).

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit war, dass diese Herunterregulation der Zelloberflächenexpression von Tim-3 infolge der TLR-Aktivierung durch LPS aufgrund der proteolytischen Spaltung durch ADAM10 und ADAM17 vermittelt wurde, und es sich um einen zeitabhängigen Prozess handelte. Der Einsatz der Hydroxamat-Inhibitoren GI254023X und GW280264X sowie der Pro-Domäne von ADAM10 bestätigten dieses Resultat und identifizierte ADAM10 als Haupt*shedase* von Tim-3 in humanen CD14⁺ Monozyten.

Sepsis ist mit der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF α , IL-6, IL-1, IL-12 und IFN γ , verbunden. Zusammen mit anti-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-10 oder TGF β , und löslichen Inhibitoren von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie sTNFRs, bilden sie ein stark reguliertes Netzwerk, das essentiell ist für die Tötung der eindringenden Mikroorganismen, aber auch die Gewebe-schädigende Entzündung begrenzt (Schulte et al., 2013).

TNF α gehört zu den pro-inflammatorischen Zytokinen und ist an einer großen Anzahl von Entzündungserkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, beteiligt. Es wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen als Antwort auf Infektion und Entzündung gebildet, aber wird ebenfalls von Fibroblasten und Lymphozyten exprimiert. TNF α wird als Typ-II-

Transmembranprotein exprimiert und durch die ADAM17-vermittelte proteolytischen Spaltung aktiviert und als lösliches Homotrimer freigesetzt (Tang et al., 1996). Diese Freisetzung erfolgt zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Immunantwort. TNF α agiert über zwei unterschiedliche Transmembranrezeptoren, TNFR1 und TNFR2, was zur Aktivierung von Immunzellen führt und die Freisetzung von regulatorischen Effektormolekülen fördert. Die Rolle von TNF α während der Sepsis hat viele Facetten, wie zum Beispiel die Aktivierung und Proliferation von Makrophagen und die Sekretion von IL-6, und alle Effekte führen zur Verstärkung der pro-inflammatorischen Antwort (Schulte et al., 2013). IL-6 wird infolge der Stimulation mit LPS von einer Reihe von Zellen produziert, hierzu zählen unter anderem Makrophagen, DCs, Lymphozyten, Endothelzellen und Fibroblasten. IL-6 hat viele biologische Funktionen, einschließlich der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten. Hauptfunktionen von IL-6 sind zum Beispiel die Induktion von Fieber und die Vermittlung der Akut-Phase-Antwort. Aber auch anti-inflammatorische Antworten werden von IL-6 gefördert. So inhibiert es zum Beispiel die Freisetzung von TNF α und IL-1 (Schindler et al., 1990) und verstärkt zusätzlich die Zirkulation von anti-inflammatorischen Mediatoren wie sTNFRs und IL-10 (Steensberg et al., 2003).

Das heterodimere Zytokin IL-12 wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und DCs produziert und ist ebenfalls in die Regulation der angeborenen Immunantwort involviert, aber fördert auch die Entwicklung einer adaptiven T_H1-Antwort. Auf diese Weise verbindet IL-12 die frühe unspezifische angeborene mit der späteren spezifischen adaptiven Immunantwort. IL-12 stimuliert T-Zellen und NK-Zellen zur Produktion von IFN γ , das wiederum Makrophagen aktiviert und ihre antibakterielle Funktion verstärkt (Bonecchi et al., 1998). Außerdem schützt es CD4⁺ T-Zellen vor der Antigen-stimulierten Apoptose durch Stimulation deren Differenzierung zu T_H1-Zellen (Estaquier et al., 1995).

Die Rolle dieser pro-inflammatorischen Zytokine wurde auch in dieser Arbeit untersucht. Die TLR-Aktivierung führte in diesem Versuch zu einer frühen Produktion von TNF α und einer leicht verzögerten Sekretion von IL-6. Da der Einfluss der proteolytischen Spaltung von Tim-3 auf die Produktion dieser Zytokine und somit die Aktivierung der Immunantwort untersucht werden sollte, wurden die Metalloproteaseinhibitoren GI254023X und GW280264X verwendet. Der Einsatz dieser Inhibitoren ergab jedoch keine signifikante Änderung der Zytokinproduktion aufgrund der Inhibierung der Tim-3-Spaltung. Da TNF α , wie bereits beschrieben ein Substrat von ADAM17 ist, wurde die Sekretion von TNF α durch die Inhibierung von ADAM17 erwartungsgemäß stark inhibiert. Da Zhang et al. die Hypothese aufgestellt haben, dass Tim-3 die Produktion von IL-12 negativ reguliert und auf diese Weise der Verlust der Tim-3-Zelloberflächen-Expression die Entzündungsantwort des adaptiven Immunsystems fördert, wurde erwartet, dass die Inhibierung des Ektodomänen-*Sheddings* von Tim-3 zu einer Hemmung der IL-12 Produktion führen würde. Allerdings führte die Inhibierung der proteolytischen Spaltung von Tim-3 eher zu einer verstärkten Freisetzung von IL-12. Somit konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden. Allerdings stellt sich die Frage, ob IL-12 durch sTNF α negativ reguliert wird. Da die Inhibierung des TNF α -*Sheddings* anscheinend invers mit der Produktion von IL-12 zu korrelieren scheint. Da IL-12 zu einer verstärkten T-Zellaktivierung führt und zur Produktion von IFN γ , was die Aktivierung von Makrophagen wiederum steigert, deutet dieses Ergebnis auf eine positive Regulation der

Immunantwort durch die Oberflächenexpression von Tim-3 auf CD14⁺Monozyten hin. Allerdings könnte die resultierende, verstärkte Immunantwort unter Umständen auch zu einer unkontrollierbaren Überreaktion führen, die negative Folgen, wie Zell- und Gewebeschäden, haben könnte. Somit trüge das *Shedding* von Tim-3 entscheidend zur Vermeidung einer Überreaktion der Immunantwort bei. Weiter könnte das lösliche Tim-3 ebenfalls wie die Blockade mittels Tim-3-Antikörper oder siRNA zu einer gesteigerten Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 führen (Zhang et al., 2012) und auf diese Weise die T_H1-Antwort schwächen. Aus den durchgeführten Experimenten lässt sich kein eindeutiges Bild der Funktion des Tim-3-*Sheddings* in CD14⁺ Monozyten gewinnen. In weiteren Arbeiten sollte die Funktion des löslichen Tim-3 in Hinsicht auf seine Rolle im Immunsystem untersucht werden. Außerdem wäre es von großem Interesse zu analysieren, ob die proteolytische Spaltung von Tim-3 auch auf andere Zelltypen des Immunsystems erweiterbar ist.

4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt Tim-3 als ein weiteres Substrat der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17. Es konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Spaltung des humanen Tim-3 nach der Stimulation mit Ionomycin durch ADAM10 enzymatisch prozessiert wird und dass PMA zur Aktivierung des ADAM17-vermittelten Ektodomänen-*Sheddings* von Tim-3 führte. Desweiteren konnte auch die proteolytische Spaltung des endogenen Tim-3 infolge der Stimulation mit PMA, Ionomycin und LPS durch ADAM10 und ADAM17 auf primären humanen CD14⁺ Monozyten nachgewiesen werden. Bisher gab es nur wenige Hinweise auf eine mögliche proteolytische Prozessierung von Mitgliedern der Tim-Familie. So wurde bisher nur die Spaltung von Tim-1 durch die Matrix-Metalloprotease-3 nachgewiesen.

Eine wichtige Rolle beim Ektodomänen-*Shedding* besitzt die cytoplasmatische Domäne von Substrat und Protease. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Domäne des humanen Tim-3 für das stimulierte Ektodomänene-*Shedding* durch ADAM17 benötigt wird. Welche intrazellulären Signalwege hierfür verantwortlich sind, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden und muss durch nachfolgende Experimente analysiert werden.

Da es bisher keine ausreichende Studien zur Ligandeninteraktion von Tim-3 gibt und nur PtdSer als verifizierter Bindungspartner gilt, wäre es wichtig die Interaktion des löslichen Tim-3 mit putativen Liganden zu untersuchen. Hierbei stellt sich die Frage, ob das lösliche Tim-3 auch an das membrangebundene Tim-3 oder einen anderen Liganden auf derselben Zelle oder benachbarten Zellen binden kann, und ob dies zur kompetitiven Hemmung von anderen Ligandeninteraktionen führt, oder dies die Inhibierung oder Aktivierung von Signalwegen bewirkt.

Basierend auf diesen neuen Erkenntnissen ergeben sich neue mögliche Funktionen für Tim-3 in der Regulation des Immunsystems. So sollte die *in vivo* Rolle des löslichen Tim-3 in murinen Krankheitsmodellen, wie EAE oder Diabetis, analysiert werden. Da es Hinweise auf negative immunoregulatorische Effekte durch Blockade der Tim-3-Signalwege gibt, wäre es von großem Interesse zu untersuchen, ob das lösliche Tim-3 zur Inhibierung der Tim-3-Signalwege führt, oder eher zur Aktivierung von Immunzellen über die parakrine oder autokrine Signalgebung. Die Identifizierung der regulatorischen Effekte des löslichen Tim-3 *in vivo* ist wichtig, um die Ergebnisse aus murinen Krankheitsmodellen, an deren Pathogenese Tim-3 beteiligt ist, richtig zu interpretieren.

5. Zusammenfassung

Das humane Tim-3 gehört zur *T cell immunoglobulin and mucin*-Genfamilie und wird sowohl auf Zellen des adaptiven Immunsystems als auch auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert und wurde zunächst als negativer Regulator von Immunantworten bekannt, der wichtig für das Beenden von Effektor-T-Zellen vermittelten Immunantworten ist. Die Expression von Tim-3 auf Zellen des adaptiven Immunsystems ist stark mit der angeborenen Immunantwort verbunden, wie zum Beispiel der Regulation des Tumorwachstums und die Antwort auf intrazelluläre Pathogene in Makrophagen.

Als Ektodomänen-*Shedding* wird die proteolytische Freisetzung extrazellulärer Bereiche membranständiger Proteine durch Proteasen bezeichnet. Dieser Prozess ist eine der am besten charakterisierten Funktionen der *A Disintegrin And Metalloprotease* (ADAM) Genfamilie. Die resultierenden physiologischen Konsequenzen sind vielfältig.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit war, dass Tim-3 durch ADAM10 und ADAM17, zwei Vertretern der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen prozessiert wird. Durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren, die in der Lage sind die Aktivität der beiden Proteasen zu hemmen, konnte gezeigt werden, dass ADAM17 für die PMA-induzierte Spaltung verantwortliche ist, während ADAM10 die wichtigste Protease für das Ionomycin-stimulierte Ektodomänen-*Shedding* ist. Dieser Befund konnte durch die Untersuchung des *Shedding*-Verhaltens von Tim-3 in murinen embryonalen Fibroblasten, die defizient für ADAM10 und/oder ADAM17 sind bestätigt werden. Die differentielle Regulation von ADAM10 und ADAM17 bei der Freisetzung von Tim-3 wurde durch Untersuchung zur Rolle der cytoplasmatischen Domäne von Tim-3 und bei der Identifizierung einer möglichen Spaltstelle oder Erkennungssequenz unterstrichen. So führte die Deletion von 10 Aminosäuren in der membranproximalen Region der Mucin-Domäne von Tim-3 sowie die Entfernung der vollständigen intrazellulären Domäne zur Inhibierung des ADAM17-vermittelten Ektodomänen-*Sheddings*, aber nicht zur Inhibierung der ADAM10-induzierten Freisetzung des löslichen Tim-3.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, wie die intrazelluläre Domäne von Tim-3 einen regulatorischen Einfluss auf die proteolytische Spaltung durch ADAM17 ausübt. Es wurde festgestellt, das Calmodulin höchstwahrscheinlich mit einem Teil der intrazellulären Domäne und der Transmembrandomäne direkt interagiert und die Calcium-abhängige Bindung das ADAM17-vermittelte Ektodomänen-*Shedding* negativ reguliert. Ferner wurde untersucht, ob intrazelluläre Modifikationen, wie die Phosphorylierung von Tyrosinresten, zur Regulation des Ektodomänen-*Shedding* beitragen. Dies konnte in dieser Arbeit allerdings nicht nachgewiesen werden.

Die differentielle Regulation von Tim-3 durch ADAM10 und ADAM17 konnte auch in primären isolierten CD14⁺Monozyten nachgewiesen werden. Schließlich wurde das Endotoxin LPS als Stimulus der Proteolyse von endogenem Tim-3 durch ADAM10 und ADAM17 identifiziert. Dies ist ein Hinweis auf die physiologische Relevanz der beobachteten Spaltungsprozesse.

Weitere Untersuchungen zur Regulation der proteolytischen Spaltung und zur Funktion des löslichen Tim-3-Proteins sind notwendig. Außerdem sind *in vivo*-Studien wichtig, um die Relevanz des löslichen Proteins in murinen Krankheitsmodellen zu analysieren. Zu diesem Zweck wäre es vorteilhaft transgene Mäuse zu generieren, die das lösliche Tim-3-Protein exprimieren.

6. Summary

The human Tim-3, as a member of the T cell immunoglobulin and mucin-gene family, is expressed on cells of the adaptive and innate immune system. Originally, it was identified as a negative regulator of immune responses critically involved in the determination of effector T cell dependent immunity. Tim-3 expression on cells of the adaptive immune system is directly connected with its crucial role in the innate immune system and has an important function in regulating tumor growth and in immunity against infected macrophages to suppress bacterial growth.

The proteolytic release of the extracellular portion of a membrane bound protein by proteases is referred as ectodomain *shedding*. This process exerts diverse functions with various physiological consequences. The A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) gene family has been described to be one of the best characterized family of proteases.

In this study it has been shown that Tim-3 is a target of ADAM-mediated ectodomain *shedding* resulting in a soluble form of Tim-3. Tim-3 is differentially cleaved by the disintegrin-like metalloproteases ADAM10 and ADAM17, using the ADAM10 prodomain and inhibitors with defined potencies to differentially block cleavage of Tim-3 in HEK293 cells. This finding was supported by usage of ADAM10/ADAM17 deficient embryonic fibroblasts (MEFs). However, ADAM10 is involved in the enhanced *shedding* of Tim-3 induced by ionomycin, whereas PMA-inducible cleavage is mediated to large extent by ADAM17. Still, a minor role of other yet unidentified proteases cannot be excluded. PMA-induced *shedding* of Tim-3 was abrogated by the deletion of amino acids E181-D190 of the stalk region and Tim-3 lacking the whole intracellular domain was not efficiently cleaved after PMA-stimulation. Surprisingly, the addition of a single intracellular lysine residue was sufficient to rescue PMA-induced *shedding*.

Further experiments demonstrated that calmodulin interacts with Tim-3 and inhibition of CaM binding induces ADAM17-mediated *shedding* of Tim-3. It is likely that CaM binds to amino acids of the intracellular domain and transmembrane domain, thereby changing the conformation of the stalk region and reducing the accessibility for ADAM proteases.

The differential regulation of Tim-3 by ADAM10 and ADAM17 could be confirmed for endogenous Tim-3 in primary CD14⁺ monocytes from healthy subjects. Endogenous Tim-3 was also cleaved by ADAM10 and ADAM17 after PMA- or ionomycin- stimulation. Moreover, LPS-induced downregulation of Tim-3 was mainly due to ADAM10-mediated cleavage. This may indicate the physiological relevance of the observed *shedding* processes.

In conclusion, this work showed Tim-3 to be a novel target of ADAM-mediated ectodomain *shedding* and suggests a role of Tim-3 in TLR-mediated immune responses of CD14⁺ monocytes.

Further *in vivo* studies are necessary to investigate the role of soluble Tim-3 protein and its relevance in animal models of human diseases. For this purpose, it would be important to generate transgenic mice that express the soluble Tim-3 protein.

7. Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
- Allinson, T.M., E.T. Parkin, A.J. Turner, and N.M. Hooper. 2003. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74:342-352.
- Anderson, A.C., D.E. Anderson, L. Bregoli, W.D. Hastings, N. Kassam, C. Lei, R. Chandwaskar, J. Karman, E.W. Su, M. Hirashima, J.N. Bruce, L.P. Kane, V.K. Kuchroo, and D.A. Hafler. 2007. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science* 318:1141-1143.
- Arribas, J., and A. Borroto. 2002. Protein ectodomain shedding. *Chemical reviews* 102:4627-4638.
- Bailly, V., Z. Zhang, W. Meier, R. Cate, M. Sanicola, and J.V. Bonventre. 2002. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem* 277:39739-39748.
- Bandyopadhyay, S., D.M. Hartley, C.M. Cahill, D.K. Lahiri, N. Chattopadhyay, and J.T. Rogers. 2006. Interleukin-1alpha stimulates non-amyloidogenic pathway by alpha-secretase (ADAM-10 and ADAM-17) cleavage of APP in human astrocytic cells involving p38 MAP kinase. *J Neurosci Res* 84:106-118.
- Baran, P., R. Nitz, J. Grötzinger, J. Scheller, and C. Garbers. 2013. Minimal interleukin (IL-)6 receptor stalk composition for IL-6R shedding and IL-6 classic signaling. *J Biol Chem* doi:10.1074/jbc.M113.466169:
- Black, R.A., C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March, and D.P. Cerretti. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385:729-733.
- Blank, C., J. Kuball, S. Voelkl, H. Wiendl, B. Becker, B. Walter, O. Majdic, T.F. Gajewski, M. Theobald, R. Andreesen, and A. Mackensen. 2006. Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 119:317-327.

- Blaydon, D.C., P. Biancheri, W.L. Di, V. Plagnol, R.M. Cabral, M.A. Brooke, D.A. van Heel, F. Ruschendorf, M. Toynbee, A. Walne, E.A. O'Toole, J.E. Martin, K. Lindley, T. Vulliamy, D.J. Abrams, T.T. MacDonald, J.I. Harper, and D.P. Kelsell. 2011. Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. *N Engl J Med* 365:1502-1508.
- Blobel, C.P. 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6:32-43.
- Bone, R.C., R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, A.M. Fein, W.A. Knaus, R.M. Schein, and W.J. Sibbald. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101:1644-1655.
- Bonecchi, R., G. Bianchi, P.P. Bordignon, D. D'Ambrosio, R. Lang, A. Borsatti, S. Sozzani, P. Allavena, P.A. Gray, A. Mantovani, and F. Sinigaglia. 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187:129-134.
- Boni, C., P. Fisicaro, C. Valdatta, B. Amadei, P. Di Vincenzo, T. Giuberti, D. Laccabue, A. Zerbini, A. Cavalli, G. Missale, A. Bertoletti, and C. Ferrari. 2007. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *Journal of virology* 81:4215-4225.
- Brandl, K., L. Sun, C. Nepl, O.M. Siggs, S.M. Le Gall, W. Tomisato, X. Li, X. Du, D.N. Maennel, C.P. Blobel, and B. Beutler. 2010. MyD88 signaling in nonhematopoietic cells protects mice against induced colitis by regulating specific EGF receptor ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19967-19972.
- Brown, M.S., J. Ye, R.B. Rawson, and J.L. Goldstein. 2000. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100:391-398.
- Buxbaum, J.D., K.N. Liu, Y. Luo, J.L. Slack, K.L. Stocking, J.J. Peschon, R.S. Johnson, B.J. Castner, D.P. Cerretti, and R.A. Black. 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.
- Cabrera, N., E. Diaz-Rodriguez, E. Becker, D. Martin-Zanca, and A. Pandiella. 1996. TrkA receptor ectodomain cleavage generates a tyrosine-phosphorylated cell-associated fragment. *J Cell Biol* 132:427-436.
- Caescu, C.I., G.R. Jeschke, and B.E. Turk. 2009. Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem J* 424:79-88.
- Canobbio, I., S. Catricala, C. Balduini, and M. Torti. 2011. Calmodulin regulates the non-amyloidogenic metabolism of amyloid precursor protein in platelets. *Biochim Biophys Acta* 1813:500-506.

- Cao, E., X. Zang, U.A. Ramagopal, A. Mukhopadhaya, A. Fedorov, E. Fedorov, W.D. Zencheck, J.W. Lary, J.L. Cole, H. Deng, H. Xiao, T.P. Dilozenzo, J.P. Allison, S.G. Nathenson, and S.C. Almo. 2007. T cell immunoglobulin mucin-3 crystal structure reveals a galectin-9-independent ligand-binding surface. *Immunity* 26:311-321.
- Chantry, A., N.A. Gregson, and P. Glynn. 1989. A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 264:21603-21607.
- Cheng, J., T. Zhou, C. Liu, J.P. Shapiro, M.J. Brauer, M.C. Kiefer, P.J. Barr, and J.D. Mountz. 1994. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263:1759-1762.
- Chin, D., and A.R. Means. 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* 10:322-328.
- Cohen, J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420:885-891.
- Daum, G., A. Kalmes, B. Levkau, Y. Wang, M.G. Davies, and A.W. Clowes. 1998. Pervanadate inhibits mitogen-activated protein kinase kinase-1 in a p38MAPK-dependent manner. *FEBS Lett* 427:271-274.
- Day, C.L., D.E. Kaufmann, P. Kiepiela, J.A. Brown, E.S. Moodley, S. Reddy, E.W. Mackey, J.D. Miller, A.J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E.J. Wherry, H.M. Coovadia, P.J. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G.J. Freeman, and B.D. Walker. 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443:350-354.
- De Strooper, B., R. Vassar, and T. Golde. 2010. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nature reviews. Neurology* 6:99-107.
- DeKruyff, R.H., X. Bu, A. Ballesteros, C. Santiago, Y.L. Chim, H.H. Lee, P. Karisola, M. Pichavant, G.G. Kaplan, D.T. Umetsu, G.J. Freeman, and J.M. Casanovas. 2010. T cell/transmembrane, Ig, and mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol* 184:1918-1930.
- Diaz-Rodriguez, E., N. Cabrera, A. Esparis-Ogando, J.C. Montero, and A. Pandiella. 1999. Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms. *Eur J Neurosci* 11:1421-1430.
- Diaz-Rodriguez, E., J.C. Montero, A. Esparis-Ogando, L. Yuste, and A. Pandiella. 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.
- Dinarello, C.A. 1997. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 112:321s-329s.

- Doedens, J.R., and R.A. Black. 2000. Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem* 275:14598-14607.
- Estaquier, J., T. Idziorek, W. Zou, D. Emilie, C.M. Farber, J.M. Bourez, and J.C. Ameisen. 1995. T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95 (FAS/APO-1)-mediated apoptosis of CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Exp Med* 182:1759-1767.
- Fadok, V.A., D.R. Voelker, P.A. Campbell, J.J. Cohen, D.L. Bratton, and P.M. Henson. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148:2207-2216.
- Feigelstock, D., P. Thompson, P. Mattoo, Y. Zhang, and G.G. Kaplan. 1998. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *Journal of virology* 72:6621-6628.
- Fluhrer, R., A. Fukumori, L. Martin, G. Grammer, M. Haug-Kroper, B. Klier, E. Winkler, E. Kremmer, M.M. Condrón, D.B. Teplow, H. Steiner, and C. Haass. 2008. Intramembrane proteolysis of GXGD-type aspartyl proteases is slowed by a familial Alzheimer disease-like mutation. *J Biol Chem* 283:30121-30128.
- Freeman, G.J., J.M. Casasnovas, D.T. Umetsu, and R.H. DeKruyff. 2010. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 235:172-189.
- Gao, X., Y. Zhu, G. Li, H. Huang, G. Zhang, F. Wang, J. Sun, Q. Yang, X. Zhang, and B. Lu. 2012. TIM-3 expression characterizes regulatory T cells in tumor tissues and is associated with lung cancer progression. *PLoS One* 7:e30676.
- Garbers, C., N. Janner, A. Chalaris, M.L. Moss, D.M. Floss, D. Meyer, F. Koch-Nolte, S. Rose-John, and J. Scheller. 2011. Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *J Biol Chem* 286:14804-14811.
- Gifford, J.L., H. Ishida, and H.J. Vogel. 2012. Structural insights into calmodulin-regulated L-selectin ectodomain shedding. *J Biol Chem* 287:26513-26527.
- Gonzales, P.E., J.D. Galli, and M.E. Milla. 2008. Identification of key sequence determinants for the inhibitory function of the prodomain of TACE. *Biochemistry* 47:9911-9919.
- Gossert, A.D., S. Hiller, F. Fiorito, and K. Wuthrich. 2007. NMR assignment of the E. coli type 1 pilus protein FimF. *J Biomol NMR* 38:195.

- Guo, L., T. Takino, Y. Endo, T. Domoto, and H. Sato. 2012. Shedding of kidney injury molecule-1 by membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *J Biochem* 152:425-432.
- Han, W.K., A. Alinani, C.L. Wu, D. Michaelson, M. Loda, F.J. McGovern, R. Thadhani, and J.V. Bonventre. 2005. Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 16:1126-1134.
- Hansen, H.P., S. Dietrich, T. Kisseleva, T. Mokros, R. Mentlein, H.H. Lange, G. Murphy, and H. Lemke. 2000. CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme. *J Immunol* 165:6703-6709.
- Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, A. Lena Illert, K. von Figura, and P. Saftig. 2002a. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* 11:2615-2624.
- Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, A. Lena Illert, K. von Figura, and P. Saftig. 2002b. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Human molecular genetics* 11:2615-2624.
- Hayashida, K., A.H. Bartlett, Y. Chen, and P.W. Park. 2010. Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding. *Anat Rec (Hoboken)* 293:925-937.
- Hooper, N.M., E.H. Karran, and A.J. Turner. 1997. Membrane protein secretases. *Biochem J* 321 (Pt 2):265-279.
- Horiuchi, K., S. Le Gall, M. Schulte, T. Yamaguchi, K. Reiss, G. Murphy, Y. Toyama, D. Hartmann, P. Saftig, and C.P. Blobel. 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.
- Howard, L., X. Lu, S. Mitchell, S. Griffiths, and P. Glynn. 1996. Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem J* 317 (Pt 1):45-50.
- Hundhausen, C., D. Misztela, T.A. Berkhout, N. Broadway, P. Saftig, K. Reiss, D. Hartmann, F. Fahrenholz, R. Postina, V. Matthews, K.J. Kallen, S. Rose-John, and A. Ludwig. 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.
- Huovila, A.P., A.J. Turner, M. Peltto-Huikko, I. Karkkainen, and R.M. Ortiz. 2005. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci* 30:413-422.

- Huxley-Jones, J., T.K. Clarke, C. Beck, G. Toubaris, D.L. Robertson, and R.P. Boot-Handford. 2007. The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC evolutionary biology* 7:63.
- Ivetic, A., J. Deka, A. Ridley, and A. Ager. 2002. The cytoplasmic tail of L-selectin interacts with members of the Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) family of proteins: cell activation-dependent binding of Moesin but not Ezrin. *J Biol Chem* 277:2321-2329.
- Ivetic, A., O. Florey, J. Deka, D.O. Haskard, A. Ager, and A.J. Ridley. 2004. Mutagenesis of the ezrin-radixin-moesin binding domain of L-selectin tail affects shedding, microvillar positioning, and leukocyte tethering. *J Biol Chem* 279:33263-33272.
- Janes, P.W., N. Saha, W.A. Barton, M.V. Kolev, S.H. Wimmer-Kleikamp, E. Nievergall, C.P. Blobel, J.P. Himanen, M. Lackmann, and D.B. Nikolov. 2005. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* 123:291-304.
- Jayaraman, P., I. Sada-Ovalle, S. Beladi, A.C. Anderson, V. Dardalhon, C. Hotta, V.K. Kuchroo, and S.M. Behar. 2010. Tim3 binding to galectin-9 stimulates antimicrobial immunity. *J Exp Med* 207:2343-2354.
- Jeannin, P., G. Magistrelli, J.P. Aubry, G. Caron, J.F. Gauchat, T. Renno, N. Herbault, L. Goetsch, A. Blaecke, P.Y. Dietrich, J.Y. Bonnefoy, and Y. Delneste. 2000. Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human T lymphocytes. *Immunity* 13:303-312.
- Jin, H.T., A.C. Anderson, W.G. Tan, E.E. West, S.J. Ha, K. Araki, G.J. Freeman, V.K. Kuchroo, and R. Ahmed. 2010. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14733-14738.
- Jones, S.A., S. Horiuchi, N. Topley, N. Yamamoto, and G.M. Fuller. 2001. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *Faseb j* 15:43-58.
- Ju, Y., N. Hou, J. Meng, X. Wang, X. Zhang, D. Zhao, Y. Liu, F. Zhu, L. Zhang, W. Sun, X. Liang, L. Gao, and C. Ma. 2010. T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 (Tim-3) mediates natural killer cell suppression in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 52:322-329.
- Kahn, J., B. Walcheck, G.I. Migaki, M.A. Jutila, and T.K. Kishimoto. 1998. Calmodulin regulates L-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism. *Cell* 92:809-818.
- Kaplan, G., A. Totsuka, P. Thompson, T. Akatsuka, Y. Moritsugu, and S.M. Feinstone. 1996. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *Embo J* 15:4282-4296.

- Kobayashi, N., P. Karisola, V. Peña-Cruz, D.M. Dorfman, M. Jinushi, S.E. Umetsu, M.J. Butte, H. Nagumo, I. Chernova, B. Zhu, A.H. Sharpe, S. Ito, G. Dranoff, G.G. Kaplan, J.M. Casasnovas, D.T. Umetsu, R.H. Dekruyff, and G.J. Freeman. 2007. TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* 27:927-940.
- Koguchi, K., D.E. Anderson, L. Yang, K.C. O'Connor, V.K. Kuchroo, and D.A. Hafler. 2006. Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis. *J Exp Med* 203:1413-1418.
- Kopan, R., and M.X. Ilagan. 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137:216-233.
- Kuchroo, V.K., D.T. Umetsu, R.H. DeKruyff, and G.J. Freeman. 2003. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 3:454-462.
- Kumanogoh, A., S. Marukawa, K. Suzuki, N. Takegahara, C. Watanabe, E. Ch'ng, I. Ishida, H. Fujimura, S. Sakoda, K. Yoshida, and H. Kikutani. 2002. Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature* 419:629-633.
- Le Gall, S.M., P. Bobe, K. Reiss, K. Horiuchi, X.D. Niu, D. Lundell, D.R. Gibb, D. Conrad, P. Saftig, and C.P. Blobel. 2009. ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell* 20:1785-1794.
- Lee, J., E.W. Su, C. Zhu, S. Hainline, J. Phuah, J.A. Moroco, T.E. Smithgall, V.K. Kuchroo, and L.P. Kane. 2011. Phosphotyrosine-dependent coupling of Tim-3 to T-cell receptor signaling pathways. *Mol Cell Biol* 31:3963-3974.
- Leitner, J., A. Rieger, W.F. Pickl, G. Zlabinger, K. Grabmeier-Pfistershammer, and P. Steinberger. 2013. TIM-3 does not act as a receptor for galectin-9. *PLoS pathogens* 9:e1003253.
- Lim, A.I., L.Y. Chan, K.N. Lai, S.C. Tang, C.W. Chow, M.F. Lam, and J.C. Leung. 2012a. Distinct role of matrix metalloproteinase-3 in kidney injury molecule-1 shedding by kidney proximal tubular epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 44:1040-1050.
- Lim, A.I., L.Y. Chan, K.N. Lai, S.C. Tang, C.W. Chow, M.F. Lam, J.C. Leung, C. Chronic activation of DNA damage signals causes tumor immune evasion in the chemoresistant niche. In *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 Elsevier Ltd, Netherlands England. 1040-1050.

- Ludwig, A., C. Hundhausen, M.H. Lambert, N. Broadway, R.C. Andrews, D.M. Bickett, M.A. Leesnitzer, and J.D. Becherer. 2005. Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen* 8:161-171.
- Marcello, E., F. Gardoni, D. Mauceri, S. Romorini, A. Jeromin, R. Epis, B. Borroni, F. Cattabeni, C. Sala, A. Padovani, and M. Di Luca. 2007. Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity. *J Neurosci* 27:1682-1691.
- Matala, E., S.R. Alexander, T.K. Kishimoto, and B. Walcheck. 2001. The cytoplasmic domain of L-selectin participates in regulating L-selectin endoproteolysis. *J Immunol* 167:1617-1623.
- Matthews, V., B. Schuster, S. Schutze, I. Bussmeyer, A. Ludwig, C. Hundhausen, T. Sadowski, P. Saftig, D. Hartmann, K.J. Kallen, and S. Rose-John. 2003. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem* 278:38829-38839.
- McIntire, J.J., D.T. Umetsu, and R.H. DeKruyff. 2004. TIM-1, a novel allergy and asthma susceptibility gene. *Springer Semin Immunopathol* 25:335-348.
- McIntire, J.J., S.E. Umetsu, O. Akbari, M. Potter, V.K. Kuchroo, G.S. Barsh, G.J. Freeman, D.T. Umetsu, and R.H. DeKruyff. 2001. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol* 2:1109-1116.
- Miltenyi, S., W. Muller, W. Weichel, and A. Radbruch. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231-238.
- Miyanishi, M., K. Tada, M. Koike, Y. Uchiyama, T. Kitamura, and S. Nagata. 2007. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450:435-439.
- Monney, L., C.A. Sabatos, J.L. Gaglia, A. Ryu, H. Waldner, T. Chernova, S. Manning, E.A. Greenfield, A.J. Coyle, R.A. Sobel, G.J. Freeman, and V.K. Kuchroo. 2002. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 415:536-541.
- Moreira-Tabaka, H., J. Peluso, J.L. Vonesch, D. Hentsch, P. Kessler, J.M. Reimund, S. Dumont, and C.D. Muller. 2012. Unlike for human monocytes after LPS activation, release of TNF-alpha by THP-1 cells is produced by a TACE catalytically different from constitutive TACE. *PLoS One* 7:e34184.
- Moss, M.L., M. Bomar, Q. Liu, H. Sage, P. Dempsey, P.M. Lenhart, P.A. Gillispie, A. Stoeck, D. Wildeboer, J.W. Bartsch, R. Palmisano, and P. Zhou. 2007. The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J Biol Chem* 282:35712-35721.

- Mou, P., Z. Zeng, Q. Li, X. Liu, X. Xin, K.M. Wannemacher, C. Ruan, R. Li, L.F. Brass, and L. Zhu. 2013. Identification of a calmodulin-binding domain in Sema4D that regulates its exodomain shedding in platelets. *Blood* 121:4221-4230.
- Müllberg, J., T. Geib, T. Jostock, S.H. Hoischen, P. Vollmer, N. Voltz, D. Heinz, P.R. Galle, M. Klouche, and S. Rose-John. 2000. IL-6 receptor independent stimulation of human gp130 by viral IL-6. *J Immunol* 164:4672-4677.
- Müllberg, J., W. Oberthur, F. Lottspeich, E. Mehl, E. Dittrich, L. Graeve, P.C. Heinrich, and S. Rose-John. 1994. The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J Immunol* 152:4958-4968.
- Müllberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, P.C. Heinrich, and S. Rose-John. 1992. Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 189:794-800.
- Muraguchi, T., Y. Takegami, T. Ohtsuka, S. Kitajima, E.P. Chandana, A. Omura, T. Miki, R. Takahashi, N. Matsumoto, A. Ludwig, M. Noda, and C. Takahashi. 2007. RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. *Nature neuroscience* 10:838-845.
- Murphy, G. 2009. Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the 'Sheddases'. *Semin Cell Dev Biol* 20:138-145.
- Nagae, M., N. Nishi, T. Murata, T. Usui, T. Nakamura, S. Wakatsuki, and R. Kato. 2009. Structural analysis of the recognition mechanism of poly-N-acetyllactosamine by the human galectin-9 N-terminal carbohydrate recognition domain. *Glycobiology* 19:112-117.
- Nagano, O., D. Murakami, D. Hartmann, B. De Strooper, P. Saftig, T. Iwatsubo, M. Nakajima, M. Shinohara, and H. Saya. 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.
- O'Neil, K.T., and W.F. DeGrado. 1990. How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices. *Trends Biochem Sci* 15:59-64.
- Oaks, M.K., and K.M. Hallett. 2000. Cutting edge: a soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease. *J Immunol* 164:5015-5018.
- Pan, D., and G.M. Rubin. 1997. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90:271-280.
- Pang, S., A.J. Chubb, S.L. Schwager, M.R. Ehlers, E.D. Sturrock, and N.M. Hooper. 2001. Roles of the juxtamembrane and extracellular domains of angiotensin-converting enzyme in ectodomain shedding. *Biochem J* 358:185-192.

- Peschon, J.J., J.L. Slack, P. Reddy, K.L. Stocking, S.W. Sunnarborg, D.C. Lee, W.E. Russell, B.J. Castner, R.S. Johnson, J.N. Fitzner, R.W. Boyce, N. Nelson, C.J. Kozlosky, M.F. Wolfson, C.T. Rauch, D.P. Cerretti, R.J. Paxton, C.J. March, and R.A. Black. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282:1281-1284.
- Postina, R., A. Schroeder, I. Dewachter, J. Bohl, U. Schmitt, E. Kojro, C. Prinzen, K. Endres, C. Hiemke, M. Blessing, P. Flamez, A. Dequenne, E. Godaux, F. van Leuven, and F. Fahrenholz. 2004. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113:1456-1464.
- Radbruch, A., B. Mechtold, A. Thiel, S. Miltenyi, and E. Pfluger. 1994. High-gradient magnetic cell sorting. *Methods Cell Biol* 42 Pt B:387-403.
- Reddy, P., J.L. Slack, R. Davis, D.P. Cerretti, C.J. Kozlosky, R.A. Blanton, D. Shows, J.J. Peschon, and R.A. Black. 2000. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem* 275:14608-14614.
- Reiss, K., T. Maretzky, I.G. Haas, M. Schulte, A. Ludwig, M. Frank, and P. Saftig. 2006. Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gamma-protocadherin C3 modulates cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 281:21735-21744.
- Reiss, K., T. Maretzky, A. Ludwig, T. Tousseyn, B. de Strooper, D. Hartmann, and P. Saftig. 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *Embo J* 24:742-752.
- Robertshaw, H.J., and F.M. Brennan. 2005. Release of tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) by TNFalpha cleaving enzyme (TACE) in response to septic stimuli in vitro. *Br J Anaesth* 94:222-228.
- Rodriguez-Manzanet, R., R. DeKruyff, V.K. Kuchroo, and D.T. Umetsu. 2009. The costimulatory role of TIM molecules. *Immunol Rev* 229:259-270.
- Rose-John, S., and P.C. Heinrich. 1994. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* 300 (Pt 2):281-290.
- Sabatos, C.A., S. Chakravarti, E. Cha, A. Schubart, A. Sanchez-Fueyo, X.X. Zheng, A.J. Coyle, T.B. Strom, G.J. Freeman, and V.K. Kuchroo. 2003. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat Immunol* 4:1102-1110.
- Saftig, P., C. Peters, K. von Figura, K. Craessaerts, F. Van Leuven, and B. De Strooper. 1996. Amyloidogenic processing of human amyloid precursor protein in hippocampal neurons devoid of cathepsin D. *J Biol Chem* 271:27241-27244.
- Sahin, U., G. Weskamp, K. Kelly, H.M. Zhou, S. Higashiyama, J. Peschon, D. Hartmann, P. Saftig, and C.P. Blobel. 2004. Distinct roles for ADAM10 and

- ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* 164:769-779.
- Sanchez-Fueyo, A., J. Tian, D. Picarella, C. Domenig, X.X. Zheng, C.A. Sabatos, N. Manlongat, O. Bender, T. Kamradt, V.K. Kuchroo, J.C. Gutierrez-Ramos, A.J. Coyle, and T.B. Strom. 2003. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance In *Nat Immunol*. United States England. 1093-1101.
- Sanderson, M.P., S.N. Erickson, P.J. Gough, K.J. Garton, P.T. Wille, E.W. Raines, A.J. Dunbar, and P.J. Dempsey. 2005. ADAM10 mediates ectodomain shedding of the betacellulin precursor activated by p-aminophenylmercuric acetate and extracellular calcium influx. *J Biol Chem* 280:1826-1837.
- Santiago, C., A. Ballesteros, L. Martinez-Munoz, M. Mellado, G.G. Kaplan, G.J. Freeman, and J.M. Casasnovas. 2007. Structures of T cell immunoglobulin mucin protein 4 show a metal-Ion-dependent ligand binding site where phosphatidylserine binds. *Immunity* 27:941-951.
- Savill, J., I. Dransfield, C. Gregory, and C. Haslett. 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature reviews. Immunology* 2:965-975.
- Schafer, B., A. Gschwind, and A. Ullrich. 2004. Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene* 23:991-999.
- Scheller, J., A. Chalaris, C. Garbers, and S. Rose-John. 2011a. ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol* 32:380-387.
- Schindler, R., J. Mancilla, S. Endres, R. Ghorbani, S.C. Clark, and C.A. Dinarello. 1990. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75:40-47.
- Schlondorff, J., and C.P. Blobel. 1999. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *Journal of cell science* 112 (Pt 21):3603-3617.
- Schulte, W., J. Bernhagen, and R. Bucala. 2013. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets-an updated view. *Mediators Inflamm* 2013:165974.
- Seals, D.F., and S.A. Courtneidge. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & development* 17:7-30.
- Smalley, D.M., and K. Ley. 2005. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *Journal of cellular and molecular medicine* 9:255-266.

- Solanas, G., C. Cortina, M. Sevillano, and E. Batlle. 2011. Cleavage of E-cadherin by ADAM10 mediates epithelial cell sorting downstream of EphB signalling. *Nature cell biology* 13:1100-1107.
- Song, W.C. 2012. Crosstalk between complement and toll-like receptors. *Toxicol Pathol* 40:174-182.
- Soond, S.M., B. Everson, D.W. Riches, and G. Murphy. 2005. ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF α -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci* 118:2371-2380.
- Steensberg, A., C.P. Fischer, C. Keller, K. Moller, and B.K. Pedersen. 2003. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E433-437.
- Su, E.W., J.Y. Lin, and L.P. Kane. 2008. TIM-1 and TIM-3 proteins in immune regulation. *Cytokine* 44:9-13.
- Tachida, Y., K. Nakagawa, T. Saito, T.C. Saido, T. Honda, Y. Saito, S. Murayama, T. Endo, G. Sakaguchi, A. Kato, S. Kitazume, and Y. Hashimoto. 2008. Interleukin-1 beta up-regulates TACE to enhance alpha-cleavage of APP in neurons: resulting decrease in A β production. *J Neurochem* 104:1387-1393.
- Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.
- Tang, P., M.C. Hung, and J. Klostergaard. 1996. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 35:8216-8225.
- Umetsu, S.E., W.L. Lee, J.J. McIntire, L. Downey, B. Sanjanwala, O. Akbari, G.J. Berry, H. Nagumo, G.J. Freeman, D.T. Umetsu, and R.H. DeKruyff. 2005. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat Immunol* 6:447-454.
- Urbani, S., B. Amadei, D. Tola, M. Massari, S. Schivazappa, G. Missale, and C. Ferrari. 2006. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *Journal of virology* 80:11398-11403.
- van de Weyer, P.S., M. Muehlfeit, C. Klose, J.V. Bonventre, G. Walz, and E.W. Kuehn. 2006. A highly conserved tyrosine of Tim-3 is phosphorylated upon stimulation by its ligand galectin-9. *Biochem Biophys Res Commun* 351:571-576.
- Vecchi, M., L.A. Rudolph-Owen, C.L. Brown, P.J. Dempsey, and G. Carpenter. 1998. Tyrosine phosphorylation and proteolysis. Pervanadate-induced, metalloprotease-dependent cleavage of the ErbB-4 receptor and amphiregulin. *J Biol Chem* 273:20589-20595.

- Verhoven, B., R.A. Schlegel, and P. Williamson. 1995. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med* 182:1597-1601.
- Vincent, J.L., S.M. Opal, J.C. Marshall, and K.J. Tracey. 2013. Sepsis definitions: time for change. *Lancet* 381:774-775.
- Wada, J., Y.S. Kanwar, R.A. Black, C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, and P. Reddy. 1997. Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *J Biol Chem* 272:6078-6086.
- Warrens, A.N., M.D. Jones, and R.I. Lechler. 1997. Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene* 186:29-35.
- Weber, S., M.T. Niessen, J. Prox, R. Lullmann-Rauch, A. Schmitz, R. Schwanbeck, C.P. Blobel, E. Jorissen, B. de Strooper, C.M. Niessen, and P. Saftig. 2011. The disintegrin/metalloproteinase Adam10 is essential for epidermal integrity and Notch-mediated signaling. *Development* 138:495-505.
- Weber, S., and P. Saftig. 2012. Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development* 139:3693-3709.
- Wedepohl, S., F. Beceren-Braun, S. Riese, K. Buscher, S. Enders, G. Bernhard, K. Kilian, V. Blanchard, J. Dervedde, and R. Tauber. 2012. L-selectin--a dynamic regulator of leukocyte migration. *Eur J Cell Biol* 91:257-264.
- Xia, W., and M.S. Wolfe. 2003. Intramembrane proteolysis by presenilin and presenilin-like proteases. *Journal of cell science* 116:2839-2844.
- Xu, P., and R. Derynck. 2010. Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Mol Cell* 37:551-566.
- Zhang, Y., C.J. Ma, J.M. Wang, X.J. Ji, X.Y. Wu, J.P. Moorman, and Z.Q. Yao. 2012. Tim-3 regulates pro- and anti-inflammatory cytokine expression in human CD14+ monocytes. *J Leukoc Biol* 91:189-196.
- Zhang, Z., B.D. Humphreys, and J.V. Bonventre. 2007. Shedding of the urinary biomarker kidney injury molecule-1 (KIM-1) is regulated by MAP kinases and juxtamembrane region. *J Am Soc Nephrol* 18:2704-2714.
- Zhao, L., M. Shey, M. Farnsworth, and M.O. Dailey. 2001. Regulation of membrane metalloproteolytic cleavage of L-selectin (CD62l) by the epidermal growth factor domain. *J Biol Chem* 276:30631-30640.
- Zhu, C., A.C. Anderson, A. Schubart, H. Xiong, J. Imitola, S.J. Khoury, X.X. Zheng, T.B. Strom, and V.K. Kuchroo. 2005. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 6:1245-1252.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dendrogramm der Sequenzähnlichkeit der Tim-Genfamilie basierend auf Sequenz-Alignments.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Tim-Proteinstruktur.	4
Abbildung 3: Model der Tim-3-Funtionen bei der Regulation von Immunantworten.	10
Abbildung 4: Modularer Aufbau der ADAM-Proteasefamilie.	12
Abbildung 5: Prinzip der SOE-PCR.....	30
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Blot-Aufbaus beim <i>Tank</i> -Blotting Verfahren.	36
Abbildung 7: Mechanismus für die chemische Umsetzung von pNPP durch die alkalische Phosphatase und die Entstehung eines fluoreszierenden Produktes.....	38
Abbildung 8: Isolierung von PBMCs mittels Ficoll™ Dichtegradientenzentrifugation.....	42
Abbildung 9: Magnetisch aktivierte Zellseparation.	42
Abbildung 10: Generierung des Expressionsplasmids für die rekombinante IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins.....	44
Abbildung 11: Expression der IgV-Domäne des humanen Tim-3 in <i>E.coli</i> BL21 nach der Induktion mittels IPTG.	45
Abbildung 12: SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der Proteinfractionen der in <i>E.coli</i> BL21 hergestellten IgV-Domäne des humanen Tim-3-Protein nach der Separation mittels Superdex75 16/60-Säule.	46
Abbildung 13: Immunochemischer Nachweis des humanen Tim-3 mit monoklonalen Antikörpern produziert von Hybridomaklonen	47
Abbildung 14: Reinigung der monoklonalen Antikörper gegen die IgV-Domäne des humanen Tim-3-Proteins.	48
Abbildung 15: Generierung der Expressionsplasmide pcDNA3.1-hTim-3 und pcDNA3.1-AP-hTim-3.	50
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Generierung von Deletionsmutanten mittels <i>Splicing by overlapping Extension</i> PCR (SOE-PCR).	51
Abbildung 17: Analyse des Ionomycin- und PMA-induzierten <i>Sheddings</i> des humanen Tim-3 durch ADAM-Metalloproteasen.	52
Abbildung 18: Analyse des Ionomycin- und PMA-induzierten <i>Sheddings</i> des humanen Tim-3 durch ADAM10.	53
Abbildung 19: Analyse des Ionomycin- und PMA-induzierten <i>Sheddings</i> des humanen Tim-3-Proteins und der Einfluss der Alkalischen Phosphatase.....	54
Abbildung 20: Analyse des <i>Sheddings</i> in Wildtyp (wt)-MEFs, sowie in MEFs, die defizient für ADAM10 (A10 ^{-/-}), ADAM17(A17 ^{-/-}) oder für ADAM10 und ADAM17 (A10 ^{-/-} A17 ^{-/-}) sind.	56

Abbildung 21: Generierung und Zelloberflächenexpression der Tim-3-Deletionsmutanten Tim-3 Δ S1 bis Tim-3 Δ S3.	57
Abbildung 22: PMA-induziertes <i>Shedding</i> von Tim-3 konnte durch die Deletion von 10 Aminosäuren in der Mucin-Domäne reduziert werden.	59
Abbildung 23: Generierung von Expressionsplasmiden für das humane Tim-3 ohne intrazelluläre Domäne (Tim-3 Δ ICD und Tim-3 Δ ICD+1) und intrazelluläre Deletionsmutanten (Tim-3 Δ I1 bis AP-Tim-3 Δ I5).	60
Abbildung 24: Oberflächenexpression des AP-Tim-3 Δ ICD-Fusionsprotein in HEK293-Zellen transfizierten Zellen.	61
Abbildung 25: PMA-induziertes <i>Shedding</i> des Tim-3-Proteins konnte durch die Deletion der intrazellulären Domäne inhibiert werden.	62
Abbildung 26: PMA-induziertes <i>Shedding</i> von Tim-3 konnte nicht durch die Deletion von unterschiedlichen Aminosäuresequenzen in der intrazellulären Domäne inhibiert werden.	64
Abbildung 27: PMA-induziertes <i>Shedding</i> von Tim-3 konnte durch Addition der ersten Aminosäure der intrazellulären Domäne (K225) erreicht werden. ...	65
Abbildung 28: Die Proteolyse von Tim-3 wird durch Calmodulin (CaM) reguliert. ...	67
Abbildung 29: W7-induziertes <i>Shedding</i> von Tim-3 konnte durch die Deletion der intrazellulären Domäne inhibiert werden.	69
Abbildung 30: Calmodulin bindet an Tim-3.	70
Abbildung 31: Expression des endogenen Tim-3 auf humanen primären CD14 ⁺ Monozyten nach PMA- und Ionomycin-Stimulierung.	72
Abbildung 32: Expression des endogenen Tim-3 auf humanen primären CD14 ⁺ Monozyten nach <i>Toll-like</i> Rezeptor (TLR)-Aktivierung.	74
Abbildung 33: Konzentration der sezernierten Zytokine IL-6, TNF α und IL-12 durch primäre CD14 ⁺ Monozyten nach <i>Toll-like</i> Rezeptor (TLR)-Aktivierung. ...	75
Abbildung 34: Die Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von Tim-3 führt zur Aktivierung von T-Zellen.	83
Abbildung 35: Putative Aktivierungsmechanismen für Tim-3.	84
Abbildung 36: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-hTim-3 ohne Tags.	115
Abbildung 37: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-hTim-3 Δ S1 ohne Tags.	116
Abbildung 38: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-hTim-3 Δ S2 ohne Tags.	117
Abbildung 39: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-hTim-3 Δ S3 ohne Tags.	118
Abbildung 40: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-hTim-3 Δ ICD ohne Tags.	119

Abbildung 41: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3.....	120
Abbildung 42: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3 Δ S1.....	121
Abbildung 43: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3 Δ S2.....	122
Abbildung 44: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3 Δ S3.....	123
Abbildung 45: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3 Δ ICD.....	124
Abbildung 46: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3 Δ I1.....	125
Abbildung 47: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3 Δ I2.....	126
Abbildung 48: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3 Δ I3.....	127
Abbildung 49: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3 Δ I4.....	128
Abbildung 50: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3 Δ I5.....	129
Abbildung 51: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3 Δ ICD+1.....	130
Abbildung 52: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pet23a(+)-hTim-3-IgV.....	131

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide 27

7.4 Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
APC	<i>Antigen presenting cells</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary Deoxy-ribonucleic acid</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i>
fl	<i>full-lenght</i>
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	human bzw. Stunde
HRP	<i>Horseradish-Peroxidase</i>
ICD	intrazelluläre Domäne
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobase

kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
m	murin
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MMP	Matrix Metalloproteinases
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mg	Milligramm
mM	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
μl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phytoerythrin
pg	Pikogramm
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotation pro Minute
s	Sekunde bzw. <i>soluble</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	<i>Units</i>

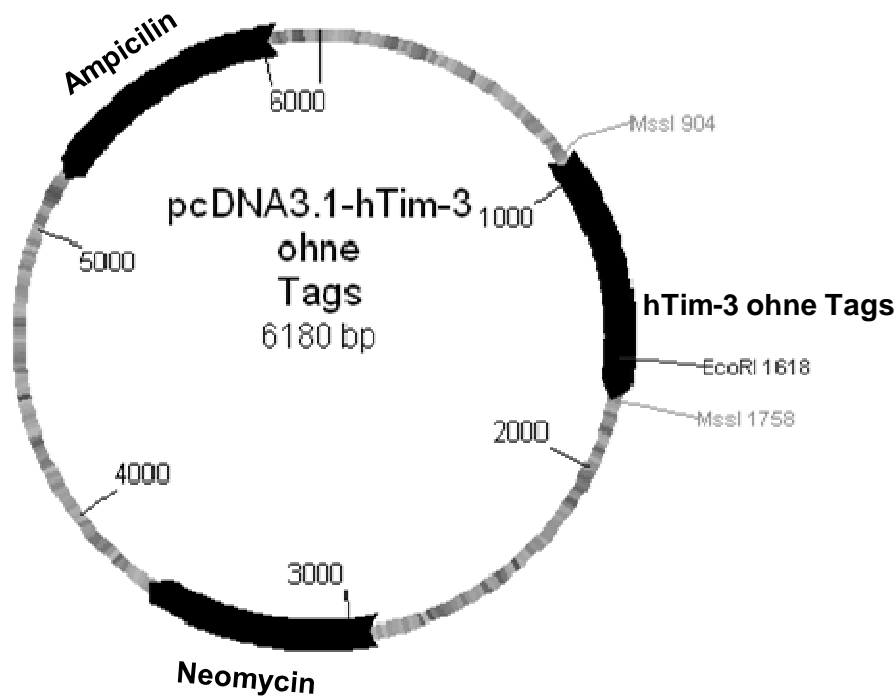
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/V	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp

Aminosäuren

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

7.5 Plasmidkarten

pcDNA3.1-hTim-3 ohne Tags



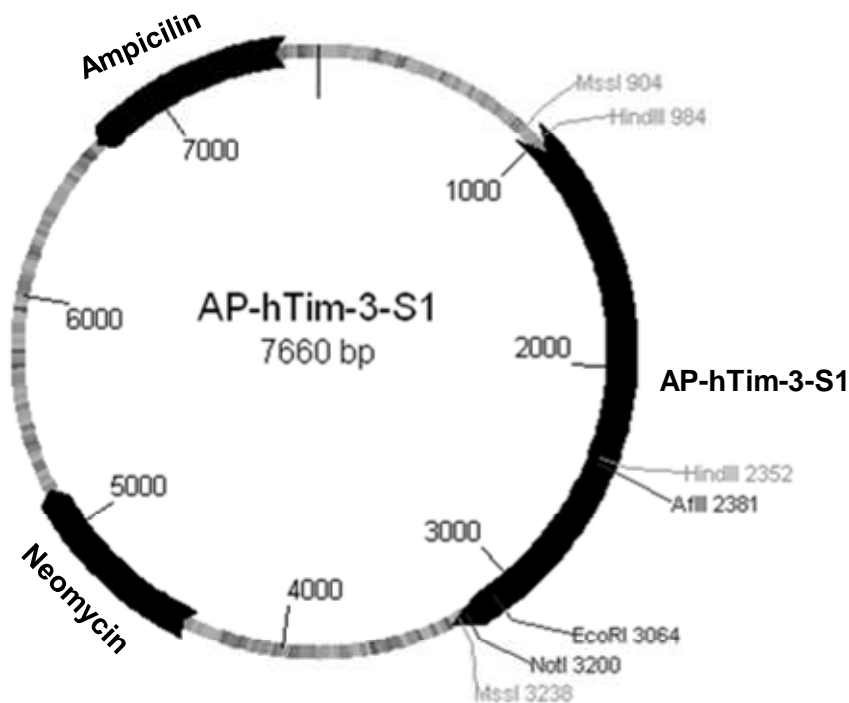
```

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKLKSEVEYRAEVLGQNAAYLPCFYTPAAPGN
LVPVCWGKGACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTI
ENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVKPAKVTPAPTRQRDF'TAA
FPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGA
TIRIGIYIGAGICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPP
SGLANAVAEGIRSEENIYTIENVYEVEEPNEYCYVSSRQ QPSQPLGC
RFAMP*

```

Abbildung 36: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-hTim-3 ohne Tags. Die graphische Darstellung aller Plasmidkarten erfolgte mit GENTle1.9.4 (Magnus Manske, Universität Köln).

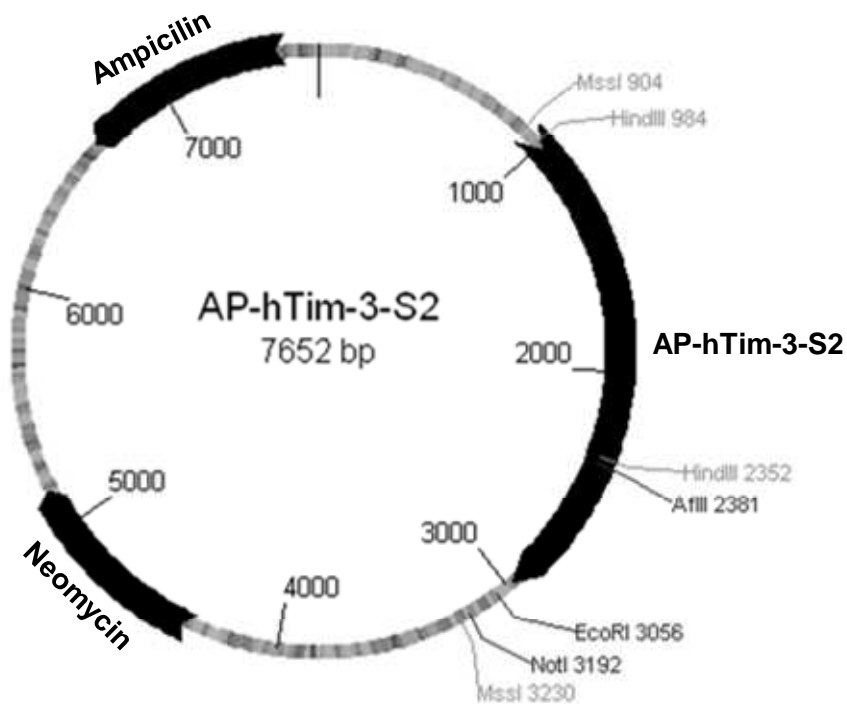
pcDNA3.1-hTim-3ΔS1 ohne Tags



METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKLSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNL
 VPVCWKGKACPVFECGNVLRDTERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTIE
 NVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNLKLVIKPAKVTPAPTRQRDFTAAF
 PRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDGIYIGAG
 ICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPPSGLANAVAEGI
 RSEENIYTIENVEVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP*

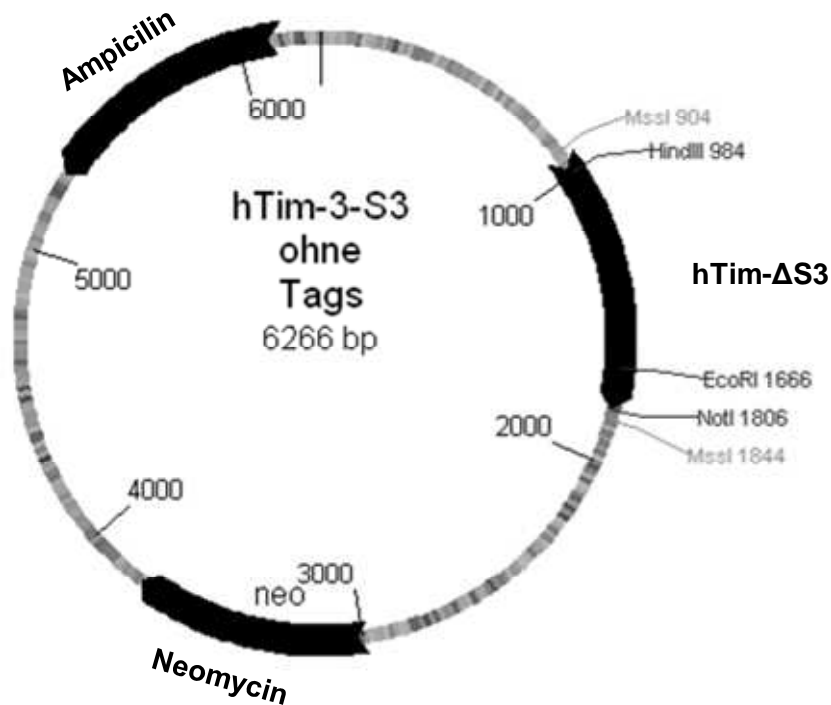
Abbildung 37: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-hTim-3ΔS1 ohne Tags.

pcDNA3.1-hTim-3ΔS2 ohne Tags



METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKLSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNL
 VPVCWGKGACPVFECGNVLRTERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTIE
 NVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNLKLVKPAKVTPAPTRQRDF'TAAF
 PRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANLRD SGATIRIGIYIGAG
 ICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPPSGLANAVAEGI
 RSEENIYTI EENVYEVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP*

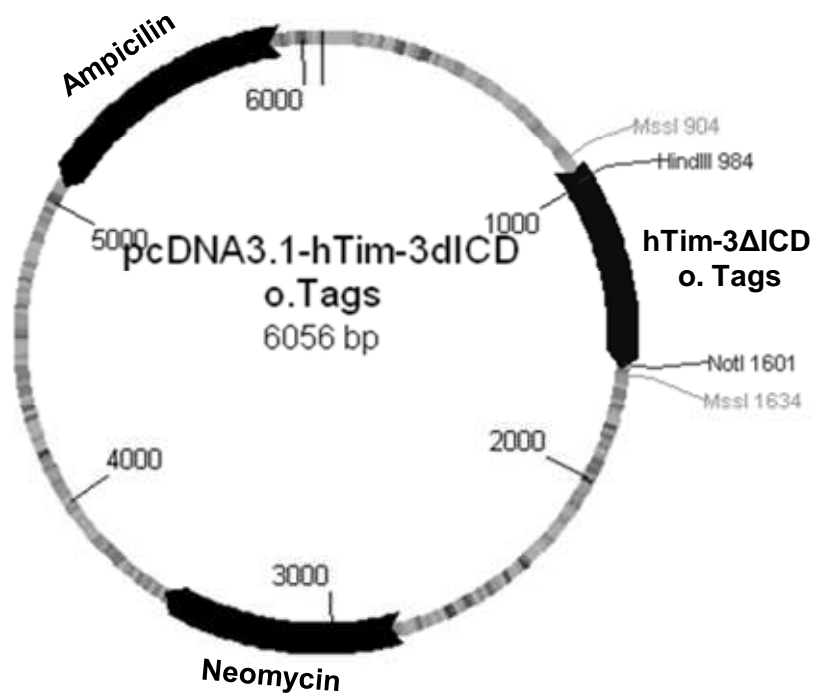
Abbildung 38: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-hTim-3ΔS2 ohne Tags.

pcDNA3.1-hTim-3 Δ S3 ohne Tags

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKLSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNL
 VPVCWGGKACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTIE
 NVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNLKLVKPAKVTPAPTRQRDFTAAF
 PRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDIELRDSRLANDLRDSGATIRIGIYIGAG
 ICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPPSGLANAVAEGI
 RSEENIYTI EENVYEVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP*

Abbildung 39: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-hTim-3 Δ S3 ohne Tags.

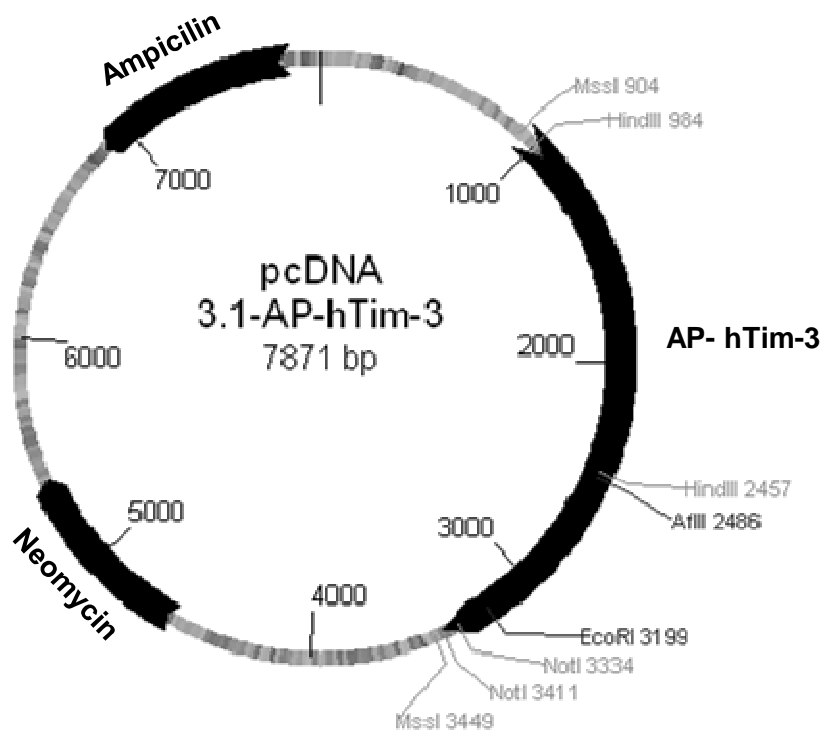
pcDNA3.1-hTim-3ΔICD ohne Tags



METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKLSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNL
 VPVCWGKGACPVFECGNVLRDTERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTIE
 NVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKPAKVTPAPTRQRDF'TAAF
 PRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGAT
 IRIGIYIGAGICAGLALALIFGALILRGR*

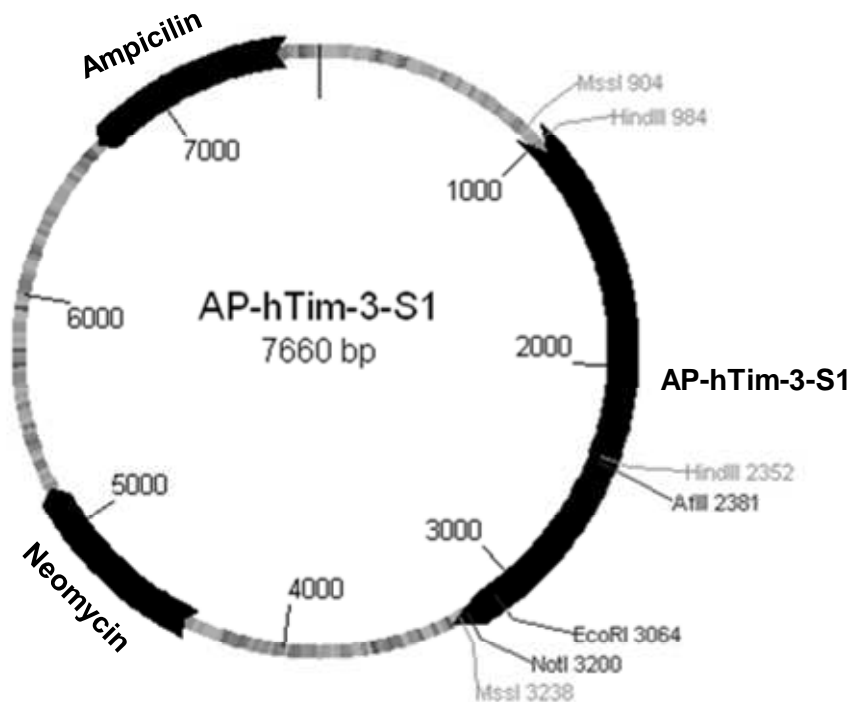
Abbildung 40: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-hTim-3ΔICD ohne Tags.

pcDNA3.1-AP-hTim-3



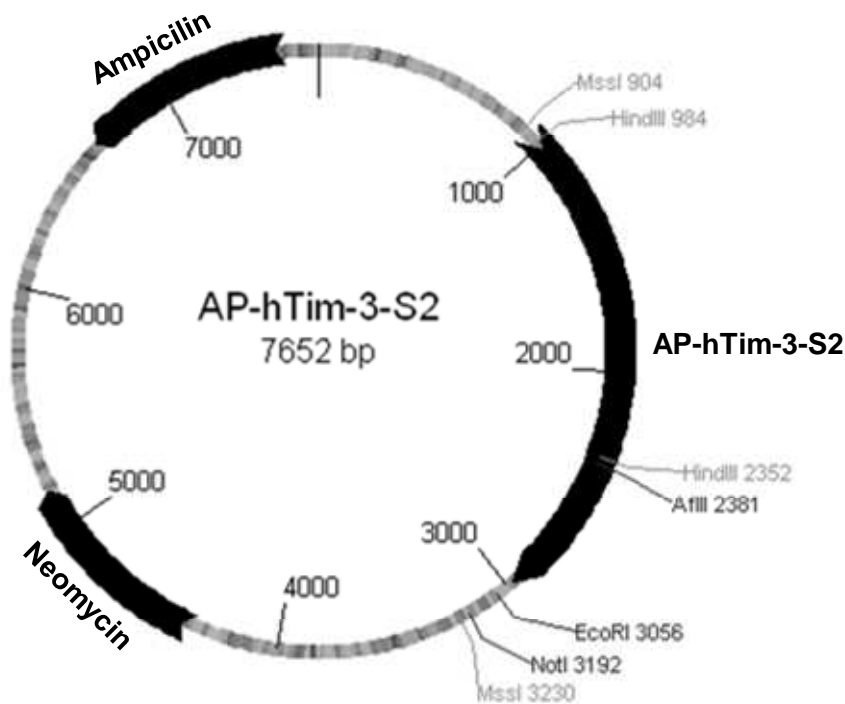
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKLIIPVEEENPDFWNREAAEALGAAKKLQ
 PAQTAAKNLIIFLGDGMGVSTVTAARILKGQKKDKLGPEIPLAMDRFPYV
 ALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTIGLSAAARFNQCNTTRGN
 EVISVMNRAKKAGKSVGVTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADVPAS
 ARQEGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPPDDYSQGGTR
 LDGKNLVQEWLAKRQGARVWNRTELMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYE
 IHRDSTLDP SLMEMTEAALRLLSRNPRGFFLFVEGGRIDHGHESRAYRA
 LTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLSLVTADHSHVFSFGGYPLRGSSIFGL
 APGKARDRKAYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYRQQSAVPL
 DEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFAHVMAFAACLEPYTACDLA
 PPAGTTDAAHPGKLDYKDDDDKLGSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGN
 LVPVCWGKGACPVFECGNVLRTERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTI
 ENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKPAKVTPAPTRQRDF'TAA
 FPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGA
 TIRIGIYIGAGICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPP
 SGLANAVAEGIRSEENIYTIENVEVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCR
 FAMPAAAEQKLI SEEDLNGAVEHHHHHH*

Abbildung 41: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3.

pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔS1

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKLIIFLGDGMGVSTVTAARILKGQKKDKL
 GPEIPLAMDRFPYVALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTIGLS
 AAARFNQCNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSVGVTTRVQHASPAGTYAHT
 VNRNWYSADVPASARQEGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTP
 DPEYPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAKRQGARYVWNRTELMQASLDPSVT
 HLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDP SLMEMTEAALRLLSRNPRGFFLFVEGG
 RIDHGHHESTRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLSLVTADHSHVFS
 FGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESE
 SGSPEYRQQSAVPLDEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQT FIAHVMA
 FAACLEPYTACDLAPPAGTTDAAHPGRKLDYKDDDDKLGSEVEYRAEVGQ
 NAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWKGACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRY
 WLNDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVKPA
 KVTPAPTRQRDFTAAPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANE
 LRDSRLANDGIYIGAGICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISL
 ANLPPSGLANAVAEGIRSEENIYTIENVEVEEPNEYCYVSSRQQPSQ
 PLGCRFAMPGGRTSSSSSLRYRLNPLISLDCAF*

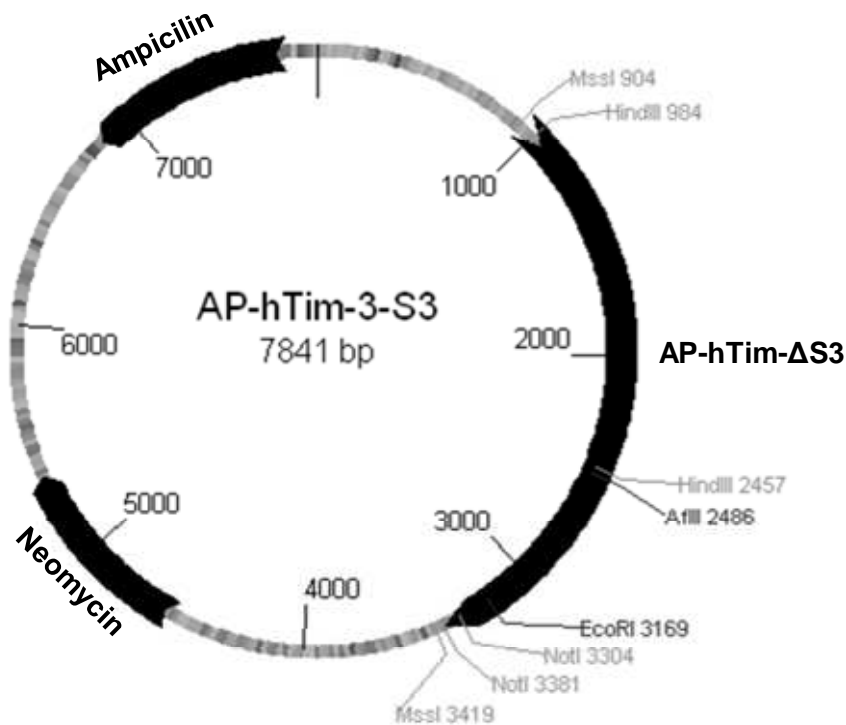
Abbildung 42: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔS1.

pcDNA3.1-AP-hTim-3 Δ S2

METDTLLLLWVLLLWVPGSTGDKLIIFLGDGMGVSTVTAARILKGQKKDKL
 GPEIPLAMDRFPYVALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTIGLS
 AAARFNQCNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHT
 VNRNWYSDADVPASARQEGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTP
 DPEYPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAKRQGARYVWNRTELMQASLDPSVT
 HLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDPSLMEMTEAALRLLSRNPRGFFLVEGG
 RIDHGHESRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTLSLVTADHSHVFS
 FGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESE
 SGSPEYRQQSAVPLDEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFAHVMA
 FAACLEPYTACDLAPPAGTTDAAHPGRKLDYKDDDDKLGSEVEYRAEVGQ
 NAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWKGKACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRY
 WLNDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNLKLVIKPA
 KVTAPATRQRDFTAAPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANV
 TGLWSNRHLHRSRDLWCWAGSGSYLRRFNFQMVFS*

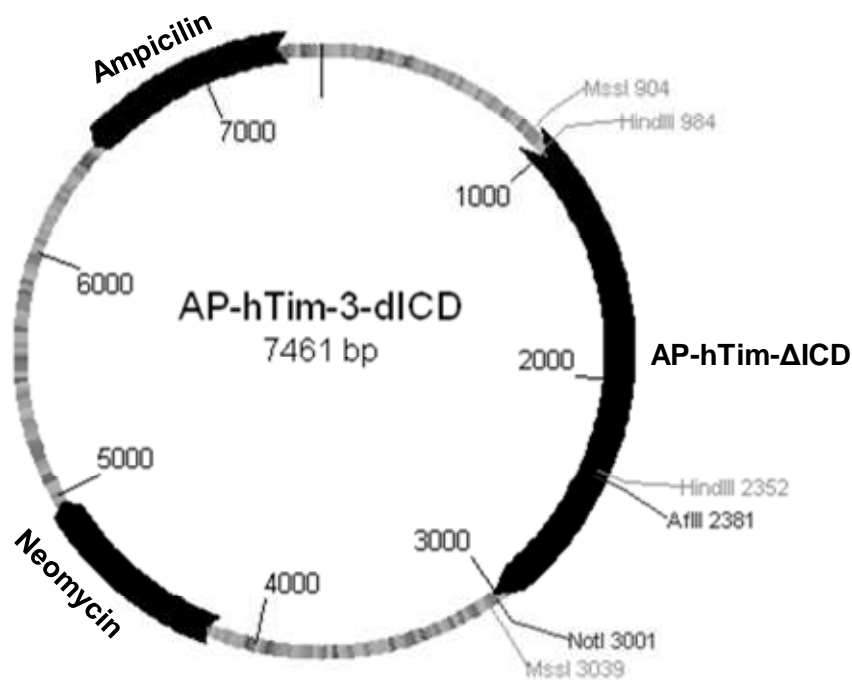
Abbildung 43: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3 Δ S2.

pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔS3



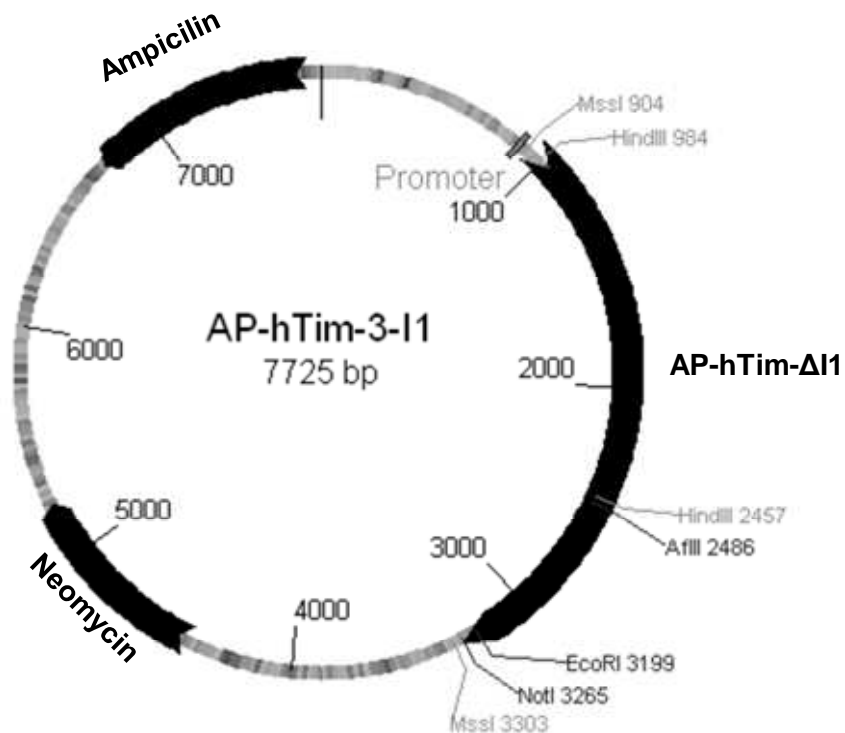
METDTLLLLWVLLLVWVPGSTGDKLIIPVEEENPDFWNREAAEALGAAKKLQ
 PAQTAAKNLIIFLGDGMGVSTVTAARILKGQKDKLGPEIPLAMDRFPYV
 ALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTIGLSAAARFNQCNTTRGN
 EVISVMNRAKKAGKSVGVTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSADVPAS
 ARQEGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYRDDYSQGGTR
 LDGKNLVQEWLAKRQGARYVWNRTELMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYE
 IHRDSTLDPPLMEMTEAALRLLSRNPRGFFLFVEGGRIDHGHESRAYRA
 LTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLVLTADHSHVFSFGGYPLRGSSIFGL
 APKARDRKAYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYRQQSAVPL
 DEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFAHVMAFAACLEPYTACDLA
 PPAGTTDAAHPGKLDYKDDDDKDKSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGN
 LVPVCWGKGACPVFECGNVLRDTERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTI
 ENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKPAKVTPAPTRQRDF'TAA
 FPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDIELRDSRLANDLRDSGATIRIGIYIGA
 GICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPSPGLANAVAEG
 IRSEENIYTIENNVYEVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMPAAAEQK
 LISEEDLNGAVEHHHHHH*

Abbildung 44: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔS3.

pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔICD

METDTLLLLWVLLLLWVPGSTGDKLIIFLGDGMGVSTVTAARILKGQKKDKL
 GPEIPLAMDRFPYVALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTIGLS
 AAARFNQCNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSVGVT'TTRVQHASPAGTYAHT
 VNRNWYSDADVPASARQEGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTP
 DPEYPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAKRQGARYVWNRTELMQASLDPSVT
 HLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDP SLMEMTEAALRLLSRNPRGFFLFVEGG
 RIDHGHESRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLSLVTADHSHVFS
 FGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNPGYVLKDGARPDVTESE
 SGSPEYRQQSAVPLDEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFAHVMA
 FAACLEPYTACDLAPPAGTTDAAHPGRKLDYKDDDDKLGKSEVEYRAEVGQ
 NAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWKGACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRY
 WLNGDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNLKLVIKPA
 KVTPAPTRQRDF'TAAFPRLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANE
 LRDSRLANDLRDSGATIRIGIYIGAGICAGLALALIFGALIFAAAHHHHH
 H*

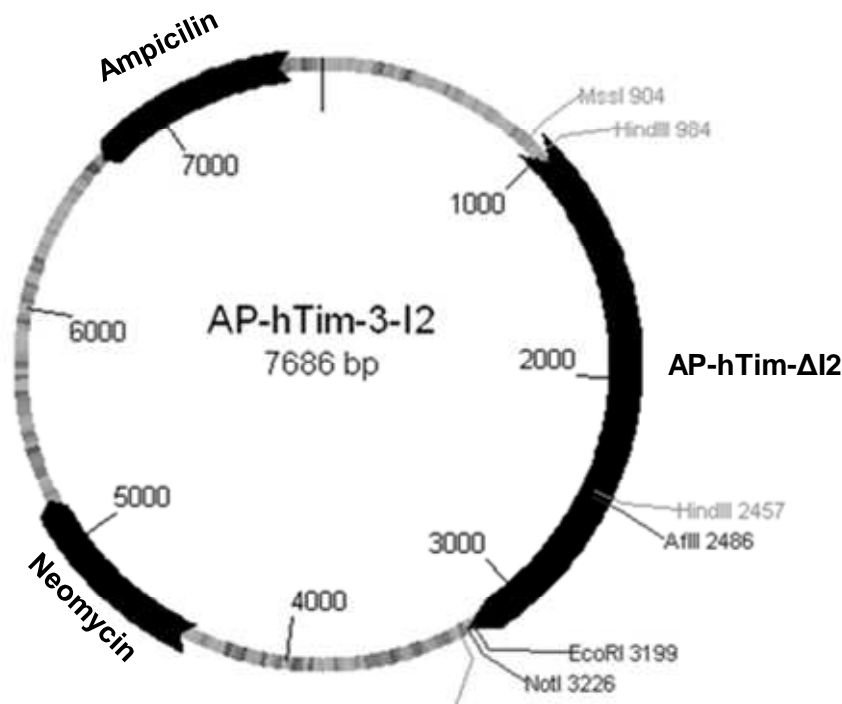
Abbildung 45: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔICD.

pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔI1

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKLIIPVEEENPDFWNREAAEALGAAKKLQ
 PAQTAAKNLIIFLGDGMGVSTVTAARILKGQKKDKLGPEIPLAMDRFPYV
 ALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTIGLSAAARFNQCNTTRGN
 EVISVMNRAKKAGKSVGVTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADVPAS
 ARQEGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPDDYSQGGTR
 LDGKNLVQEWLAKRQGARYVWNRTELMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYE
 IHRDSTLDP SLMEMTEAALRLLSRNPRGFFLFVEGGRIDHGHESRAYRA
 LTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLSLVTADHSHVFSFGGYPLRGSSIFGL
 APGKARDRKAYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYRQQSAVPL
 DEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFAHVMAFAACLEPYTACDLA
 PPAGTTDAAHPGKLDYKDDDDKLGSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGN
 LVPVCWGKGACPVFECGNVLRTERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTI
 ENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVKPAKVTPAPTRQRDFATA
 FPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGA
 TIRIGIYIGAGICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPP
 SGLANAVAEGIRSEENIYTIENVEVEEPP*

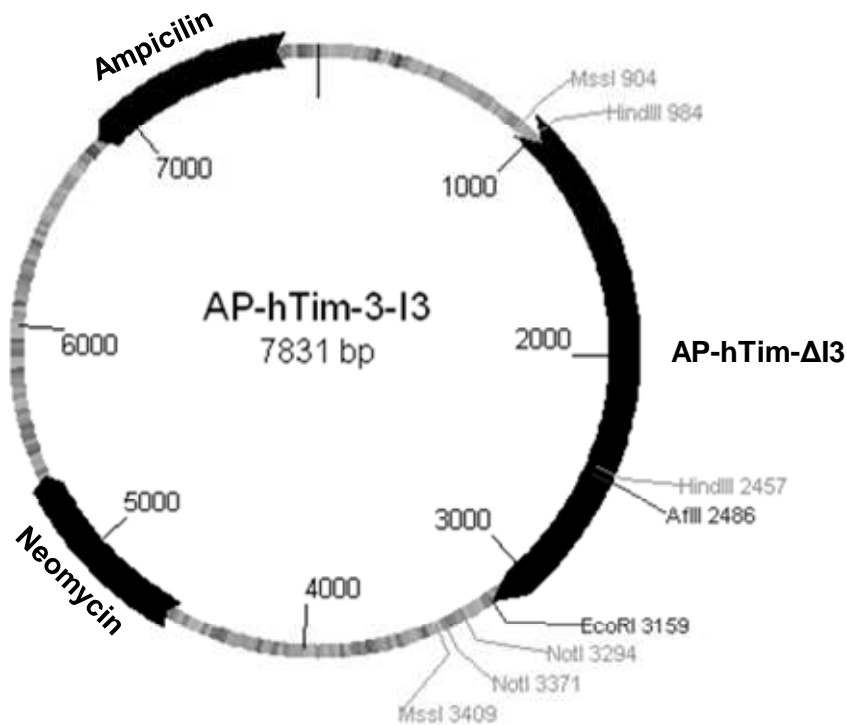
Abbildung 46: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔI1

pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔI2



METDTLLLVWVLLLVWPGSTGDKLIIPVEEENPDFWNREAAEALGAAKKLQ
 PAQTAAKNLIIFLDGDMGVSTVTAARILKGQKKDKLGPEIPLAMDRFPYV
 ALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTIGLSAAARFNQCNTTRGN
 EVISVMNRKAKGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADVPAS
 ARQEGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPDDYSQGGTR
 LDGKNLVQEWLAKRQGARYVWNRTELMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYE
 IHRDSTLDPPLMEMTEAALRLLSRNPRGFFLFVEGGRIDHGHESRAYRA
 LTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLSLVTADHSHVFSFGGYPLRGSSIFGL
 APGKARDRKAYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYRQQSAVPL
 DEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFAHVMAFAACLEPYTACDLA
 PPAGTTDAAHPGKLDYKDDDDKDKSEVEYRAEVLGQAYLPCFYTPAAPGN
 LVPVCWGKGACPVFECGNVLRDTERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTI
 ENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKPAKVTPAPTRQRDF'TAA
 FPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDGA
 TIRIGIYIGAGICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPP
 SGLANAVAEGIRSEENI*

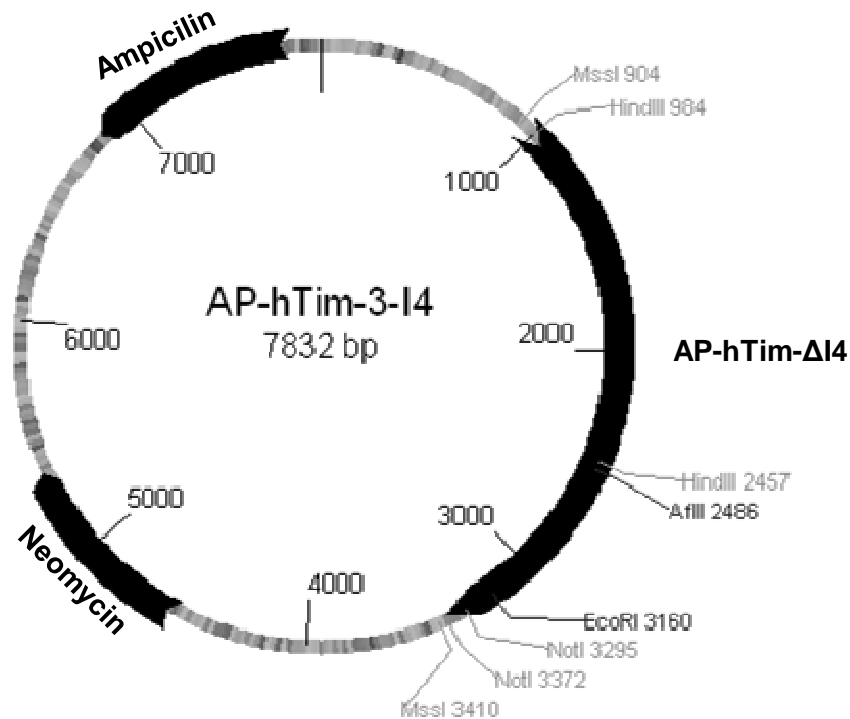
Abbildung 47: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔI2.

pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔI3

METDTLLLLWVLLLVWPGSTGDKLIIPVEEENPDFWNREAAEALGAAKKLQ
 PAQTAAKNLIIFLDGDMGVSTVTAARILKGQKKDKLGPEIPLAMDRFPYV
 ALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTIGLSAAARFNQCNTTRGN
 EVISVMNRKAKGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADVPAS
 ARQEGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPDDYSQGGTR
 LDGKNLVQEWLAKRQGARYVWNRTELMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYE
 IHRDSTLDP SLMEMTEAALRLLSRNPRGFFLFVEGGRIDHGHESRAYRA
 LTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTLSLVTADHSHVFSFGGYPLRGSSIFGL
 APGKARDRKAYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYRQQSAVPL
 DEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFAHVMAFAACLEPYTACDLA
 PPAGTTDAAHPGKLDYKDDDDKDKSEVEYRAEVLGQNAAYLPCFYTPAAPGN
 LVPVCWGKGACPVFECEGNVLRTERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTI
 ENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKPAKVTPAPTRQRDF'TAA
 FPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQIISTLANELRDSRLANDLRDGA
 TIRIGIYIGAGICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPP
 SGLEENIYTIENVEVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMPAAAEQK
 LISEEDLNGAVEHHHHHH*

Abbildung 48: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔI3.

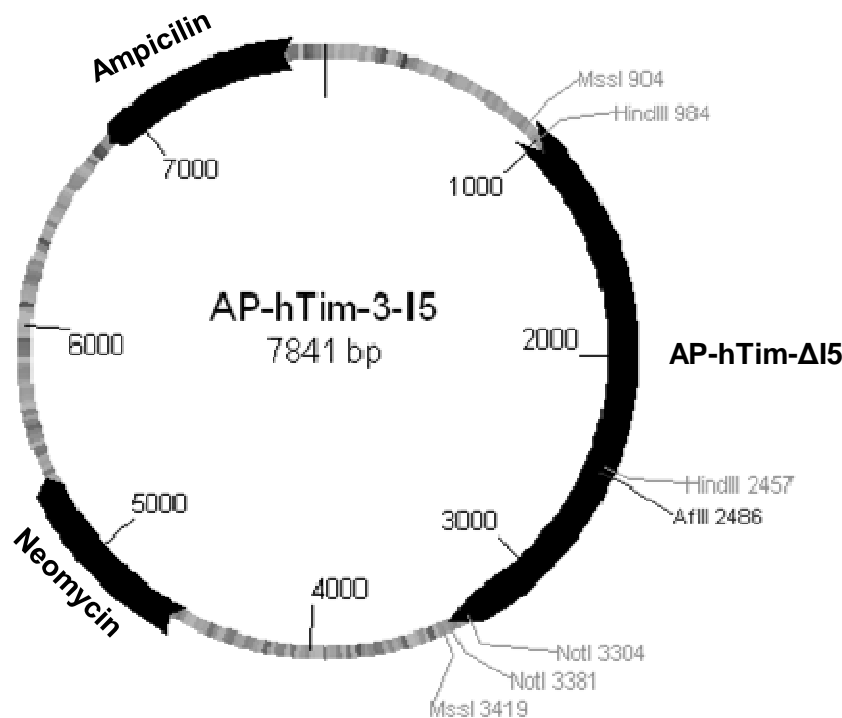
pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔI4



METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKLIIPVEEENPDFWNREAAEALGAAKKLQ
 PAQTAANKLIIFLGDGMGVSTVTAARILKGQKKDKLGPEIPLAMDRFPYV
 ALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTIGLSAAARFNQCNTTRGN
 EVISVMNRAKKAGKSVGVTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADVPAS
 ARQEGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPDDYSQGGTR
 LDGKNLVQEWLAKRQGARYVWNRTELMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYE
 IHRDSTLDPPLMEMTEAALRLLSRNPRGFFLFVEGGRIDHGHESRAYRA
 LTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLSLVTADHSHVFSFGGYPLRGSSIFGL
 APKARDRKAYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYRQQSAPVPL
 DEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFAHVMAFAACLEPYTACDLA
 PPAGTTDAAHPGKLDYKDDDDKLGSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGN
 LVPVCWGKGACPVFECGNVLRTERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTI
 ENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVKPAKVTPAPTRQRDFATA
 FPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGA
 TIRIGIYIGAGICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLANAVAEGIRS
 EENIYTIENVEVEEPPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMPAAAEQKLIS
 EEDLNGAVEHHHHHH*

Abbildung 49: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔI4.

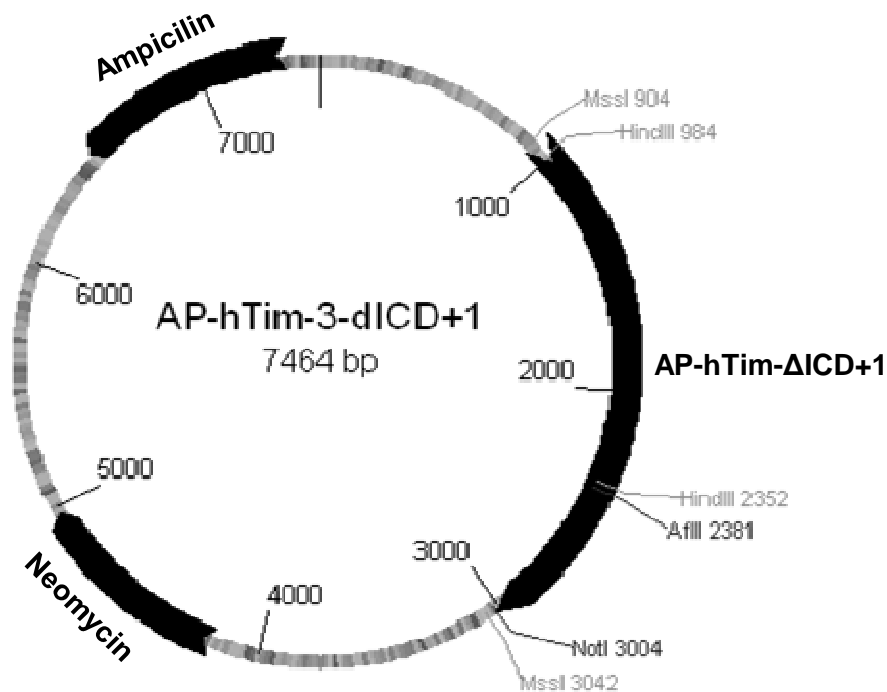
pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔI5



METDTLLLLWVLLLWVPGSTGDKLIIPVEEENPDFWNREAAEALGAAKKLQ
 PAQTAAKNLIIFLDGDMGVSTVTAARILKGQKKDKLGPEIPLAMDRFPYV
 ALSKTYNVDKHPDGSATATAYLCGVKGNFQTIGLSAAARFNQCNTTRGN
 EVISVMNRKAKGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADVPAS
 ARQEGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPDDYSQGGTR
 LDGKNLVQEWLAKRQGARYVWNRTELMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYE
 IHRDSTLDP SLMEMTEAALRLLSRNPRGFFLFVEGGRIDHGHESRAYRA
 LTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLVTDHSHVFSFGGYPLRGSSIFGL
 APGKARDRKAYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYRQQSAVPL
 DEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFFIAHVMAFAACLEPYTACDLA
 PPAGTTDAAHPGKLDYKDDDDKDKLSEVEYRAEVLGQNAAYLPCFYTPAAPGN
 LVPVCWKGACPVFE CGNVVLR TD ERDVNYWTSRYWLN GDFRKG DVSLTI
 ENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKPAKVTPAPTRQRDF'TAA
 FPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGA
 TIRIGIYIGAGICAGLALALIFGALILASSLWPTSLPQDWQMQ*

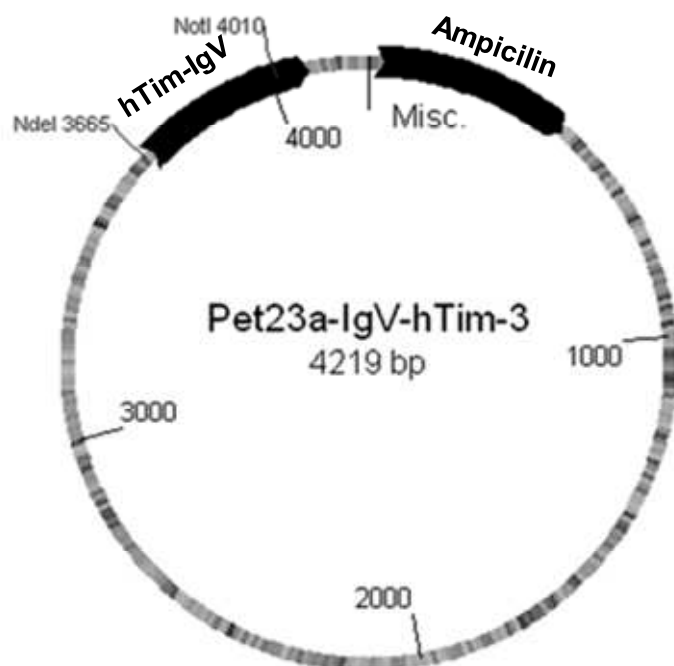
Abbildung 50: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔI5.

pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔICD+1



METDTLLLLWVLLLVWPGSTGDKLIIFLGDGMGVSTVTAARILKGQKKDKL
 GPEIPLAMDRFPYVALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTIGLS
 AAARFNQCNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSVGVTTRVQHASPAGTYAHT
 VNRNWYSDADVPASARQEGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTP
 DPEYPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAKRQGARYVWNRTELMQASLDPSVT
 HLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDP SLMEMTEAALRLLSRNPRGFFLFVEGG
 RIDHGHESRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLSLVTADHSHVFS
 FGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESE
 SGSPHYRQQSAVPLDEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFAHVMA
 FAACLEPYTACDLAPPAGTTDAAHPGRKLDYKDDDDKLGKSEVEYRAEVGQ
 NAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWKGACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRY
 WLNGDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVKPA
 KVTPAPTRQRDFTAAPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANE
 LRDSRLANDLRDSGATIRIGIYIGAGICAGLALALIFGALIFK*

Abbildung 51: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pcDNA3.1-AP-hTim-3ΔICD+1.

pet23a(+)-hTim-IgV

MSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECGNVLR
 DERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMND
 EKFNLKLVIKPAKGAAAEQKLISEEDLNGAVEHHHHH*

Abbildung 52: Plasmidkarte und Aminosäuresequenz des Plasmids pet23a(+)-hTim-3-IgV.

7.6 Publikationen

Effects of blockade of peripheral interleukin-6 trans-signaling on hippocampus-dependent and independent memory in mice.

Braun O*, Dewitz C*, Möller-Hackbarth K*, Scheller J*, Schiffelholz T*, Baier PC*, Rose-John S*.

J Interferon Cytokine Res. 2013 May; 33(5):254-60. Epub 2012 Dez 7.

* Gleichberechtigte Erst- und Letztautoren

Eingereicht:

ADAM10 and ADAM17 are majore sheddases of T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (Tim-3)

Möller-Hackbarth K, Dewitz C, Schweigert O, Trad A, Garbers C, Rose-John S, Scheller J.

Shedding of T cell immunoglobulin and mucin domain 2 (TIM-2) is mediated by A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) 10

Dewitz C, Möller-Hackbarth K, Schweigert O, Reiss K, Chalaris A, Scheller J, Rose-John S.

Soluble T cell immunoglobulin and mucin domain (Tim-) 1 and 4 generated by a disintegrin and metalloproteinase domain-containing proteins (ADAM-) 10 and 17 bind to phosphatidylserine

Schweigert O, Dewitz C, Möller-Hackbarth K, Trad A, Garbers C, Rose-John S, Scheller J.

7.7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Katja Möller-Hackbarth
Email:	moeller.kati@gmx.de
Geburtsdatum	06.09.1982
Geburtsort	Kiel
Familienstand	verheiratet

Studium

06/09 - 06/13	Promotion (rer.nat.) im Biochemischen Institut der Universität Kiel, Medizinische Fakultät Arbeits Thema: Proteolytische Freisetzung des humanen <i>T cell Immunoglobulin and Mucin domain</i> (Tim)-3 durch die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17
05/08 - 04/09	Anfertigung einer Diplomarbeit im Botanischen Institut der Universität Kiel - AG Krupinska (Beurteilung „sehr gut“)
10/03 - 04/09	Studium der Biologie an der CAU in Kiel Abschluss Diplom Hauptfach: Zellbiologie Nebenfächer: Zoologie und Rechtsmedizin

Schulbildung

08/93 - 06/03	Gymnasium Elmschenhagen
08/89 - 06/93	Matthias Claudius Grundschule Elmschenhagen

Kenntnisse

Sprachen	Englisch (gut) Französisch (Grundkenntnisse)
----------	---

7.8 Danksagung

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Stefan Rose-John und Herrn Professor Jürgen Scheller, für die Betreuung und die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Promotion sowie die fachliche und auch persönliche Unterstützung.

Besonders möchte ich mich auch bei Herrn Professor Roeder für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser externen Promotion bedanken.

Bei meinen Laborkollegen Christin Dewitz, Eva-Maria Wagener, Timo Effenberger, Olga Braun, Antje Schütt und Jessica Rabsch, sowie Steffi Schnell und Renate Thun, möchte ich mich für die freundschaftliche und oft lustige Zusammenarbeit bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie für die tolle Unterstützung während dieser Arbeit bedanken.

Mein größter Dank gilt meinem Ehemann Christian - ich danke Dir für den großen Rückhalt, die Aufmunterungen und liebevolle Motivation in allen Phasen und dafür, dass Du es mit mir ausgehalten hast.

7.9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Katja Möller-Hackbarth, 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 an keiner anderen Fakultät vorgelegt.

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

Ich erkläre, dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Kiel, den 12.08.2013

Katja Möller-Hackbarth

Dateiname: Dissertation Katja Finale Version 08-01-2014
Verzeichnis: C:\Dokumente und Einstellungen\Katja Möller\Eigene Dateien
Vorlage: C:\Dokumente und Einstellungen\Katja
Möller\Anwendungsdaten\Microsoft\Templates\Normal.dotm
Titel:
Thema:
Autor: AnwenderPC3
Stichwörter:
Kommentar:
Erstelldatum: 08.01.2014 11:32:00
Änderung Nummer: 4
Letztes Speicherdatum: 08.01.2014 11:39:00
Zuletzt gespeichert von: Katja Möller
Letztes Druckdatum: 09.01.2014 12:27:00
Nach letztem vollständigen Druck
Anzahl Seiten: 140
Anzahl Wörter: 60.727 (ca.)
Anzahl Zeichen: 382.584 (ca.)