

**Die proteolytische Freisetzung des T Zell
Immunglobulin- und Mucindomänen Proteins 2
(TIM-2) ist ADAM10-abhängig und wird durch
Calmodulin beeinflusst**

Dissertation

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

vorgelegt von

Christin Dewitz

Kiel, 2014

Referent: Prof. Dr. Stefan Rose-John

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2014

Zum Druck genehmigt: Kiel, 21.02.2014

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	11
1.1 Die T Zell Immunglobulin- und Mucindomänen (TIM) Rezeptoren.....	11
1.2 Das murine TIM-2 im Überblick	14
1.3 H-Ferritin der Ligand von TIM-2.....	15
1.4 Ektodomänen- <i>Shedding</i> als wichtiger immunregulatorischer Mechanismus	16
1.5 Die Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen.....	17
1.6 ADAM10 und ADAM17 als bedeutende <i>Shedding</i> -Proteasen	20
1.6.1 ADAM17	20
1.6.2 ADAM10	20
1.7 Mechanismen der <i>Shedding</i> -Regulation	21
1.7.1 ADAM17-vermitteltes <i>Shedding</i>	21
1.7.2 ADAM10-abhängiges <i>Shedding</i>	22
1.7.3 <i>Shedding</i> -Regulation durch Calmodulin und dessen Inhibitor W7	24
1.7.4 Inhibition von ADAM10 und ADAM17	25
1.8 Fragestellungen	26
2 Material und Methoden.....	27
2.1 Materialien, Geräte und Lösungen	27
2.1.1 Technische Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	28
2.1.3 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen	30
2.1.4 Antikörper	32
2.1.5 Enzyme, Größenmarker und Farbstoffe.....	33
2.1.6 Kits.....	33
2.1.7 Oligonukleotide, Plasmide	34
2.1.8 Bakterien, Zellen und Mäuse	36
2.1.9 Stimulanzien und Inhibitoren.....	38

2.2	Molekularbiologische Methoden	39
2.2.1	Isolation von RNS	39
2.2.2	Reverse Transkription (RT).....	39
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	39
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	42
2.2.5	Agarosegelelektrophorese	42
2.2.6	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	43
2.2.7	Klonierung von DNS-Fragmenten in Plasmiden	43
2.2.8	Sequenzierung von DNS	45
2.3	Zellbiologische Methoden	46
2.3.1	Kultivierung und Passagieren von adhärenen Zellen.....	46
2.3.2	Zellzählung mittels Trypanblau	46
2.3.3	Einfrieren und Auftauen von Zelllinien	46
2.3.4	Transfektion von adhärenen Zellen	47
2.3.5	<i>Shedding</i> -Experimente mit adhärenen Zellen	48
2.4	Proteinbiochemische Methoden	49
2.4.1	Lyse von Zellen	49
2.4.2	Proteinbestimmung (BCA-Assay)	49
2.4.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
2.4.4	Coomassie-Färbung.....	50
2.4.5	Western Blot und immunochemische Proteindetektion	51
2.4.6	„Stripping“ von Western Blot Membranen.....	51
2.4.7	Alkalische Phosphatase (AP)-Assay zur Bestimmung der Spaltungseffizienz.....	51
2.4.8	Proteinexpression und Reinigung von H-Ferritin	52
2.5	Immunologische Methoden	53
2.5.1	Durchflusszytometrie	53
2.5.2	Co-Immunpräzipitation von H-Ferritin mit löslichem TIM-2Fc	53
2.5.3	ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>).....	54
2.5.4	AP-ELISA	54
2.5.5	Kompetitiver AP-ELISA	55

2.5.6	Calmodulin-Bindungs-Assay (CaM-IP)	55
2.5.7	Präparation und Aktivierung von primären murinen B Zellen aus der Milz.....	55
2.6	Statistische Auswertung	56
3	Ergebnisse	57
3.1	Expression und <i>in vitro</i> Shedding-Analyse von TIM-2 nach Stimulation mit PMA, BzATP und Ionomycin	57
3.1.1	Generierung der TIM-2 Expressionsplasmide	57
3.1.2	Expression von TIM-2 auf der Zelloberfläche von transfizierten HEK293 Zellen	58
3.1.3	PMA-Stimulation führt nicht zum <i>Shedding</i> von TIM-2 durch ADAM17	58
3.1.4	ADAM10 prozessiert TIM-2 nach Stimulation mit BzATP oder Ionomycin	59
3.2	Die quantitative <i>Shedding</i>-Analyse via AP-Assay bestätigt ADAM10 als Protease von TIM-2	60
3.2.1	Generierung des AP-TIM-2 Expressionsplasmids	60
3.2.2	Zelloberflächenexpression von AP-TIM-2 auf transfizierten HEK293 Zellen.....	61
3.2.3	ADAM17 prozessiert nicht AP-TIM-2 nach Stimulation mit PMA	62
3.2.4	Stimulation mit BzATP oder Ionomycin führt zum <i>Shedding</i> von AP-TIM-2 durch ADAM10.....	63
3.2.5	<i>Shedding</i> -Analyse von AP-TIM-2 in ADAM10- und ADAM17-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)	64
3.3	<i>Shedding</i> von endogenem TIM-2 in primären murinen B Zellen	66
3.4	Herstellung einer nicht-spaltbaren TIM-2 Variante.....	67
3.4.1	Generierung der Expressionsplasmide für die Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3	68
3.4.2	Die Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3 werden auf der Oberfläche von HEK293 Zellen exprimiert.....	69
3.4.3	Die Deletionsmutante AP-TIM-2_Δ1 wird nicht durch ADAM10 gespalten.....	70
3.4.4	<i>Shedding</i> -Analyse der Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3 in ADAM10- und ADAM17-defizienten MEFs.....	71
3.5	Die Immunglobulindomäne und der intrazelluläre Teil von TIM-2 spielen keine Rolle für die Prozessierung durch ADAM10.....	72
3.5.1	Generierung der Expressionsplasmide für die Mutanten AP-TIM-2_ΔIgV und AP-TIM-2_ΔICD.....	72
3.5.2	AP-TIM-2_ΔIgV und _ΔICD werden auf der Oberfläche von HEK293 Zellen exprimiert	73
3.5.3	Die Mutanten AP-TIM-2_ΔIgV und _ΔICD werden durch ADAM10 nach Stimulation mit BzATP oder Ionomycin prozessiert.....	74

3.5.4	<i>Shedding</i> -Analyse der Deletionsmutanten AP-TIM-2_ΔIgV und _ΔICD in ADAM10- und ADAM17-defizienten MEFs.....	75
3.6	Einfluss von Calmodulin auf das <i>Shedding</i> von TIM-2.....	76
3.6.1	Der Calmodulin-Antagonist W7 induziert <i>Shedding</i> von TIM-2.....	76
3.6.2	<i>Shedding</i> -Analyse der Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ1 und _ΔICD nach der Inhibition von Calmodulin durch W7.....	77
3.6.3	Interaktion zwischen TIM-2 und Calmodulin.....	78
3.7	Interaktion zwischen H-Ferritin und löslichem TIM-2Fc Protein.....	79
3.7.1	Vektorkonstruktion, schematische Darstellung und Expression von H-Ferritin.....	79
3.7.2	Vektorkonstruktion und schematische Übersicht von sTIM-2Fc.....	80
3.7.3	Das lösliche sTIM-2Fc Protein bindet an rekombinantes H-Ferritin.....	82
3.8	Bindung von H-Ferritin an ADAM10-gespaltenes lösliches AP-TIM-2.....	83
3.9	Die Immunglobulindomäne von TIM-2 vermittelt die H-Ferritin Interaktion.....	84
4	Diskussion.....	86
4.1	TIM-2 ist kein ADAM17 Substrat.....	86
4.2	ADAM10-vermitteltes Ektodomänen- <i>Shedding</i> von TIM-2.....	87
4.3	Spekulation einer ADAM10-Schnittstelle im membranproximalen Bereich von TIM-2.....	89
4.4	Calmodulin-reguliertes TIM-2- <i>Shedding</i>	92
4.5	Physiologische Relevanz des TIM-2- <i>Sheddings</i>	93
4.6	Ausblicke.....	95
5	Zusammenfassung.....	98
6	Summary.....	99
7	Literaturverzeichnis.....	100
8	Anhang.....	117
8.1	Plasmidkarten.....	117
8.2	Publikationen.....	122
8.3	Lebenslauf.....	123
8.4	Danksagung.....	124
8.5	Eidesstattliche Erklärung.....	125

Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat

B

BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BzATP	(2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat)
bzw.	beziehungsweise

C

ca.	circa
Ca ²⁺	Calciumion
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Cluster of Differentiation
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-Terminus	Carboxyl-Terminus

D

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
EtOH	Ethanol

F

FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FkS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

G

g	Gramm
x g	Zentrifugalbeschleunigung
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GI	GI254023X (hemmt ADAM10)
gp	Glykoprotein
GW	GW280264X (hemmt ADAM10 und 17)

H

h	human bzw. Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser

I

ICD	intrazelluläre Domäne
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IM	Ionomycin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

K

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

L

l	Liter
LB	Lysogeny Broth
LPS	Lipopolysaccharid

M

m	murin
M	Molar
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
mg	Milligramm
µg	Microgramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNS	messenger Ribonukleinsäure

N

n	Nano
NaCl ₂	Natriumchlorid
N-Terminus	Amino-Terminus

O

OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen

P

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phytoerythrin
pg	Pikogramm
pH	Konzentration der H ⁺ -Ionen in einer Lösung
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POD	Peroxidase

p-STAT3 Phospho-STAT3
PVDF Polyvinylidene Fluoride

R

RNA Ribonukleinsäure
rpm Rotationen pro Minute
ROS Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR Reverse Transcriptase PCR

S

s Sekunde
SDS-PAGE Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SD Standardabweichung
sgp130 lösliches gp130
sTIM-2 lösliches TIM-2
SVMP Snake Venom Metalloproteinase

T

Tab. Tabelle
TACE Tumor Necrosis Factor-Alpha Converting Enzym
Taq Thermophilus aquaticus
TBE Tris Borat EDTA
TBS Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED Tetramethylethylendiamin
TGF α Transforming Growth Factor α
TIM T Zell Immunglobulin- und Mucindomänen
TM Transmembrandomäne
TNF α Tumor necrosis factor α

U

U Units
u.a. unter anderem
UV Ultraviolett

V

v/v Volumen pro Volume
V Volt

W

W7	(N-(6-Aminohexyl)-5-chlor-1-naphthalinsulfonamid)
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

X

X-Gal	Brom-4chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
-------	--

Z

z.B.	zum Beispiel
------	--------------

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

1 Einleitung

1.1 Die T Zell Immunglobulin- und Mucindomänen (TIM) Rezeptoren

Im Jahre 2001 wurden die TIM-Gene durch Positionsklonierung erstmalig als neue Allergie- und Asthmarisikogene identifiziert (McIntire *et al.*, 2001). Die Bezeichnung TIM beruht darauf, dass die TIM Proteine auf der Oberfläche von T Zellen exprimiert werden und eine variable Immunglobulin- sowie eine Mucindomäne besitzen. Die TIM Rezeptoren spielen eine wichtige und umfassende Rolle in der Immunantwort, unter anderem sind sie an der Regulation von Allergien, Asthma, Transplantationstoleranz, Autoimmunität, Krebs und Abwehrreaktionen gegen virale Infektionen beteiligt (Freeman *et al.*, 2010).

Wie in Abb. 1 zu sehen ist, gibt es acht murine TIM-Gene (mTIM-1-8) auf Chromosom 11B1.1 sowie drei humane Gene (hTIM-1, hTIM-3 und hTIM-4) auf Chromosom 5q33.2 (Kuchroo *et al.*, 2003; McIntire *et al.*, 2004). Expressions-, Funktions- und Strukturanalysen ergaben, dass die Mausgene mTIM-1, mTIM-3 und mTIM-4 Orthologe der humanen Gene hTIM-1, hTIM-3 und hTIM-4 sind. Das murine TIM-1 und TIM-2 sind homolog (62 %) und vermutlich durch Genduplikation im Nagergenom entstanden, da nur TIM-1 in Primaten vorkommt (Santiago *et al.*, 2007a; Freeman *et al.*, 2010). Die Sequenzidentität der N-terminalen Cysteinreichen Region beträgt innerhalb der TIM-Homologen etwa 40 %, während sie zwischen den murinen und humanen Orthologen etwa 60 % ausmacht (Kuchroo *et al.*, 2003).

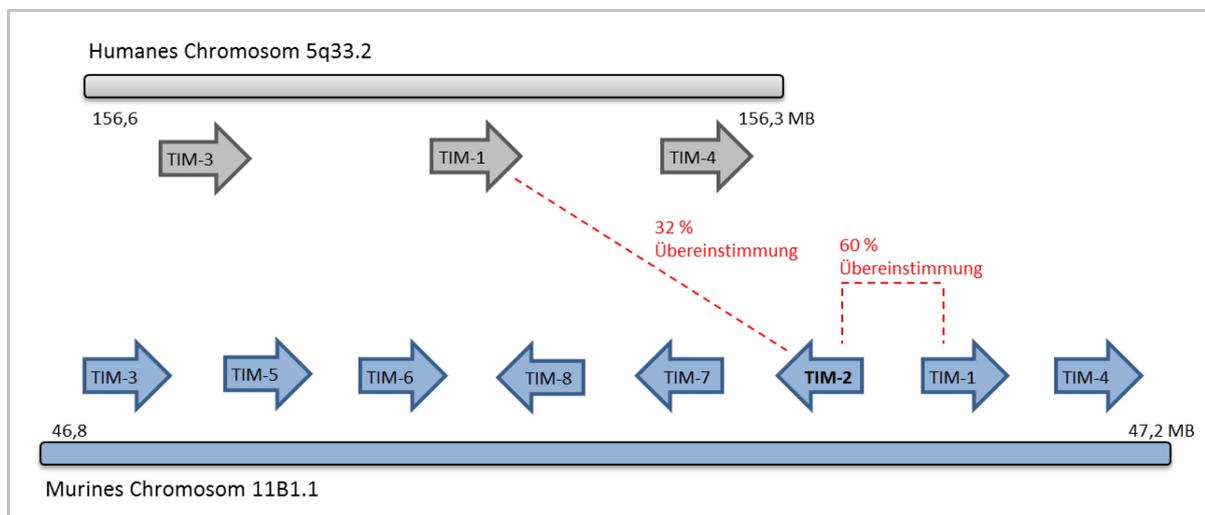


Abb. 1: Genomische Organisation der humanen und murinen T Zell Immunglobulin- und Mucindomänen (TIM)-Gene. Dargestellt ist die Anordnung der drei humanen TIM-Gene (grau) auf Chromosom 5 und der acht murinen TIM-Gene (blau) auf Chromosom 11. Die Pfeile zeigen die Richtung der mRNA-Transkription an. Die murinen Gene TIM-5 bis TIM-8 sind prognostizierte Gene. Die Sequenzidentität zwischen mTIM-2 und mTIM-1 sowie hTIM-1 ist mit einer rot gestrichelten Linie angezeigt.

Das erstbeschriebene Familienmitglied TIM-1 wurde ursprünglich als Rezeptor für das Hepatitis-A-Virus (HAVCR1) identifiziert, 1996 in grünen Meerkatzen, einer Primatengattung (Kaplan *et al.*, 1996) und dann 1998 im Menschen (Feigelstock *et al.*, 1998). Nachfolgend wurde TIM-1 auch als KIM-1 (engl. *kidney injury molecule*)

bezeichnet, da Studien zeigen konnten, dass es nach einer Ischämie in Nierenepithelzellen hochreguliert wird (Ichimura *et al.*, 1998), ebenso bei Nierenzellkrebs (Vila *et al.*, 2004) und der polyzystischen Nierenerkrankung (Kuehn *et al.*, 2002).

Alle TIM Rezeptoren besitzen als Typ I Transmembranproteine einen ähnlichen Aufbau, der durch eine variable Immunglobulindomäne (IgV), eine Serin-, Threonin- und Prolin-reiche Mucindomäne, eine transmembrane Region und einen kurzen intrazellulären Schwanzteil gekennzeichnet ist (siehe Abb. 2). Die N-terminale variable Immunglobulindomäne der TIMs weist sechs konservierte Cysteinreste auf und ist wichtig für die Bindung der TIM Rezeptoren an ihre Liganden (Thompson *et al.*, 1998; Sabatos *et al.*, 2003; Sanchez-Fueyo *et al.*, 2003; Meyers *et al.*, 2005a). TIM-4 besitzt in seiner Immunglobulindomäne ein integrinbindendes Motiv (RGD-Motiv). Wie in Abb. 2 zu sehen ist, variiert die Größe der Mucinregion zwischen den einzelnen Mitgliedern und innerhalb dieser Domäne gibt es unterschiedlich viele O- und N-assoziierte Glykosylierungsstellen. TIM-1, TIM-2 und TIM-3, jedoch nicht TIM-4, enthalten in ihrem intrazellulären Teil jeweils ein potentielles Phosphorylierungsmotiv für Kinasen, das bei der transmembranen Signalübertragung eine Rolle spielt (Kuchroo *et al.*, 2003; Meyers *et al.*, 2005b; Santiago *et al.*, 2007a; Rodriguez-Manzanet *et al.*, 2009).

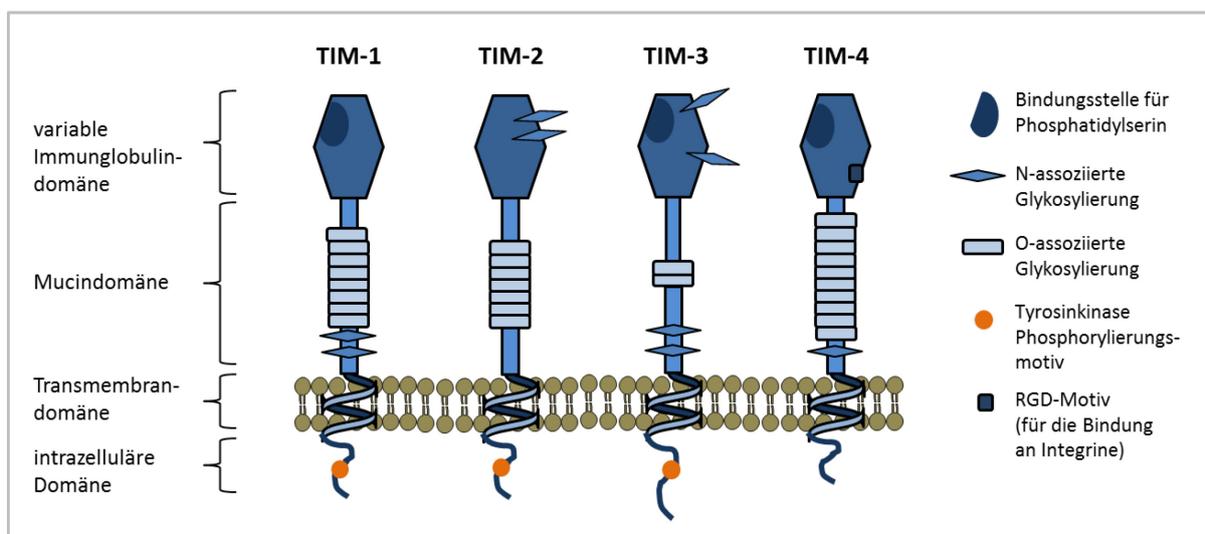


Abb. 2: Struktur der murinen T Zell Immunglobulin- und Mucindomänen (TIM) Proteine. Dargestellt ist der Aufbau der murinen TIM Rezeptoren. Sie bestehen aus einer variablen Immunglobulindomäne, einer Mucindomäne, einer transmembranen Bereich und einer intrazellulären Region. Die genaue Erläuterung ist im Text unter 1.1 beschrieben. Modifiziert nach (Freeman *et al.*, 2010).

Interessanterweise ähnelt die Struktur der TIM Proteine sehr dem Aufbau des membranständigen CX3CL1 Chemokins (auch Fraktalkin im Menschen genannt), von dem bereits bekannt ist, dass es durch ADAM-Proteasen prozessiert wird (Hundhausen *et al.*, 2003). Dementsprechend war dies ein Indiz dafür, dass die TIM Proteine auch durch Metalloproteasen gespalten werden könnten. Mehrere Studien belegen, dass TIM-1, TIM-3 und TIM-4 als sogenannte Mustererkennungsrezeptoren, im Unterschied zu TIM-2, an Phosphatidylserin (PtdSer) exprimierenden Zellen binden können (Kobayashi *et al.*, 2007; Miyanishi *et al.*, 2007; Santiago *et al.*, 2007a; Ichimura *et al.*, 2008; DeKruyff *et al.*, 2010). PtdSer ist normalerweise an der Innenseite der

Zellmembran (zytosolische Seite) von lebenden Zellen lokalisiert und wird von apoptotischen Zellen auf die Außenseite der Membran (Zelloberfläche) transloziert (Fadok *et al.*, 1992; DeKruyff *et al.*, 2010). Trotz dieser gemeinsamen Eigenschaft, PtdSer zu erkennen, unterscheiden sich TIM-1, TIM-3 und TIM-4 in ihrer molekularen Struktur und in ihrem Expressionsmuster, was darauf hindeutet, dass sie verschiedene Funktionen bei der Regulation von Immunreaktionen haben.

TIM-1 ist hauptsächlich auf CD4-positiven Th2 Zellen exprimiert und als costimulierendes Signal für die T Zellaktivierung und der daraus resultierenden erhöhten Zytokinproduktion von Interleukin 4 (IL-4) verantwortlich (Umetsu *et al.*, 2005). Außerdem ist TIM-1 im Menschen als Risikogen für Allergien und Asthma bekannt (McIntire *et al.*, 2003). Membranständiges TIM-1 (KIM-1) kann durch die Matrix-Metalloprotease-3 (MMP-3) und die Membran-Typ 1 (MT1)-MMP geschnitten werden, sodass eine lösliche TIM-1 Variante nachweisbar ist (Bailly *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2012). Diese lösliche TIM-1 Variante kann bei Nierenerkrankungen verstärkt im Urin detektiert werden und gilt daher als Biomarker für Nierenschädigung (Zhang *et al.*, 2007). Diesbezüglich stellte sich die Frage, ob murines TIM-2 aufgrund der Homologie zu TIM-1, ebenfalls gespalten wird.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist die *Shedding*-Analyse von TIM-2. Eine genaue Charakterisierung von **TIM-2** ist unter 1.2 aufgeführt.

TIM-3 wird bevorzugt von CD4-positiven Th1 Zellen sowie CD8-positiven T Zellen exprimiert und kann die Th1-vermittelte Immunantwort hemmen, wodurch Immuntoleranz ausgelöst werden kann (Sabatos *et al.*, 2003; Sanchez-Fueyo *et al.*, 2003). Die TIM-3 Expression konnte auch auf Th17 Zellen nachgewiesen werden (Nakae *et al.*, 2007; Hastings *et al.*, 2009). Einige dendritische Zellen exprimieren ebenso TIM-3 (Rodriguez-Manzanet *et al.*, 2009) und dort reguliert es die Phagozytose von apoptotischen Zellen sowie die Kreuzpräsentation von Antigenen (Nakayama *et al.*, 2009). Zhu *et al.* (Zhu *et al.*, 2005) zeigten, dass durch die Bindung von TIM-3 an seinen Liganden Galectin-9 die Anzahl der Interferon- γ (IFN- γ) produzierenden Zellen herabgesetzt wird und daher ein Zusammenhang mit Th1-abhängigen Immunkrankheiten wie beispielsweise der Multiplen Sklerose bzw. EAE (engl. *experimental autoimmune encephalomyelitis*) in der Maus besteht (Minagar *et al.*, 2002; Monney *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2003; Ohler *et al.*, 2004; Koguchi *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2007).

Demgegenüber wird **TIM-4** primär nur auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Es kann an TIM-1 binden und reguliert die T Zellaktivierung sowie die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz, indem es unter anderem die Phagozytose von apoptotischen Zellen vermittelt (Meyers *et al.*, 2005a; Kobayashi *et al.*, 2007; Miyanishi *et al.*, 2007).

Diese Daten zeigen, dass die TIM-Moleküle ein überraschend breites Funktionsspektrum aufweisen, die viele immunologische Aspekte beeinflussen. Deshalb ist es besonders interessant und wichtig zu untersuchen, ob lösliche TIM Varianten existieren, wie sie entstehen und woran sie binden können.

1.2 Das murine TIM-2 im Überblick

Das murine TIM-2 hat kein strukturelles Ortholog im Menschen (McIntire *et al.*, 2001; Kuchroo *et al.*, 2003). Die Sequenzhomologie zwischen TIM-2 und murinem TIM-1 ist sehr groß, jedoch sind entscheidende Aminosäuren (Asparagin, Asparaginsäure) in der MILIBS (engl. *metal ion-dependent ligand-binding site*) Region von TIM-2 nicht enthalten, die für die Bindung von Metallionen und PtdSer wichtig sind (Santiago *et al.*, 2007a). Dadurch ist diese Bindungstasche sehr abgeflacht und kann nicht mit PtdSer interagieren (Kobayashi *et al.*, 2007; Miyanishi *et al.*, 2007). Kristall- und Strukturanalysen zeigen, dass die IgV-Domänen von TIM-2 nicht-kovalente Dimere ausbilden können (Santiago *et al.*, 2007b). Die obere Fläche dieser Dimere ist Glykan-frei und kann deshalb mit den TIM-2 Liganden Semaphorin4A (Kumanogoh *et al.*, 2002; Kumanogoh & Kikutani, 2003) oder H-Ferritin (Chen *et al.*, 2005) gut interagieren. Die intrazelluläre Domäne von TIM-2 weist eine putative Tyrosinkinase Phosphorylierungsstelle auf, die nach T Zellaktivierung phosphoryliert wird (Kumanogoh *et al.*, 2002). TIM-2 wird hauptsächlich auf differenzierten Th2 Zellen und aktivierten B Zellen exprimiert (Chakravarti *et al.*, 2005; Rennert *et al.*, 2006). Außerdem ist die TIM-2 Expression auf Epithelzellen in der Niere und der Leber beschrieben (Chen *et al.*, 2005).

Wie Studien mit TIM-2 defizienten Mäusen belegen, reguliert TIM-2 die Th2-vermittelte Immunantwort negativ (Rennert *et al.*, 2006; Fukushima *et al.*, 2007). Durch Überexpression von TIM-2 auf JURKAT oder D10 T Zelllinien wird die NFAT/AP-1 Transkriptionsaktivität signifikant herabgesetzt (Knickelbein *et al.*, 2006), womit TIM-2 als negativer T Zellregulator bestätigt wurde. Auf B Zellen beeinflusst TIM-2 sowohl die B Zellproliferation als auch die Antikörperproduktion von B Zellen während der frühen Phase der Th1-abhängigen Collagen-induzierten Arthritis (CIA) (Kawamoto *et al.*, 2011).

In vivo Studien in der Maus, zur antagonistischen Hemmung der TIM-2 Interaktionen mit seinen natürlich vorkommenden Liganden zeigten, dass nach der Injektion von löslichem TIM-2-Fc eine erhöhte T Zellhyperproliferation sowie verstärkte Produktion von Th-2 Zytokinen (IL-2, IL-4 und IL-10) gemessen wird. Wenn Mäuse diese lösliche TIM-2-Fc Variante während oder kurz vor dem Ausbruch der Krankheit EAE, ein Th1-abhängiges Immunkrankheitsmodell der humanen multiplen Sklerose, gespritzt bekommen, kann das lösliche TIM-2 den Krankheitsverlauf deutlich verbessern (Chakravarti *et al.*, 2005). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass durch ein lösliches TIM-2-Fc-Fusionsprotein die Th2-vermittelte Heilung einer Lungenentzündung im Ovalbumin (OVA)-induziertem Asthma Modell verschlechtert wird (Rennert *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass auch eine natürlich vorkommende lösliche TIM-2 Ektodomäne entscheidende biologische Funktionen haben könnte.

1.3 H-Ferritin der Ligand von TIM-2

Ferritin ist ein ubiquitär vorkommender Proteinkomplex, der hauptsächlich für seine Rolle als Eisenspeicher bekannt ist (Torti & Torti, 2002; Theil, 2003; Arosio *et al.*, 2009). Ferritin wird primär intrazellulär exprimiert und kommt in den verschiedensten Kompartimenten vor, ist aber auch im Serum von Säugern nachweisbar. Bei Entzündungen oder Krebs steigt der Ferritinanteil im Serum an (Konijn *et al.*, 1981; Arad *et al.*, 1988; Torti & Torti, 1994). Die Funktion von extrazellulärem Ferritin ist bis heute weitgehend unklar. Rekombinant hergestelltes Ferritin weist sowohl immunsuppressive als auch proinflammatorische Funktionen auf (Matzner *et al.*, 1979; Gray *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2006; Coffman *et al.*, 2009; Ruddell *et al.*, 2009). Ferritin ist ein Heteropolymer aus H (engl. *heavy*)- und L (engl. *light*)-Ketten. 24 dieser Untereinheiten bilden einen Apo-Ferritinkomplex. Das Verhältnis an H- und L-Ferritin unterscheidet sich je nach Gewebe und der Anwesenheit von Eisen, Wachstumsfaktoren, Entzündungen oder Tumoren (Moss *et al.*, 1992). Das H-Ferritin besitzt Ferroxidaseaktivität und sorgt für die Oxidation des Eisens zu Fe^{3+} (Clegg *et al.*, 1980), während die L-Untereinheit am Aufbau des Eisenminerals im Inneren beteiligt ist.

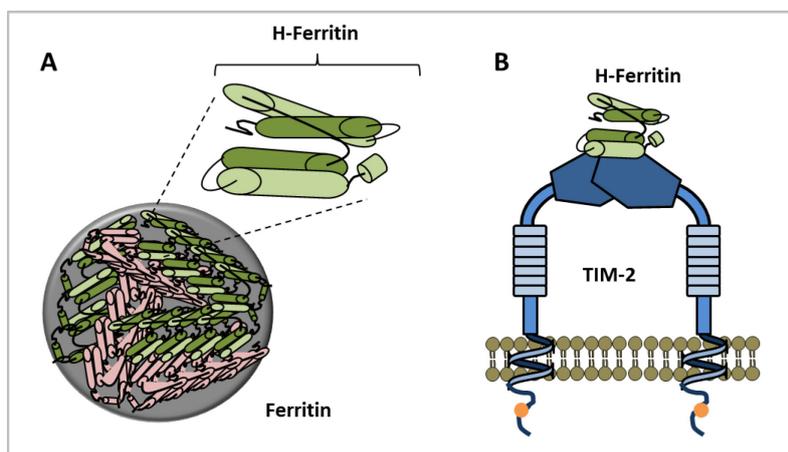


Abb. 3: H-Ferritin, der natürliche Ligand von TIM-2. (A) Das globuläre Protein Ferritin ist hier vereinfacht schematisch dargestellt (grauer Kreis). Es setzt sich aus H-Ferritin (grün) und L-Ferritin (rosa) zusammen. Insgesamt 24 dieser Untereinheiten bilden einen humanen/murinen Ferritinkomplex. In der Vergrößerung ist H-Ferritin (grün) aufgeführt, das aus vier gebündelten Helices und einer kleinen C-terminalen Helix besteht. (B) Modell über die spekulierte Bindung zwischen H-Ferritin (grün) und zwei nicht-kovalent gebundene TIM-2 Moleküle (blau).

TIM-2 ist ein selektiver Rezeptor für H-Ferritin, jedoch nicht für L-Ferritin. Durch die Bindung von TIM-2 an H-Ferritin in der Leber und Niere (Chen *et al.*, 2005; Recalcati *et al.*, 2008) sowie auf Oligodendrozyten (Todorich *et al.*, 2008), spielt TIM-2 auch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase. Zudem ist beschrieben, dass Eisen ins Zellinnere von TIM-2 transfizierten, murinen Nierenzellen transportiert wird, durch die Interaktion von TIM-2 mit H-Ferritin. Dementsprechend scheint TIM-2 am H-Ferritin-vermittelten Eisentransfer beteiligt zu sein (Han *et al.*, 2011). Es ist jedoch noch ungeklärt, ob lösliches TIM-2 auch dazu in der Lage ist oder ob es überhaupt an H-Ferritin binden kann, da die exakte Bindungsstelle bis jetzt nur in der IgV-Region von TIM-2 vermutet wird.

1.4 Ektodomänen-*Shedding* als wichtiger immunregulatorischer Mechanismus

Lösliche, extrazelluläre Proteindomänen können durch die Abspaltung membranständiger Moleküle entstehen. Dieser Vorgang wird auch als Ektodomänen-*Shedding* bezeichnet und ist ein Schlüsselmechanismus in der Immunbiologie für die Funktionsregulierung verschiedenster Zelloberflächenproteine, wie beispielsweise für Rezeptoren und deren Liganden, Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) oder Wachstumsfaktoren. Es wird angenommen, dass bis zu 10 % aller Zelloberflächenmoleküle proteolytisch gespalten werden können (Lewandrowski *et al.*, 2009; Fong *et al.*, 2011; Saftig & Reiss, 2011).

Die limitierte Proteolyse erfolgt durch bestimmte Metalloproteasen, die auch als *Sheddasen* bezeichnet werden und zur Gruppe der Hydrolasen gehören, da sie ein Molekül H₂O an eine Peptidbindung anlagern, diese spalten, und somit die Freisetzung der Ektodomäne verursachen. Bei den prozessierten Molekülen handelt es sich um Transmembranproteine (Reiss & Saftig, 2009), deren Schnittstellen sich dicht an der äußeren Membranoberfläche befinden (Hooper *et al.*, 1997). Demzufolge führt *Shedding* einerseits zur Reduktion der Proteine auf der Zelloberfläche und andererseits werden lösliche Regulatorproteine mit den unterschiedlichsten Eigenschaften in den extrazellulären Raum abgegeben, zu denen auch Zytokine sowie deren Rezeptoren gehören. Diese können sowohl parakrine (auf benachbarte Zellen wirkende) oder autokrine (auf die Zelle selbst zurückwirkende) Signalwege initiieren oder inhibieren, um immunologische Prozesse zu steuern. Ein Beispiel dafür ist der lösliche Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R), der mit Interleukin-6 (IL-6) einen Komplex bildet und Zellen agonistisch stimulieren kann, die keinen membranständigen IL-6R exprimieren. Dieser Mechanismus wird als *trans signaling* bezeichnet (Rose-John, 2012).

Bei einigen Proteinen, wie beispielsweise für Notch, führt die Spaltung in der juxtamembranen Region zur Auslösung einer weiteren proteolytischen Prozessierung innerhalb der Membran, bei der ein Fragment ins Zellinnere freigesetzt wird, welches intrazelluläre Signale induzieren kann. Diese sequentielle Spaltung wird auch als regulierte intramembranäre Proteolyse (*RIPing*) bezeichnet (Steiner & Haass, 2000; Oswald *et al.*, 2001; Scheller *et al.*, 2011a). Das Ektodomänen-*Shedding* spielt eine entscheidende Rolle bei wichtigen Krankheiten, wie bei der Entstehung von Tumoren, Arthritis und Morbus Alzheimer (Dello Sbarba & Rovida, 2002; Lichtenthaler, 2006). Daher ist es unbedingt notwendig, diesen bedeutenden Prozess und dessen Regulation näher zu untersuchen. Eine Hauptgruppe unter den Proteasen, die *Shedding*-Aktivität vermitteln, sind die Disintegrin-ähnlichen Metalloproteinasen (ADAMs - *A Disintegrin And Metalloproteinase*), die im folgenden Abschnitt vorgestellt werden.

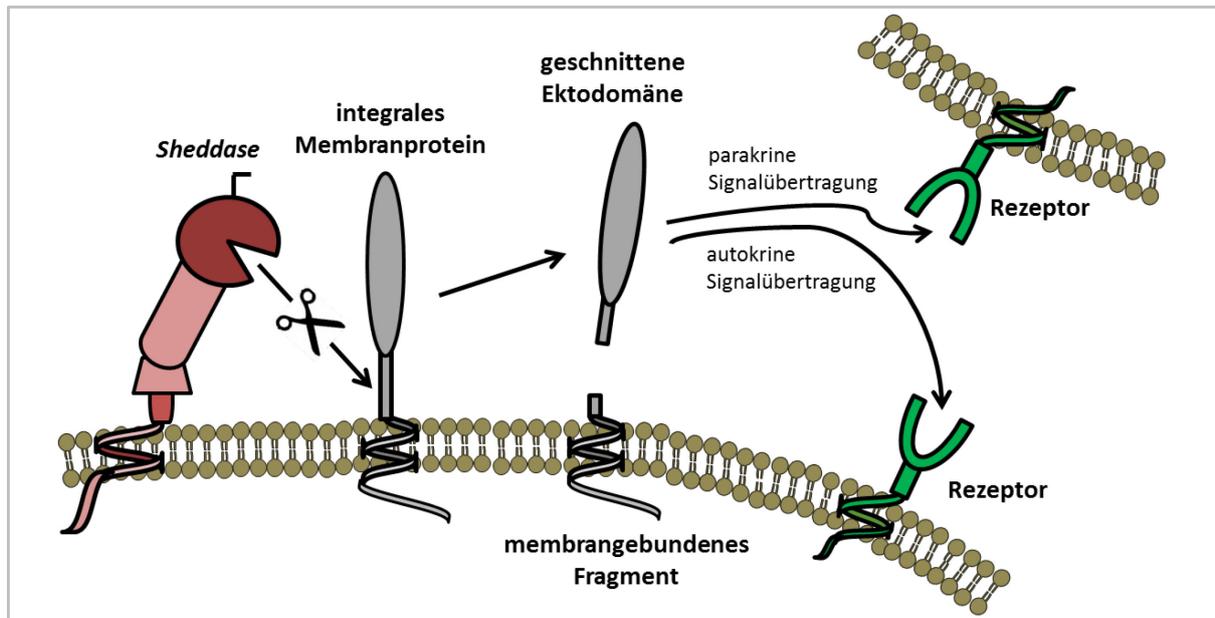


Abb. 4: Vereinfachte schematische Darstellung der proteolytischen Ektodomänen-Spaltung. Eine membranständige Protease (*Sheddase*, rosa) schneidet den extrazellulären Teil eines Membranproteins (grau) ab, das dann als lösliches Protein vorliegt und an Rezeptoren (grün) auf der eigenen Zelle (autokrin) oder benachbarter Zellen (parakrin) binden kann. Das membrangebundene Spaltprodukt verbleibt in der Zellmembran und kann weiter prozessiert werden.

1.5 Die Familie der Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen

Die ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) umfassen eine Familie mit transmembranen und sekretorischen Proteinen, die etwa 750 Aminosäuren lang sind, und sowohl bei der Zelladhäsion als auch bei der proteolytischen Prozessierung von Ektodomänen verschiedenster Zelloberflächenmoleküle eine wichtige Rolle spielen. Es wird angenommen, dass das menschliche Genom für 566 proteolytisch aktive Enzyme codiert. Die ADAM-Proteasen bilden zusammen mit den ADAM-TS (lösliche ADAMs mit einem Thrombospondin Motiv Typ I) und den Schlangengift-Metalloproteinasen (SVMPs) die Unterfamilie der Adamalysine, die wiederum zu den Metzinkinen, eine Untergruppe der Zink-abhängigen Proteasen, gehören. Diese Superfamilie der Metzinkine umfasst auch die Matrixine, die Astacine und die Serralysine (bakterielle Proteasen) (Bode *et al.*, 1993; Stocker & Bode, 1995; Boldt *et al.*, 2001; Cawston & Wilson, 2006; Huxley-Jones *et al.*, 2007). Es besteht eine hohe Sequenzhomologie zwischen den ADAMs und den SVMPs. Von den Letzteren leitet sich der Name „Disintegrine“ ab, aufgrund ihrer ursprünglich entdeckten Funktion, die Integrin-vermittelte Adhäsion zwischen Blutplättchen und Fibrin zu inhibieren (Gould *et al.*, 1990; Blobel, 1997; Schlondorff & Blobel, 1999).

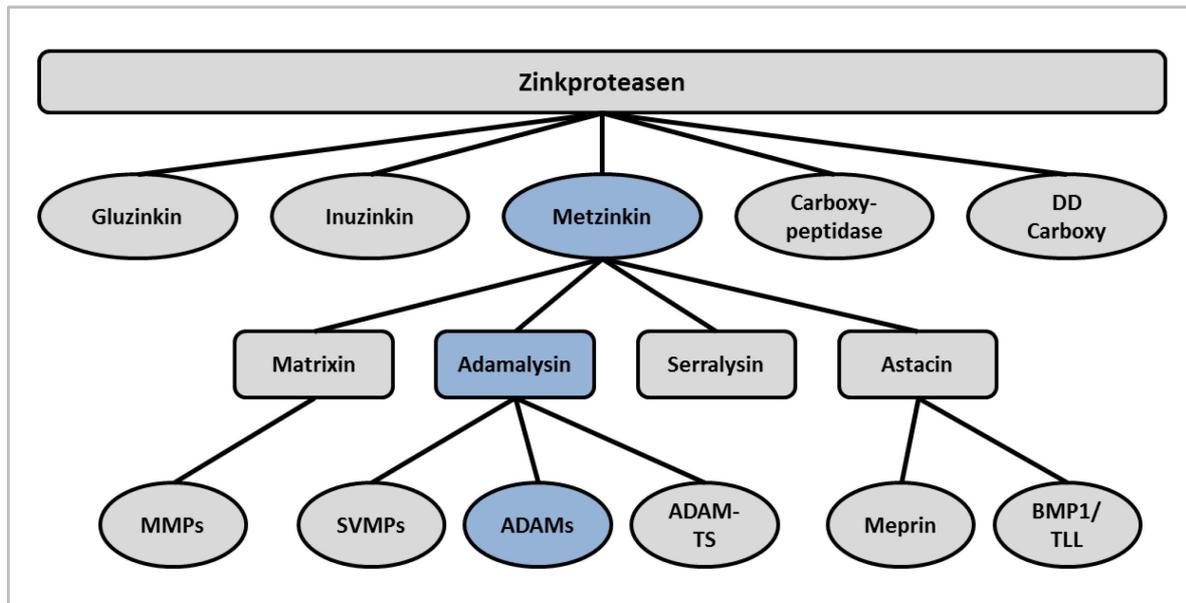


Abb. 5 Hierarchie der Zinkproteasen. Modifiziert nach Huxley-Jones *et al.* (Huxley-Jones *et al.*, 2007). MMPs (Matrix-Metalloproteinasen), SVMPs (Schlangengift-Metalloproteinasen), ADAMs (Disintegrin-ähnliche Metalloproteinasen), ADAM-TS (lösliche ADAMs mit einem Thrombospondin Motiv Typ I).

Die ersten Vertreter der ADAM-Familie wurden zunächst unter der Bezeichnung PH-30 aufgeführt (Primakoff *et al.*, 1987). 1992, beim Screen für monoklonale Antikörper gegen Spermienoberflächenproteine, erfolgte dann die Klassifizierung anhand ihrer Funktion (Blobel *et al.*, 1992), sodass sie heutzutage als ADAM1 (Fertilin- α) und ADAM2 (Fertilin- β) bekannt sind. Mittlerweile wurden 40 ADAMs in den unterschiedlichsten Lebewesen (Hefe, Fadenwurm, Menschen) nachgewiesen (Blobel, 2005; Huxley-Jones *et al.*, 2007; Reiss & Saftig, 2009). Die proteolytische Aktivität ist jedoch nur bei etwa der Hälfte aller ADAMs bekannt (White, 2003; Blobel, 2005). Im Menschen sind beispielsweise nur 13 der 21 identifizierten ADAM-Enzyme aktiv. Essentiell für die Proteaseaktivität ist folgende konservierte Sequenz: HEXGHXXGXXHD (X steht für eine beliebige Aminosäure, D für Asparaginsäure, E für Glutaminsäure, G für Glycin und H für Histidin) (Bode *et al.*, 1993; Reiss & Saftig, 2009). Die drei Histidine dieser Konsensussequenz koordinieren die Bindung des Zinkions (Zn^{2+}) und bilden zusammen mit dem konservierten Methionin in der 1,4- β -Helixwindung (Met-turn genannt) die Grundlage des aktiven Zentrums der ADAM-Proteasen (Stocker *et al.*, 1995).

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum der ADAM-Familie ist ihr typischer Aufbau. Es handelt sich um glykosylierte Typ I Transmembranproteine, bestehend aus einem N-terminalen Signalpeptid, einer folgenden Prodomäne, an die sich die oben beschriebene katalytische Metalloproteasedomäne anschließt, gefolgt von der Disintegrin-ähnlichen Domäne mit einer Cystein-reichen Region und den EGF (*epidermal growth factor*)-ähnlichen Bereich, sowie der Transmembrandomäne und dem intrazellulären Teil (siehe Abb. 6). Die Prodomäne inhibiert die Proteinasefunktion von ADAM10 und ADAM17 (Moss *et al.*, 2007; Gonzales *et al.*, 2008) und wird während des sekretorischen Signalwegs zur Zelloberfläche durch Furinproteasen abgeschnitten, um den inhibitorischen Effekt zu entfernen (Endres *et al.*, 2003; Seals & Courtneidge, 2003). Außerdem weist die Prodomäne Chaperon-ähnliche Funktionen auf, da sie für die korrekte intramolekulare Faltung des Proteins

verantwortlich ist (Roghani *et al.*, 1999; Reiss & Saftig, 2009). Die Disintegrindomäne kann in einigen Fällen mit Integrinen interagieren und inhibiert auf diese Weise Zellkontakte sowie Zelladhäsionen (Edwards *et al.*, 2008). Es wird vermutet, dass die EGF-ähnliche Domäne zusammen mit der Disintegrinregion auch für die Erkennung der Substrate verantwortlich ist. Bis heute wurde keine spezifische Konsensussequenz innerhalb der Substrate gefunden (Caescu *et al.*, 2009). *Shedding*-Studien mit Antikörpern, die an Domänen des extrazellulären Bereichs von CD30 und HB-EGF binden und infolgedessen das stimulierte *Shedding* inhibieren, bestätigen die Hypothese, dass die dreidimensionale Substratstruktur entscheidend ist für die Substraterkennung und Anlagerung der Proteasen (Hansen *et al.*, 2004; Hamaoka *et al.*, 2010).

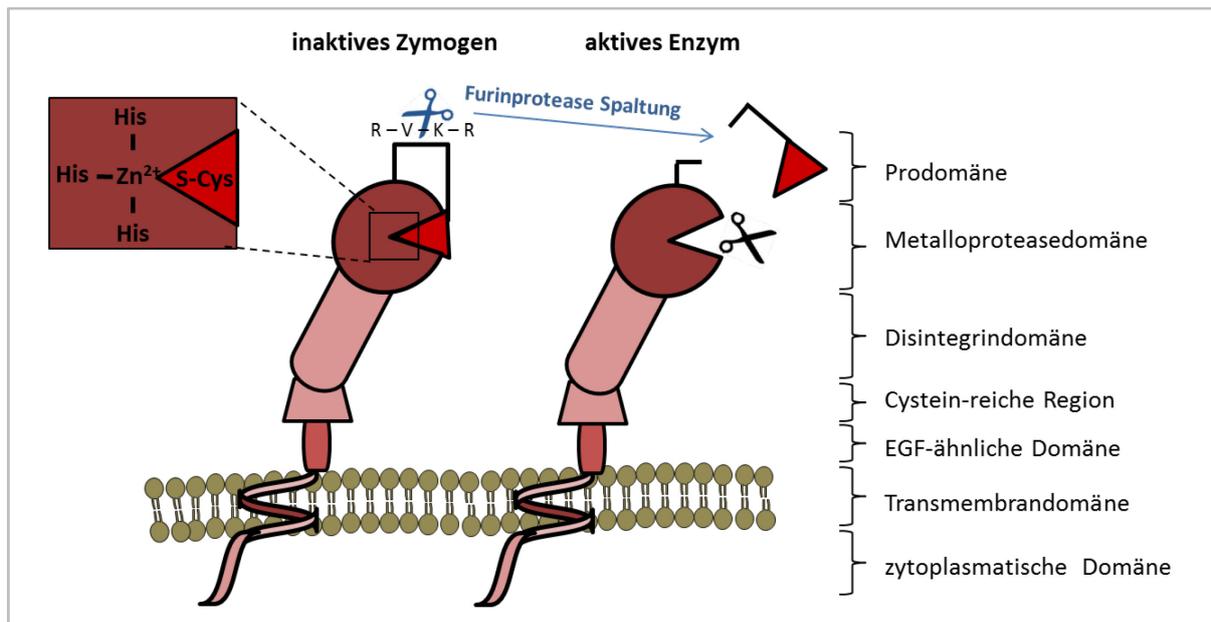


Abb. 6: Vereinfachte schematische Darstellung der Struktur von ADAM10/17. Beide ADAM-Proteasen werden als inaktives Zymogen mit einer Prodomäne synthetisiert. Mithilfe eines Cysteinrestes (Cys) interagiert die Prodomäne mit dem Histidin (His) im aktiven Zentrum und kann so die Bindung und Spaltung der Substrate verhindern. Furinproteasen schneiden während der Prozessierung der ADAMs die Prodomäne an der spezifischen Furinschnittstelle (R-V-K-R) ab. Danach sind die Enzyme aktiv und die Metalloproteasedomäne mit dem Zinkion (Zn^{2+}) bildet das aktive Zentrum der Proteasen.

Das ADAM-vermittelte *Shedding* ist wichtig für viele biologische Prozesse, wie unter anderem der neuronalen Axogenese von Neuriten und Axonen, Zellmigration, Wundheilung, Herzentwicklung, Zellproliferation, Apoptose und Angiogenese (Reiss & Saftig, 2009). An den meisten *Shedding*-Prozessen sind ADAM10 und ADAM17 beteiligt (Edwards *et al.*, 2008), deshalb werden sie und ihre physiologische Relevanz im nächsten Unterpunkt näher erläutert.

1.6 ADAM10 und ADAM17 als bedeutende *Shedding*-Proteasen

1.6.1 ADAM17

ADAM17 wurde als erster Vertreter der ADAM-Familie mit *Shedding* in Verbindung gebracht, da zunächst entdeckt wurde, dass die Metalloprotease ADAM17 membranständiges TNF α (Tumor Nekrose Faktor- α) proteolytisch spalten kann. Dementsprechend ist ADAM17 auch als TACE (*Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme*) bekannt (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997). Inzwischen sind über 70 Substrate für ADAM17 (Pruessmeyer & Ludwig, 2009) beschrieben. Eine bedeutende Rolle spielt ADAM17 bei der Regulation von Entzündungsprozessen, hauptsächlich durch die Prozessierung von Zytokinen wie CX3CL1 und TRANCE, sowie den Zytokinrezeptoren CD30, CD40, IL-1-Rezeptor-II, IL-6-Rezeptor, IL-15-Rezeptor, TNF-Rezeptor I und TNF-Rezeptor II (Peschon *et al.*, 1998; Garton *et al.*, 2001; Becherer & Blobel, 2003; Black *et al.*, 2003; Contin *et al.*, 2003; Hundhausen *et al.*, 2003; Matthews *et al.*, 2003a). Des Weiteren ist ADAM17 an der Regulation von Wachstumsfaktoren und Wachstumshormonen beteiligt, indem es verschiedene Mitglieder der EGF-Familie u.a. TGF α schneidet (Lee *et al.*, 2003; Hinkle *et al.*, 2004; Sahin *et al.*, 2004; Blobel, 2005). Aufgrund der Tatsache, dass ADAM17-*knock-out* Mäuse kurz nach der Geburt sterben, hat ADAM17 auch eine elementare Bedeutung bei der Regulation der Embryogenese. So zeigten diese Mäuse Entwicklungsdefekte an Epithelien und am Herzen (Peschon *et al.*, 1998; Hinkle *et al.*, 2004; Sahin *et al.*, 2004). Inzwischen wurden jedoch Mäuse generiert, die lebensfähig sind und in allen Geweben nur etwa 5 % an ADAM17 exprimieren (Chalaris *et al.*, 2010) oder konditionale *knock-out* Mäuse, die nur in bestimmten Geweben kein ADAM17 exprimieren. Daher ist es nun möglich *in vivo* Analysen zu ADAM17 in der Maus durchzuführen.

1.6.2 ADAM10

ADAM10 wurde ursprünglich aus Rinderhirn isoliert und anfangs als „*myelin basic protein degrading enzyme*“ (MBP) bezeichnet (Chantry *et al.*, 1989) und dann nach seiner Klonierung als ADAM10 klassifiziert (Howard *et al.*, 1996). In *Drosophila melanogaster* heißt das Ortholog *Kuzbanian* (KUZ) und vermittelt die proteolytische Spaltung von Notch. Dadurch ist *Kuzbanian* u.a. bei der Entwicklung der Augen, der Flügel sowie an der Neurogenese von *Drosophila melanogaster* beteiligt (Rooke *et al.*, 1996). ADAM10 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, welches besonders stark im Gehirn nachweisbar ist (Seals & Courtneidge, 2003). Es sind diverse Interaktionspartner bekannt, wie Eve1 (Tanaka *et al.*, 2004), SAP97 (Marcello *et al.*, 2007) und AP2 (Marcello *et al.*, 2013), die mit der intrazellulären Domäne von ADAM10 interagieren können. Des Weiteren existiert im cytoplasmatischen Bereich ein Motiv, welches für die basolaterale Sortierung verantwortlich ist (Wild-Bode *et al.*, 2006) und eine Arginin-reiche Sequenz, die für das Verlassen des Endoplasmatischen Retikulums entscheidend ist (Marcello *et al.*, 2010). Die Tatsache, dass ADAM10 selbst durch Proteasen gespalten werden kann, ist besonders interessant. Denn ADAM9 und ADAM15 können die extrazelluläre Domäne von ADAM10 freisetzen. Daraufhin ist der γ -Sekretase-Komplex in der Lage, den intrazellulären Teil

von ADAM10 zu schneiden, sodass das abgespaltene C-terminale Fragment ins Zellinnere translozieren kann. Dementsprechend weist ADAM10 nicht nur eine Metalloproteinasefunktion als membranständiges Protein auf, sondern stellt nach eigener Spaltung auch ein potentielles Signalmolekül dar (Tousseyn *et al.*, 2009). Während der frühen Embryogenese ist ADAM10 von großer Bedeutung, da ADAM10-defiziente Mäuse schwerwiegende Entwicklungsstörungen bei der Neurogenese, in den Somiten und im Kardiovaskularsystem aufweisen, die vermutlich mit dem Notch-Signalweg in Verbindung stehen. Die Mäuse sterben dann bereits pränatal am Embryonaltag 9,5 (Hartmann *et al.*, 2002). Ferner scheint ADAM10 auch in pathophysiologischen Prozessen involviert zu sein, denn Studien belegen, wenn ADAM10 verstärkt exprimiert wird, kann es zur Tumorausbildung kommen (McCulloch *et al.*, 2004; Gavert *et al.*, 2007; Ko *et al.*, 2007). Genau wie ADAM17 ist auch die Metalloproteinase ADAM10 an vielen *Shedding*-Prozessen und Regulationsnetzwerken beteiligt (Edwards *et al.*, 2008). Über 50 Substrate für ADAM10 wurden bestimmt, darunter Wachstumsfaktoren (z.B. Betacellulin, EGF oder HB-EGF) (Sahin *et al.*, 2004), Zytokine (z.B. CX3CL1 oder CXCL16) (Hundhausen *et al.*, 2003; Abel *et al.*, 2004; Gough *et al.*, 2004) und Adhäsionsmoleküle (z.B. N- und E-Cadherin) (Maretzky *et al.*, 2005a; Reiss *et al.*, 2005; Reiss *et al.*, 2006). Außerdem schneidet ADAM10 auch den Immunglobulin E-Rezeptor CD23 (Weskamp *et al.*, 2006) sowie den IL-6-Rezeptor (Matthews *et al.*, 2003a; Chalaris *et al.*, 2011; Garbers *et al.*, 2011).

1.7 Mechanismen der *Shedding*-Regulation

1.7.1 ADAM17-vermitteltes *Shedding*

Mittlerweile ist bekannt, dass *Shedding* einer Ektodomäne durch verschiedene Stimulanzen gesteigert werden kann. Daher unterscheidet man zwischen zwei Formen des *Sheddings*, einerseits das basale oder konstitutive *Shedding* und andererseits das induzierte. Ein sehr starker *Shedding*-Induktor von ADAM17 ist Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA). Dieser Phorbolster aktiviert die Proteinkinase C (PKC) und führt zur Phosphorylierung von ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinase*), denn das ADAM17-abhängige *Shedding* kann durch die Inhibition der PKC und/oder ERK gehemmt werden (Xu & Derynck, 2010). Außerdem existieren putative Phosphorylierungsstellen innerhalb der intrazellulären Domäne von ADAM17, nicht nur für die PKC, sondern auch für die p38-MAPK (*Mitose Activated Protein Kinase*) (Fan & Derynck, 1999; Gechtman *et al.*, 1999; Diaz-Rodriguez *et al.*, 2002). Wie Studien belegen, kommt es nach der Stimulation mit Anisomycin zur Phosphorylierung von ADAM17 an Thr⁷³⁵ über p38-MAPK und zur Freisetzung von TGF α -Liganden, die wiederum EGF-Signalwege anschalten können. Die Substitution von Thr⁷³⁵ zu Alanin in einer generierten ADAM17-Mutante hat dabei keinen Einfluss auf das PMA-vermittelte *Shedding*, hemmt jedoch das p38-MAPK-aktivierte Prozessieren von TGF α . Ferner kann durch die Induktion der p38-MAPK die Expression von ADAM17 auf der Zelloberfläche erhöht werden, unabhängig von der katalytischen Proteaseaktivität (Xu & Derynck, 2010). ADAM17 ist größtenteils intrazellulär gespeichert und der Transport zur Plasmamembran steigt nach der

Phosphorylierung am Thr⁷³⁵ an (Soond *et al.*, 2005). Innerhalb der Zellmembran befindet sich ADAM17 in sogenannten *lipid rafts* (Tellier *et al.*, 2006). Diese Membranbereiche sind besonders reich an Cholesterol (Lingwood & Simons, 2010) und durch die Abnahme von Cholesterol durch Depletion kann ADAM17-abhängiges *Shedding* induziert werden (Matthews *et al.*, 2003a).

Einige Studien, mit einer ADAM17-Deletionsmutante ohne intrazellulären Teil, beschreiben allerdings auch, dass die zytoplasmatische Domäne von ADAM17 nicht essentiell ist für die PMA-stimulierte Spaltung von ADAM17 Substraten (Reddy *et al.*, 2000; Le Gall *et al.*, 2010). Willems und seine Kollegen vertreten die These, dass extrazelluläre Protein-Disulfid-Isomerasen (PDIs) der Schlüsselmechanismus für die PMA-vermittelte ADAM17-Aktivierung ist. PMA induziert dabei die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dadurch verändert sich der Redoxzustand der Zelle und die PDIs werden inaktiviert, woraufhin sich das Muster der Disulfidbrückenausbildung ändert und ADAM17 in eine aktive Konformation übergeht. Außerdem scheint es bei diesem Prozess auch zur Bewegung von ADAM17 und seinen Substraten in der Plasmamembran zu kommen (Willems *et al.*, 2010). Somit kann die Aktivierung von ADAM17 auch unabhängig von intrazellulären Signalwegen erfolgen. Ein weiterer ADAM17 Stimulus ist die Induktion von Apoptose, die zum *Shedding* von L-Selectin (Wang *et al.*, 2010) und humanen IL-6R (Chalaris *et al.*, 2007) führt. Die durch Apoptose ausgelöste Spaltung von hIL-6R erfolgt ohne die Aktivierung von ERK, PKC und p38-MAPK. Das ADAM17-vermittelte *Shedding* von L-Selektin und TNFR1 zeigt außerdem eine Beteiligung von *toll-like* Rezeptoren beim Aktivierungsprozess (Morrison *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011), wobei die Prozessierung des TNFR1 durch ADAM17 ebenfalls ohne p38-MAPK noch ERK Beteiligung abläuft. Zusammenfassend spielt ADAM17 eine untergeordnete Rolle bei nicht-stimulierten, sogenannten konstitutiven *Shedding*-Prozessen und gilt eher als induzierbare Protease (Zheng *et al.*, 2002; Horiuchi *et al.*, 2007).

1.7.2 ADAM10-abhängiges *Shedding*

ADAM10 gilt ursprünglich als hauptsächlich konstitutiv aktive Protease, obwohl für sie auch induziertes *Shedding* beschrieben ist (Maretzky *et al.*, 2005b). So ist beispielsweise die ADAM10-abhängige Spaltung von Cadherinen durch das Ionophor Ionomycin oder Agenzien wie Staurosporin oder Methylcyclodextrin (MCD) stimulierbar (Maretzky *et al.*, 2005a; Reiss *et al.*, 2005). Studien zeigen, wenn ADAM10 in Membranbereichen lokalisiert ist, die viele Tetraspanine wie CD9, CD81 und CD82 aufweisen, die die Spaltungsaktivität von ADAM10 für verschiedene Liganden des EGF-Rezeptors und TNF α regulieren (Arduise *et al.*, 2008). Außerdem kann es nach der Bindung einiger Liganden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) zum ADAM10-vermitteltem *Shedding* von Liganden des EGF-Rezeptors kommen, wodurch wiederum EGF-Rezeptoren benachbarter Zellen transaktiviert werden können. Folglich werden dabei auch Ras und ERK induziert (Yan *et al.*, 2002; Blobel, 2005).

Ein entscheidender Regulationsmechanismus für ADAM10 ist der Ca²⁺-Anstieg im Zellinneren. Das Calcium-Ionophor Ionomycin (IM) ist ein bedeutender Stimulus, der die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöht und für

zahlreiche Analysen verwendet wird (Hundhausen *et al.*, 2007). Da durch Ionomycin auch ADAM17 in ADAM10-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) stimuliert werden konnte, weist das Ionophor eine gewisse Kreuzreaktivität mit ADAM17 auf (Le Gall *et al.*, 2009) im Gegensatz zu PMA, von dem bis jetzt nur bekannt ist, dass es ADAM17 und nicht ADAM10 aktiviert.

Eine weitere Möglichkeit, den intrazellulären Calciumspiegel in der Zelle zu erhöhen, ist die Ausbildung von Membrankanälen durch Rezeptoren. So ist der P2X7-Rezeptor in der Lage, nach der Stimulation mit ATP (Adenosinriphosphat) oder dem ATP-Analogen BzATP (2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat), eine nicht-selektive Ionenpore zu generieren, die Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ Ionen, aber auch große hydrophile Stoffe (bis 900 kDa) transportiert (North, 2002). Für die Generierung solch einer Pore lagern sich vermutlich (mindestens) drei P2X7-Rezeptoren zusammen. Ein einzelner P2X7-Rezeptor besteht aus zwei Transmembrandomänen, die über einen langen, extrazellulären Teil miteinander verbunden sind. Das N- und C-terminale Ende ragen dabei ins Zellinnere (Skaper *et al.*, 2010). Dieser Aufbau ist charakteristisch für alle 7 Vertreter der P2X-Unterfamilie, die zusammen mit den G-Protein-gekoppelten P2Y-Rezeptoren die Familie der P2-Rezeptoren darstellt. Zahlreiche hämatopoetische Zellen wie u.a. Mastzellen, Erythrozyten, Monozyten, dendritische Zellen, B und T Lymphozyten, exprimieren den P2X7-Rezeptor (Skaper *et al.*, 2010). Aber auch auf Astrozyten, Microglia und Schwannschen Zellen des zentralen Nervensystems (Ferrari *et al.*, 1996; Collo *et al.*, 1997; Sim *et al.*, 2004) ist der Rezeptor nachweisbar.

Der P2X7-Rezeptor stellt eine Art ATP-Sensor dar und wird erst aktiviert, wenn hohe ATP-Mengen in den extrazellulären Raum ausgeschüttet werden, beispielsweise durch sterbende Zellen (Dubyak & el-Moatassim, 1993) oder aktivierte Immunzellen (Filippini *et al.*, 1990) und Makrophagen (Sikora *et al.*, 1999), aber auch bei Entzündungsreaktionen (Lazarowski *et al.*, 2000). Die extrazelluläre ATP-Aktivierung des P2X7R kann zur Freisetzung von IL-1 β (Ferrari *et al.*, 1997a; Ferrari *et al.*, 1997b; Skaper *et al.*, 2010), CD21 (Sengstake *et al.*, 2006), CD23 (Gu *et al.*, 1998; Sluyter & Wiley, 2002; Farrell *et al.*, 2010), CD27 (Moon *et al.*, 2006), L-Selectin/CD62L (Gu *et al.*, 1998; Sengstake *et al.*, 2006; Scheuplein *et al.*, 2009), IL-6R (Garbers *et al.*, 2011) sowie zur Prozessierung des Amyloid Precursor Proteins (APP) (Delarasse *et al.*, 2011) führen. Damit kann der P2X7-Rezeptor als molekulares Werkzeug genutzt werden, um durch Stimulation mit BzATP die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration zu erhöhen und ADAM Proteasen zu aktivieren. Ein sehr wichtiger intrazellulärer Mediator, der bei den verschiedensten Calciumprozessen eine Rolle spielt, ist Calmodulin. Die Bedeutung von Calmodulin beim *Shedding* wird daher im nächsten Unterpunkt beschrieben.

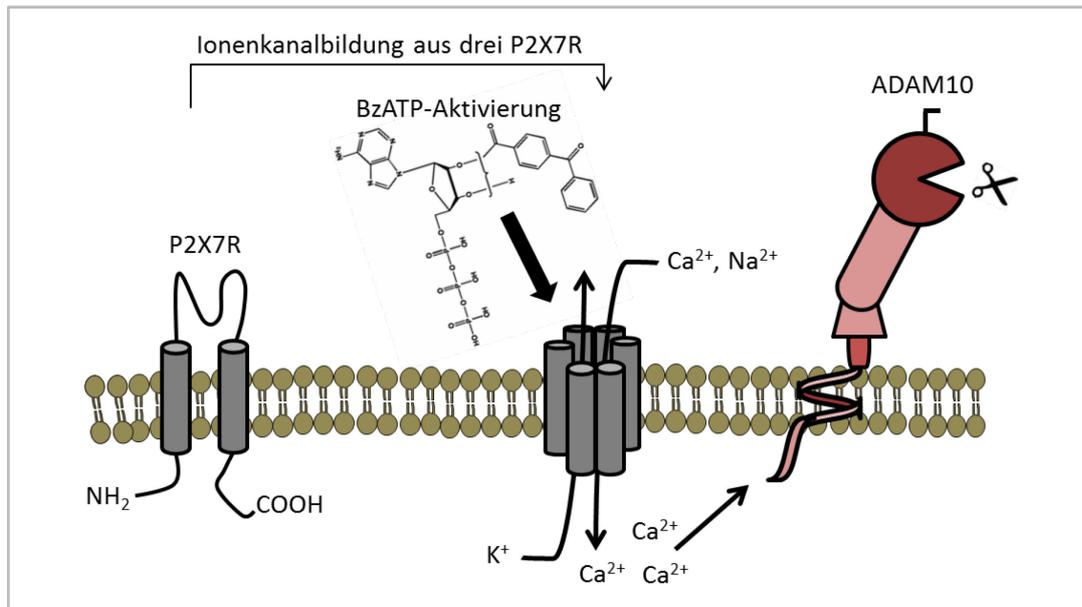


Abb. 7: Der P2X7-Rezeptor (P2X7R). Links ist ein einzelner P2X7R schematisch dargestellt. Er besteht aus zwei Transmembrandomänen, die über einen langen extrazellulären Teil verbunden sind. Sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Ende ragen ins Zytoplasma. Rechts sind drei P2X7-Rezeptoren zu einem Ionenkanal zusammen gelagert. Nach einer BzATP (2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat)-Anlagerung können Calciumionen (Ca^{2+}) durch die P2X7R-Pore in die Zelle einströmen und beispielsweise ADAM10 aktivieren.

1.7.3 Shedding-Regulation durch Calmodulin und dessen Inhibitor W7

Calmodulin (CaM) ist ein ubiquitär exprimiertes, 148 Aminosäuren langes Protein (17 kDa), welches vier Calciumionen binden kann, die zu einer Konformationsänderung innerhalb des CaM Proteins führen, sodass ein hydrophober Bereich aufgedeckt wird, mit dessen Hilfe es an Endodomänen von Proteinen binden kann. Es ist an vielen Calcium-abhängigen *Second-messenger*-Prozessen beteiligt, wie z.B. Nervenwachstum, Gedächtnisprozesse, Apoptose, Entzündungen und Muskelkontraktionen (Persechini *et al.*, 1989; James *et al.*, 1995; Rhoads & Friedberg, 1997).

Interessanterweise scheint CaM aber auch bei der Regulation von *Shedding* eine große Bedeutung zu haben. So konnte bereits für L-Selektin gezeigt werden, dass durch die Blockade der Interaktion von Calmodulin mit L-Selektin, *Shedding* ausgelöst wird (Kahn *et al.*, 1998). Dabei wird angenommen, dass durch die Calmodulin-Bindung die extrazelluläre Konformation von L-Selektin sich dahingehend verändert, dass ADAM17 nicht mehr schneiden kann (Gifford *et al.*, 2012). Die Spaltung von L-Selektin steigt an, wenn die CaM-L-Selektin-Bindung durch Punktmutationen in der intrazellulären Domäne von L-Selektin oder durch die Verwendung des CaM-Inhibitors W7 unterbrochen wird (Matala *et al.*, 2001).

W7 (N-(6-Aminoheptyl)-5-chlor-1-naphthalinsulfonamid) ist eine organisch-chemische Verbindung, die natürlich nicht vorkommt, sondern extra für Forschungszwecke synthetisch hergestellt wurde. Es ist in der Lage, mit der hydrophoben Tasche von CaM zu interagieren und auf diese Weise die CaM-Bindung an Zielproteine zu hemmen (Osawa *et al.*, 1998). Deshalb wird W7 auch als Calmodulin-Antagonist bezeichnet.

Die W7-vermittelte *Shedding*-Aktivierung von Membranproteinen kann sowohl Ca^{2+} -abhängig sein, aber auch auf eine Ca^{2+} - und PKC-unabhängige Weise erfolgen (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2000). Mittlerweile sind neben L-Selectin auch zahlreiche andere Membranproteine, wie GPVI (Andrews *et al.*, 2002; Gardiner *et al.*, 2005), Sema4D (Mou *et al.*, 2013), APP (Canobbio *et al.*, 2011) und PECAM-1 (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2004) bekannt, bei denen der CaM-Antagonist W7 eine ADAM-abhängige Spaltung induzieren kann. Viele von diesen Rezeptoren enthalten basische Reste in ihrer zytoplasmatischen Region sowie ein CaM-Bindungsmotiv. Eine Übersicht zur W7-Induktion von CaM-vermittelten *Shedding* durch Metalloproteasen ist in Abb. 8 aufgeführt.

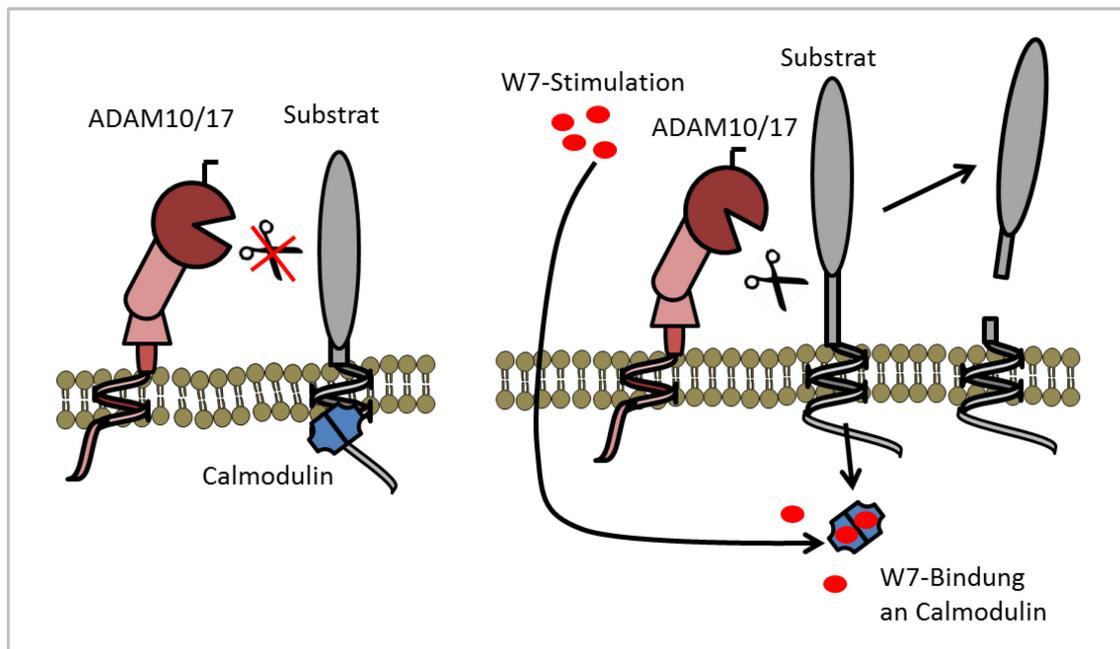


Abb. 8: Vereinfachte schematische Darstellung der hypothetischen *Shedding*-Regulation durch Calmodulin und W7. Auf der linken Seite bindet Calmodulin (blau) an den transmembranen-intrazellulären Bereich des Substrates (grau). Dadurch kommt es vermutlich zu einer Konformationsänderung des Substrates, durch die ADAM10/17 (rot) nicht mehr in der Lage ist, das Substrat zu erkennen oder zu spalten. Auf der rechten Seite gelangt W7 (N-(6-Aminohexyl)-5-chlor-1-naphthalinsulfonamid) durch die Membran in den intrazellulären Raum und interagiert mit Calmodulin. Folglich löst sich Calmodulin von der Endodomäne des Substrates und das Substrat verändert sich daraufhin so, dass die Protease es erkennen und spalten kann. (Auf die Rolle von Calcium wurde in diesem Modell nicht eingegangen.)

1.7.4 Inhibition von ADAM10 und ADAM17

Ein natürlicher Inhibitor für ADAM17 ist das Protein TIMP-3 (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*), welches auch in der Lage ist, ADAM10 zu inhibieren (Amour *et al.*, 1998). Das TIMP-1 Protein stellt einen weiteren natürlichen Inhibitor für ADAM10 dar, das aber nicht die ADAM17-Aktivität beeinträchtigt (Amour *et al.*, 2000). Neben diesen natürlich vorkommenden ADAM-Inhibitoren gibt es zahlreiche synthetisch hergestellte Inhibitoren wie Batimastat und Marimastat, die ein breites Spektrum an Metalloproteasen (ADAM10, 17 und MMP1, 3, 9, 13) hemmen. Um das Problem der Redundanz zwischen den Metalloproteasen untersuchen zu können, wurde versucht chemische Moleküle auf Hydroxamat-Basis zu entwickeln,

die spezifisch für bestimmte Zink-abhängige Proteasen sind (Kottirsch *et al.*, 2002; Sawa *et al.*, 2002). GI254023X (GI) und GW280264X (GW) sind zwei dieser spezifischen Inhibitoren. Dabei handelt es sich um Chelatbildner, die das für die proteolytische Aktivität benötigte Zink im katalytischen Zentrum binden und so die Metalloprotease inhibieren. Dieser Prozess der Hemmung ist reversibel. GI gilt vorrangig als ADAM10-Inhibitor, da es die ADAM10-abhängige konstitutive Spaltung des IL-6-Rezeptors sowie der Chemokine CX3CL1 und CXCL16 hemmt, aber nicht das ADAM17-vermittelte *Shedding* dieser Substrate nach PMA-Stimulation. Außerdem zeigt GI in kinetischen Inhibitionsanalysen eine mehr als 100-fach höhere Hemmung für ADAM10 im Vergleich zu ADAM17. GW kann dagegen sowohl das konstitutive als auch das PMA-induzierte *Shedding* der Substrate inhibieren und ist somit für beide Proteasen spezifisch (Ludwig *et al.*, 2005).

Eine andere Möglichkeit, die ADAM10 Proteaseaktivität zu hemmen, ist die Verwendung der in *E.coli* rekombinant hergestellten ADAM10 Prodomäne (A10Pro), die kompetitiv und sehr spezifisch die katalytisch-aktive Metalloproteasedomäne von ADAM10 inhibiert (Moss *et al.*, 2007). Außerdem wurden in dieser Arbeit zur *Shedding*-Analyse murine embryonale Fibroblastenzelllinien (MEFs) aus ADAM10- und/oder ADAM17-defizienten Mausembryonen verwendet, bei denen das jeweilige Gen zerstört wurde und damit keine Proteaseaktivität vorhanden war.

1.8 Fragestellungen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das proteolytische Ektodomänen-*Shedding* von TIM-2 untersucht werden. Ob eine lösliche Variante von TIM-2 existiert, war zu Beginn der Arbeit noch vollkommen unklar. Ein Indiz für diese Spekulation bot jedoch die Tatsache, dass bereits eine lösliche TIM-1 Variante beschrieben ist. Außerdem ist TIM-2 strukturell sehr ähnlich aufgebaut wie das sogenannte Fraktalkin (membranständiges CX3CL1 Chemokin), das durch ADAM10 und 17 prozessiert wird. Deshalb galt es zu überprüfen, ob und welche Metalloproteasen, in der Lage sind, TIM-2 zu schneiden. Dabei stellte sich auch die Frage, ob die bekannten ADAM-Aktivatoren PMA, BzATP oder Ionomycin fähig sind, eine Spaltung von TIM-2 zu vermitteln und ob eine oder unterschiedliche Proteasen am konstitutiven oder/und induzierten *Shedding* beteiligt sind. ADAM-Proteasen schneiden meistens ihr Substrat im extrazellulären Raum nahe der Zellmembran. Daher sollte mithilfe von TIM-2 Deletionsmutanten untersucht werden, wo die Proteaseschnittstelle lokalisiert ist beziehungsweise welche Region einen Einfluss auf die Substraterkennung oder das *Shedding*-Verhalten hat. Die Hypothese, dass lösliches TIM-2 auch an den TIM-2-Liganden H-Ferritin binden kann, sollte mittels ELISA-Assays und Immunopräzipitationen belegt werden. Ferner musste geklärt werden, ob das Calcium-bindende Protein Calmodulin oder dessen Inhibitor W7 eine Rolle beim TIM-2 *Shedding* spielt, da eine erhöhte Calciumkonzentration für die Aktivierung von ADAM10 entscheidend ist. Schließlich stellte sich auch die Frage, ob endogenes TIM-2 auf isolierten B Zellen (aus der murinen Milz) gespalten wird.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien, Geräte und Lösungen

2.1.1 Technische Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten technischen Geräte und Verbrauchsmaterialien sind alphabetisch in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1: Verwendete technische Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Gerät/Material	Hersteller
Alufolie	Carl Roth GmbH
Autoklavierbeutel	Sarstedt AG & Co
Bakterieninkubator/-schüttler innova4000	New Brunswick Scientific
BDFACSCanto	BD Biosciences Pharmingen
Deckgläschen	Thermo Fischer Scientific
Drigalski-Spatel	Carl Roth GmbH
Einmalkanülen	Carl Roth GmbH
Einmalspritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml)	Sarstedt AG & Co
Eismaschine	Scotsman
Elektrophorese-Zubehör für SDS-Mini-Gele	Bio-Rad
ELISA-Platte „Nunc Immuno“ (96-Loch)	Thermo Fischer Scientific
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Filter (steril; 0,2 µm, 0,4 µm) „Filtropur S 0,2; S 0,45“	Sarstedt AG & Co
Fluoreszenzmikroskop	Olympus
Gefrierschrank (-20)	Liebherr
Gefrierschrank (-80)	Liebherr
Gelelektrophoresekammern „Mini-Sub® Cell GT“	Bio-Rad
Heizblock „Thermomixer comfort“	Eppendorf
Inverses Durchlichtmikroskop „TELAVAL 3“	Zeiss
Kamera und UV-Tisch „Multimage Light Cabinet“	Alpha Innotech Cooperation
Küvetten aus Polystyrol	Carl Roth GmbH
Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt AG & Co
Multipipette	Eppendorf
Neubauer-Zählkammer „Neubauer improved“	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Objektträger	Thermo Fischer Scientific
Parafilm	Carl Roth GmbH
Pasteurpipetten	Sarstedt AG & Co
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co
pH Meter „766“	Calimatic
Photometer „ELISA Reader SLT Rainbow Tecan“	SLT Laborinstrumente
Photometer „NanoDrop ND-1000“	Thermo Fischer Scientific
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe „pipetus®-akku“	Hirschmann Laborgeräte
Stromversorgungsgeräte „PowerPac 200/300“	Bio-Rad
Reinstwasseranlage „Milli-Q Academic System“	Millipore

Roller „Mixer SRT9“	Stuart
Schüttler „Vortex Genie 2“	Scientific Industries Inc.
Steril-Arbeitsbank „Clean Air“	Heraeus Instruments
Thermocycler „PEQ STAR 96 Universal Gradient“	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Thermomixer „compact“	Eppendorf
„Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell“	Bio-Rad
Ultrazentrifuge „L7-65“	Beckmann Coulter GmbH
Universal-Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co
Vakuuzentrifuge „Speed-Vac Plus UVS400A-“	Savant
Waage	Kern
Wasserbad	Labotec
Zellkultuinkubator „HeraCell CO ₂ - Inkubator“	Heraeus Instruments
Zellkulturflaschen/schalen	Sarstedt AG & Co
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-Loch)	Greiner bio-one
Zentrifuge „5417R“	Eppendorf
Zentrifuge „Megafuge 1.0“	Heraeus Instruments

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind in Tab. 2 alphabetisch aufgeführt.

Tab. 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie/Reagenz	Bezugsquelle
4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Agar-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
BM blue POD-Substrat	Roche Diagnostics, Mannheim
Calmodulin-Sepharose 4B	GE Healthcare Europe GmbH,
D-Glucose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DMSO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol 96 % vergällt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hefeextrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Isopropanol	Walter CMP GmbH, Kiel
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Maltose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
MES-Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Walter CMP GmbH, Kiel
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MOPS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumazid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin 100 x	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Transfermembran	GE Healthcare Europe GmbH,
Protease Inhibitor Complete Tabletten	Roche, Mannheim
Protein A/G Sepharose	GE Healthcare Europe GmbH,
Protogel Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Puromycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Salzsäure (37 %ig)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Schwefelsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sepharose 4B	GE Healthcare Europe GmbH,
Sodiumdodecylsulfat (SDS) Tabletten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Life Technologies GmbH
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Tryptone/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TurboFect-Transfektionslösung	Fermentas, St. Leon-Rot
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zinkchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
pNPP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

2.1.3 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Alle benötigten Puffer sind mit ihrer Zusammensetzung in Tab. 3 beschrieben.

Tab. 3: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Alkalische Phosphatase (AP)-Puffer	0,1 M Glycin 1 mM MgCl ₂ 1 mM ZnCl ₂ , pH 10,8
Coomassie-Entfärbelösung	7 % (v/v) Eisessig 5 % (v/v) Methanol
Coomassie-Färbelösung	0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Eisessig
DNS-Ladepuffer (Blau); 6 x	60 % (v/v) Glycerin 0,15 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (v/v) Xylencyanol 60 mM EDTA 10 mM Tris-HCl, pH 7,4
Erythrozytenlysepuffer (B Zellisolation)	150 mM NH ₄ Cl 10 mM K ₂ HCO ₃ 100 nM EDTA
FACS-Puffer	1 % (w/v) BSA in PBS
MACS-B Zellseparationspuffer (steril)	0,5 % (v/v) BSA 2 mM EDTA in PBS
Laemmli-Probenpuffer für SDS-Gele; 5 x	10 % (w/v) SDS 5 % (w/v) β-mercaptoethanol 50 % (v/v) Glycerin 13 % (w/v) Bromphenolblau 312 mM Tris-HCl (pH 6,8)
Laufpuffer für SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
MACS-Puffer (B Zellisolation)	0,5 % (w/v) BSA 2 mM EDTA in PBS (pH 7,2)
milder Lysepuffer	50 mM Tris, pH 7,5 150 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100 pro 50 ml: 1 x Protease-Inhibitor Complete Tablette
PBS-T	0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS
Phosphate Buffered Saline (PBS)	140 mM Natriumchlorid 3 mM Kaliumchlorid 4 mM Dinatriumhydrogenphosphat 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat
S1 Resuspensionspuffer (DNS Mini-Präparation)	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 100 µg/ml RNaseA

S2 Lysepuffer (DNS Mini-Präparation)	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
S3 Neutralisationspuffer (DNS Mini-Präparation)	2,8 mM Kaliumacetat (pH 5,1)
Sammelgel, 4 % (SDS-PAGE)	3,725 ml H ₂ O 625 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 50 µl 10 % SDS 670 µl 30 % Polyacrylamid 5 µl TEMED 25 µl 10 % APS
„Stripping“-Puffer (Western Blot)	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 2 % SDS 0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol
TAE-Puffer	40 mM Tris 0,11 % (v/v) Eisessig 1 mM EDTA (pH 8,0)
TBE-Puffer für Agarosegelelektrophorese	44,5 mM Borsäure 44,5 mM Tris-HCl 10 mM EDTA (pH 8,0)
Transferpuffer für Western Blot	40 M Tris-HCl 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
Trenngel, 10 % (SDS-PAGE)	3,87 ml H ₂ O 2,55 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 100 µl 10 % SDS 3,3 ml 30 % Polyacrylamid 10 µl TEMED 100 µl 10 % APS
Tris Buffered Saline (TBS)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl
Western Blot-Blockpuffer	5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS
ELISA-Blockpuffer	1 % (w/v) BSA in PBS

2.1.4 Antikörper

Die Bezeichnung der verwendeten Antikörper, ihre Verwendung und Gebrauchsverdünnung, sowie Herkunft sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Antikörper.

Antikörper	erzeugt in	Verwendung (Gebrauchsverdünnung)	Bezugsquelle
Primärantikörper			
α-Flag (M1)	Kaninchen	Western Blot (1 µg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
α-PC (HPC4)	Maus	Western Blot (1 µg/ml)	Gabe von Dr. Inken Lorenzen, Biochemisches Institut, CAU Kiel
POD-α-human Fc (IgG)	Ziege	ELISA, IP (1 µg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
α-Flag (M2) IgG1	Maus	FACS (1 µg/100 µl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PE-α-Maus-TIM-2 IgG1κ [F37-2C4]	Maus	FACS (1 µg/100 µl)	BioLegend, San Diego, CA, USA
PE-IgG1κ Isotyp	Maus	FACS (1 µg/100 µl)	BioLegend, San Diego, CA, USA
α-CD16/32		Fcγ-Rezeptor-Blockung (1 µg/100 µl)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FITC-α-Maus-CD45R/B220	Ratte	FACS (1 µg/100 µl)	BioLegend, San Diego, CA, USA
FITC-IgG2ak Isotyp	Ratte	FACS (1 µg/100 µl)	BioLegend, San Diego, CA, USA
α-Maus-IgM (F(ab') ₂ Fragment, µ Kette-spezifisch	Ziege	B Zellaktivierung (5µg/ml)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA
α-Maus/Rat CD40 (HM40-3)	Hamster	B Zellaktivierung (5 µg/ml)	eBioscience San Diego, CA, USA
α-placental alkaline phosphatase (PLAP) IgG1 [H17E2]	Maus	IP (1 µg/ml)	Abcam, Cambridge, UK
Sekundärantikörper			
POD-α-Maus „ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L)“		Western Blot (1 µg/5ml)	Thermo Fisher Scientific, Bonn
POD-α-Kaninchen „ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)“		Western Blot (1 µg/5ml)	Thermo Fisher Scientific, Bonn
APC-α-Maus-IgG (H+L; F(ab') ₂ Fragment)	Ziege	FACS (1µg/100 µl)	Dianova, Hamburg

2.1.5 Enzyme, Größenmarker und Farbstoffe

Alle verwendeten PCR-, Ligations- und Restriktions-Agenzien (Polymerasen, T4 DNS Ligase, Restriktionsendonukleasen, u.a.) stammten von Fermentas GmbH (St. Leon-Rot). Die verwendeten Größenmarker und Farbstoffe sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Verwendete Größenmarker und Farbstoffe.

Größenmarker/Farbstoff	Hersteller
Brilliant Blau G250	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
„GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“ (250-10.000 bp)	Fermentas, St. Leon-Rot
„Page Ruler® Unstained Protein Ladder“	Fermentas, St. Leon-Rot
„PageRuler® Plus Prestained Protein Ladder“ (10-250 kDa)	Thermo Fischer Scientific, Bonn
„Prestained Protein Molecular Weight Marker“ (10-170 kDa)	Fermentas, St. Leon-Rot
Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.1.6 Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tab. 6 aufgelistet.

Tab. 6: Verwendete Kits.

Name	Verwendung	Hersteller
BCA™ Protein Assay	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	Thermo Fisher Scientific, Bonn
ECL Plus	Detektion von Chemilumineszenz (WB)	GE Healthcare, München
NucleoSpin Extract II	DNS-Extraktion aus Agarosegelen und Reinigung von PCR-Produkten	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Proliferationsassay	Promega GmbH, Mannheim
NucleoBond Xtra Midi Kit	Midi-Präparation von Plasmid-DNS	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
NucleoSpin®RNA II	Präparation von RNS	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Mini-Präparation von Plasmid-DNS	Thermo Fisher Scientific, Bonn
MACS Pan B Cell Isolation Kit (Maus)	B Zellisolation	Miltenyi Biotec GmbH, Gladbach

2.1.7 Oligonukleotide, Plasmide

In Tab. 7 sind die verwendeten Oligonukleotide aufgelistet und in Tab. 8 alle verwendeten Plasmide.

Tab. 7: Verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz	Projekt
5'mTIM-2_AflII	5'-GACTCTTAAGCATACAGCAGTGCAGGGGCTGG-3'	Klonierung mTIM-2, ΔICD, Δ1, Δ2, Δ3
3'mTIM-2_NotI	5'-GACTGCGGCCGCGGACTCTTCTTCGGGGTAAGG-3'	Klonierung mTIM-2, Δ1, Δ2, Δ3
3'mTIM2(+Stop)_NotI	5'-GACTGCGGCCGCGGACTCTTCTTCGGGGTAAGG-3'	Klonierung ΔIgV
5'Seq_pcDNA	5'-AAATTAATACGACTCACTATAGG-3'	Sequenzierung
3'Seq_pcDNA	5'-CCTTCCAGGGTCAAGGAAGGCACG-3'	Sequenzierung
5'deltaIgV_AflII	5'-GATCCTTAAGATTTCCACGAGTCCACCAACAAGG-3'	Klonierung ΔIgV
3'deltaICD_NotI	5'-GACTGCGGCCGCGGTGATAACCATGGTGCTCAG-3'	Klonierung ΔICD
3'mut221-230Δ1	5'-CATAGAAGCCAGGGATTACTTCAGTGTAT-3'	Klonierung Δ1
5'mut221-230Δ1	5'-AGTAATCCCTGGCTTCTATGTTGGCATCTC-3'	Klonierung Δ1
3'mut211-220Δ2	5'-GCTTCTGTGGTTCATCTGAGGATGTCACAG-3'	Klonierung Δ2
5'mut211-220Δ2	5'-CTCAGATGACCCACAGAAGCCACAGAAAAACC-3'	Klonierung Δ2
3'mut201-210Δ3	5'-CATCCCAAGGGTCTGCAGGAGTAGAGGGTA-3'	Klonierung Δ3
5'mut201-210Δ3	5'-CCTGCAGACCCTTGGGATGATAACACTGAAG-3'	Klonierung Δ3
5'Linker-PC-tag_BamHI	5'-GATCCAAGCTTGAAGACCAGGTCGATCCACGGCTGATC GATGGCAAGTGAC-3'	Klonierung PC-Epitop, C-terminal von H-Ferritin
3'Linker-PC-tag_XhoI	5'-TCGAGTCACTTGCCATCGATCAGCCGTGGATCGACCTG GTCTTCAAGCTTG-3'	Klonierung PC-Epitop, C-terminal von H-Ferritin
5'H-Ferritin_NdeI	5'-GATCCATATGACCACCGCTCTCCCTCGCAAGTGCG-3'	Klonierung H-Ferritin
3'H-Ferritin_BamHI	5'-GATCGGATCCGCTCTCATCACCGTGTCCAGGGTG-3'	Klonierung H-Ferritin
5'sTIM2_HindIII	5'-GATCAAGCTTCATACAGCAGTGCAGGGGCTGGC-3'	Klonierung lösliches TIM-2
i3'sTIM2(EcoRI)	5'-GGTGTGGGTCTTGTGCAATTCCTTATTCAGGTTTTTCTG-3'	Klonierung lösliches TIM-2
i5'hFc(EcoRI)	5'-GAAAAACCTGAATAAGGAATTCGACAAGACCCACA CCTG-3'	Klonierung humanes Fc-Epitop, C-terminal von sTIM-2
3'hFc_NotI	5'-GATCGCGGCCGCTCACTTGCCAGGAGACAG-3'	Klonierung humanes Fc-Epitop, C-terminal von sTIM-2
oligo-dT	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	Reverse Transkription von mRNS

Tab. 8: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Resistenz	Eigenschaft	Quelle
pEGFP-N1	Kan	Eukaryotischer Expressionsvektor für eine mutierte Variante des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP), für eine kräftige Fluoreszenz und hohe Expression; aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i>	Clontech, Mountain View, CA, USA
pcDNA3.1(+)	Amp/Neo	Eukaryotischer Expressionsvektor für transiente und stabile Proteinexpression in Säugetierzellen	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA6-hP2X7R	Amp/Puro	Expressionsvektor, dessen Insert für humanen P2X7-Rezeptor kodiert	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Fritz Koch-Nolte (UKE HH)
pcDNA3.1(+) mTIM-2	Amp/Neo	Eukaryotischer Expressionsvektor mit murinem TIM-2 als Insert (N-terminales Flag-Epitop, C-terminales His-Epitop)	Eigene Klonierung
p409mTIM-2	Amp	Eukaryotischer Expressionsvektor mit murinem TIM-2 als Insert (N-terminales Flag-Epitop, C-terminales His-Epitop)	Eigene Klonierung
pcDNA3.1(+) AP-mTIM-2	Amp/Neo	Eukaryotischer Expressionsvektor mit dem Fusionsprotein aus Alkalischer Phosphatase und murinem TIM-2 als Insert (N-terminales Flag-Epitop, C-terminales His-Epitop)	Eigene Klonierung
pcDNA3.1(+) AP- mTIM-2 _ Δ IgV	Amp/Neo	Eukaryotischer Expressionsvektor mit dem Fusionsprotein aus Alkalischer Phosphatase und IgV-Domäne von TIM-2 als Insert (N-terminales Flag-Epitop)	Eigene Klonierung
pcDNA3.1(+) AP- mTIM-2 _ Δ ICD	Amp/Neo	Eukaryotischer Expressionsvektor für das Fusionsprotein aus Alkalischer Phosphatase und TIM-2 ohne intrazelluläre Domäne (N-terminales Flag-Epitop, C-terminales His-Epitop)	Eigene Klonierung
pcDNA3.1(+) AP- mTIM-2 _ Δ 1	Amp/Neo	Eukaryotischer Expressionsvektor für das Fusionsprotein aus Alkalischer Phosphatase und der TIM-2-Mutante Δ 1 mit der Deletion P221-K230 (N-terminales Flag-Epitop, C-terminales His-Epitop)	Eigene Klonierung
pcDNA3.1(+) AP-mTIM-2 _ Δ 2	Amp/Neo	Eukaryotischer Expressionsvektor für das Fusionsprotein aus Alkalischer Phosphatase und der TIM-2-Mutante Δ 2 mit der Deletion P211-P220 (N-terminales Flag-Epitop, C-terminales His-Epitop)	Eigene Klonierung
pcDNA3.1(+) AP- mTIM-2 _ Δ 3	Amp/Neo	Eukaryotischer Expressionsvektor für das Fusionsprotein aus Alkalischer Phosphatase und der TIM-2-Mutante Δ 3 mit der Deletion W201-D210 (N-terminales Flag-Epitop, C-terminales His-Epitop)	Eigene Klonierung
pcDNA3.1(+) smTIM-2-hFc	Amp/Neo	Eukaryotischer Expressionsvektor mit löslichem TIM-2 als Insert und C-terminalem humanen Fc-Epitop	Eigene Klonierung

pet22b(+) mH-Ferritin-PC	Amp	Prokaryotischer Expressionsvektor mit H-Ferritin als Insert und C-terminalem PC-Epitop	Eigene Klonierung
pcDNA_DEST40sgp 130-hFc	Amp	Als Template für die Klonierung des hFc-Epitops	War in der Arbeitsgruppe vorhanden
pCRscript-AP-TGF α	Amp	Eukaryotischer Expressionsplasmid mit AP-TGF α als Insert	Agilent Technologies, Waldbronn

2.1.8 Bakterien, Zellen und Mäuse

Zur Klonierung und Vermehrung der Plasmide wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet und für die prokaryotische Proteinexpression der *E.coli*-Stamm BL21 (Stratagene, La Jolla, USA). Die Bakterien wurden in folgenden Medien bei 37°C kultiviert:

Lysogeny-Broth-(LB)-Flüssigmedium: 10 g NaCl

10 g Trypton/Pepton
5 g Hefeextrakt
ad 1000 ml H₂O (pH 7,0)

Lysogeny-Broth-(LB)-Agar-Platten: 10 g NaCl

10 g Trypton/Pepton
5 g Hefeextrakt
20 g Agar
ad 1000 ml H₂O (pH 7,0)

Die beiden Kulturmedien für Bakterien wurden vor Benutzung autoklaviert und mit 100 mg/l Ampicillin oder 25 mg/l Kanamycin versetzt.

Nach einer Bakterientransformation (siehe 2.2.7.5) wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C unter Schütteln im SOC-Medium kultiviert.

SOC-Medium: 0,5 g NaCl

5 g Hefeextrakt
20 g Tryptone/Pepton
0,186 g KCl
0,952 g MgCl₂
3,603 g Glukose
ad 1000 ml H₂O (pH 7,0)

Alle benutzten Zellkulturmedien, fetales Kälberserum (FKS) sowie Trypsin/EDTA wurden von PAA Laboratories GmbH (Cölbe) bezogen. Die in Tab. 9 aufgeführten Zelllinien wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Tab. 9: Verwendete Zellen.

Zellen	Eigenschaft	Kulturbedingungen	Referenz / ATCC-Nr.
HEK293	Immortalisierte humane embryonale Nierenzellen; etablierte Zelllinie für transiente Transfektionen	DMEM ^{+/-} : Dulbecco's modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine + 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FKS)	ATCC-Nr.: CRL-1573
COS-7	Nieren-Fibroblasten aus der afrikanischen Grünen Meerkatze <i>Cercopithecus aethops</i> , immortalisiert mit dem großen SV40 T Antigen	DMEM ^{+/-} : Dulbecco's modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine + 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FKS)	ATCC-Nr.: CRL-1651
MEFs ADAM10 ^{-/-}	Immortalisierte embryonale Mausfibroblasten, defizient für die Metalloproteinase ADAM10	DMEM ^{+/-} : Dulbecco's modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine + 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FKS) + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Karina Reiss (Dermatologie, Kiel)
MEFs ADAM17 ^{-/-}	Immortalisierte embryonale Mausfibroblasten, defizient für die Metalloproteinase ADAM17	DMEM ^{+/-} : Dulbecco's modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine + 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FKS) + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Karina Reiss (Dermatologie, Kiel)
MEFs ADAM10 ^{-/-} ADAM17 ^{-/-}	Immortalisierte embryonale Mausfibroblasten, defizient für die Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17	DMEM ^{+/-} : Dulbecco's modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine + 10 % fetales Kälberserum (FKS) + 1 % Penicillin / Streptomycin	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Karina Reiss (Dermatologie, Kiel)
MEFs wt	Immortalisierte embryonale Mausfibroblasten	DMEM ^{+/-} : Dulbecco's modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine + 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FKS) + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Karina Reiss (Dermatologie, Kiel)
primäre murine B Zellen	Isolation aus der Milz von Balb/c und C57BL/6N Mäusen	RPMI ^{+/-} : RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin + 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FKS) + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin + 50 µM β-Mercaptoethanol	Eigene Präparation

Alle für diese Arbeit benötigten Balb/c Mäuse (Charles River Laboratories International, Inc.) wurden unter sterilen Bedingungen in individuell belüfteten Käfigen (engl. *individually ventilated cages*, IVCs) des Victor-Hensen-Hauses Kiel gehalten und die mikrobielle Belastung wurde in regelmäßigen Abständen geprüft. Die Temperatur in den Mäusräumen betrug 19-21°C und die Luftfeuchtigkeit 45-60 %. Es wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden (6-18 Uhr) Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit eingehalten. Die Tiere erhielten Wasser und Trockenfutter *ad libitum*.

2.1.9 Stimulanzen und Inhibitoren

Die Wirkungsweise der eingesetzten Stimulanzen und Inhibitoren ist in Tab. 10 kurz beschrieben.

Tab. 10: Verwendete Stimulanzen und Inhibitoren mit ihrer Wirkungsweise.

Substanz	Wirkung	Konzentration	Bezugsquelle
PMA	Aktivator der Proteinkinase C (PKC) → aktiviert ADAM17	100 nm	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
BzATP	Bindung an den P2X7R → aktiviert ADAM10	500 µM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ionomycin Calciumsalz	Calcium-Ionophor → aktiviert ADAM10	2,5 µM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
GI254023X	spezifischer ADAM10-Inhibitor	3 µM	Ludwig et al. 2005
GW280264X	Inhibiert ADAM10 und 17	3 µM	Ludwig et al. 2005
ADAM10 Prodomäne	Blockiert spezifisch die katalytische Domäne von ADAM10	10 µM	Zur Verfügung gestellt von Marcia L. Moss
W7	Calmodulin-Inhibitor	100 µM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolation von RNS

Die Isolation von Gesamt-RNS aus Zellen oder Gewebe von Mäusen erfolgte mit dem „NucleoSpin®RNA II“ Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach dem Protokoll des Herstellers. Die Bestimmung der RNS-Konzentration wurde wie unter 2.2.4 beschrieben durchgeführt.

2.2.2 Reverse Transkription (RT)

Für die Umschreibung der isolierten Gesamt-RNS in cDNS wurde das in Tab. 11 aufgeführte Protokoll verwendet. Anschließend wurde 1 µl der entstandenen cDNS für die PCR (siehe 2.2.3) eingesetzt.

Tab. 11: Protokoll für die Reverse Transkription.

Komponente	Konzentration/Volumen
Template-RNS	0,1-5 µg
oligo-dT-Primer	100 pmol
DEPC-H ₂ O	add 13 µl
gut mischen und bei 70°C für 5 min inkubieren, anschließend auf Eis 1 min abkühlen lassen	
5 x Reaktionspuffer	4 µl
dNTP-Mix (10 mM jedes)	2 µl
RevertAid™ MMuLV	1 µl
Gesamtvolumen	20 µl
gut mischen und bei 42°C für 60 min inkubieren, stoppen der enzymatischen Reaktion bei 70°C für 10 min	

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (engl. *polymerase chain reaction*) dient der exponentiellen Amplifikation von spezifischen DNS-Abschnitten. Grundlage für die Automatisierung dieser Technik ist die Entdeckung und Isolierung einer thermostabilen DNS-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (*Taq*) von Saiki et al. (Saiki et al., 1988).

2.2.3.1 Standard-PCR

Es wurden zwei synthetische Oligonukleotide - sogenannte Startermoleküle - (engl. *Primer*) konstruiert, die gegenläufig orientiert und zu den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind. Nach

der thermischen Denaturierung des DNS-Doppelstranges hybridisieren die *Primer* an die einzelsträngige Nukleinsäurematrize der *Template*-DNS. Anschließend synthetisiert eine hitzestabile DNS-Polymerase ausgehend vom 3'-Hydroxylende der Oligonukleotide das neue DNS-Doppelstrang-Fragment. Die *Pfu* DNS-Polymerase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verfügt über eine zusätzliche Korrekturlesefunktion (engl. *proofreading*) und wurde deshalb für alle Klonierungen (siehe 2.2.7) verwendet. Zum rein qualitativen Nachweis wurde die *DreamTaq* DNS-Polymerase ohne *proofreading*-Funktion (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) eingesetzt. Ein Standard-PCR-Protokoll unter Verwendung der *Pfu* oder *DreamTaq* ist in Tab. 12 aufgeführt.

Tab. 12: Pipettierschema einer Standard-PCR.

Komponente	Amplifikat	Negativkontrolle
H ₂ O _{MP} (autoklaviert)	x µl	y µl
10x Puffer	5 µl	5 µl
dNTP-Mix (je 2 mM)	5 µl	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	3 µl	3 µl
5'- <i>Primer</i> (100 pM)	1,5 µl	1,5 µl
3'- <i>Primer</i> (100 pM)	1,5 µl	1,5 µl
DNS- <i>Template</i>	10-100 ng	/
<i>Pfu</i> oder <i>DreamTaq</i> DNS-Polymerase (1 U/µl)	0,75 µl	0,75 µl
Gesamt	50 µl	50 µl

Das allgemeine PCR-Programm besteht aus 30-35 zyklischen Wiederholungen der Schritte: Denaturierung, Anlagerung (Annealing) und Strangverlängerung (Elongation). Denaturiert wurde bei 96°C, danach wurde die Temperatur auf die spezifische *Primer*-Hybridisierungstemperatur gesenkt. Diese liegt bei 100 %iger Komplementarität 5°C unter der Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten *Primer*. Der Elongationsschritt erfolgte bei 72°C, dem Temperaturoptimum der DNS-Polymerase. Die spezifische Elongationszeit ist von der erwarteten Fragmentlänge abhängig und ist für die *Pfu* DNS-Polymerase mit 2 min/1 kb und für die *DreamTaq* mit 1 min/1 kb angegeben. Ein typisches PCR-Thermocycler-Programm ist in Tab. 13 aufgeführt.

Die erzeugten PCR-Amplifikate wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft und konnten unter Nutzung des „NucleoSpin Extract II“-Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) aus dem Gel extrahiert werden.

Tab. 13: Thermocycler-Programm für eine PCR.

Schritt-Nr.	Bezeichnung	Temperatur	Zeit
1	initiale Denaturierung	96°C	3 min
2	Denaturierung	96°C	30 sec
3	Anlagerung	$T_m - 5^\circ\text{C}$	30 sec
4	Verlängerung	72°C	<i>Pfu</i> : 2 min/1kb <i>DreamTaq</i> : 1 min/1 kb
5	Wiederholung der Schritte 2-4; 34 x		
6	abschließende Verlängerung	72°C	10 min
7	Kühlung und Halten	4°C	∞

2.2.3.2 Anhängen von DNS-Sequenzen

Für viele Proteine gibt es keine oder nur unzureichend gut detektierende Antikörper zum Nachweis im Western Blot oder in der durchflusszytometrischen Analyse. Mithilfe der unter 2.2.3.1 beschriebenen PCR können DNS-Sequenzen - sogenannte *Tags* - an Proteine fusioniert werden. Diese Epitope sind meistens kurze (ca. 10-15 Aminosäuren lange) Abschnitte von viralen oder bakteriellen Proteinen, für die es sehr spezifische, kommerzielle Antikörper gibt. Die zum Fusionieren eines *Tags* benötigten *Primer* müssen mindestens zu 50 % an das Templategen binden und haben einen 5'-Überhang mit der DNS-Sequenz für das angehängte Peptid. Meistens enthielt dieser Überhang am 5'-Ende noch die genetische Information für eine Restriktionsschnittstelle für die spätere Klonierung. Mit dieser Methode des *Primer*-Überhangs wurden auch gezielt Restriktionsschnittstellen an DNS-Abschnitte angehängt, um diese beispielsweise in andere Vektoren zu klonieren.

2.2.3.3 SOE-PCR

Um größere DNS-Fragmente miteinander zu ligieren (siehe Abb. 9), für die es keine passenden Restriktionsschnittstellen gibt, wurde eine „Splicing by Overlapping Extensions“ PCR (SOE-PCR) durchgeführt. Dazu wurde zuerst eine PCR (siehe 2.2.3.1) in zwei getrennten Ansätzen durchgeführt. Die beiden entstandenen PCR-Fragmente wurden nach einer Reinigung in einer dritten PCR fusioniert. Da beide Produkte im Fusionierungsbereich überlappen, können sie miteinander hybridisieren und werden dann verlängert. Dieser überlappende Überhang wurde wie in 2.2.3.2 beschrieben durch das *Primer*-Design geschaffen. Die beiden inneren „Fusions-*Primer*“ sind revers komplementär und binden mit einem Teil am Ende bzw. Anfang vom 5'-Fragment und zum anderen Teil am Anfang bzw. Ende vom 3'-Fragment. Für die ersten beiden PCRs, in getrennten Ansätzen, wurde jeweils ein flankierender *Primer* und ein innerer „Fusions-*Primer*“ verwendet. In der dritten, eigentlichen Fusions-PCR, wurde der 5'-*Primer* des 5'-Fragments und der 3'-*Primer* des 3'-Fragments eingesetzt.

Mittels SOE-PCR wurden auch gezielte **Deletionsmutationen** in DNS-Abschnitte erzeugt, wodurch spezifisch ausgewählte Aminosäuren im codierten Protein entfernt wurden. Dazu wurden die inneren „Mutations-Primer“ so designt, dass sie die zu deletierende Sequenz nicht enthielten.

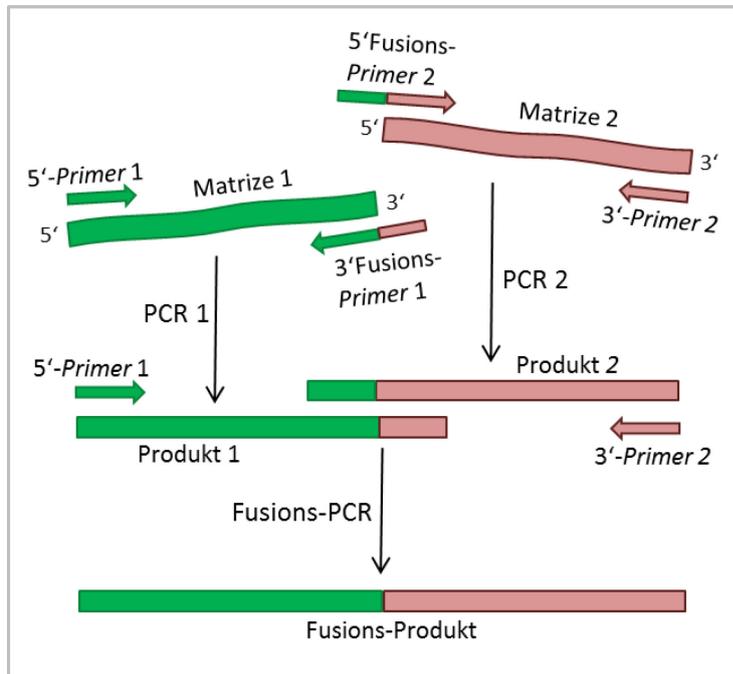


Abb. 9: Prinzip der SOE-PCR. Die genaue Erläuterung befindet sich im Text unter 2.2.3.3.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration einer Nukleinsäurepräparation wurde durch die Absorptionsmessung bei 260 nm mit einem Spektrophotometer („NanoDrop“) ermittelt. Dabei entspricht eine Extinktion von 1 etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNS. Zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde das Verhältnis E_{260}/E_{280} ermittelt, um Verunreinigungen durch Proteine abzuschätzen. Zusätzliche Verunreinigungen von aromatischen Resten veränderten den gemessenen Quotienten E_{260}/E_{230} .

2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Je nach Größe der erwarteten DNS-Fragmente wurden 0,8-2 % Agarose (w/v) in der entsprechenden Menge 0,5 x TBE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle mehrfach aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst war. Anschließend wurde die flüssige Agaroselösung luftblasenfrei in einen horizontalen Gelschlitten gegossen. Nach dem Abkühlen auf etwa 50°C wurde Ethidiumbromid dazugegeben ($c_f = 0,05$ µg/ml) und ein Teflonkamm für die Probenaschen eingesetzt. Nach dem Polymerisieren des Gels (ca. 15-30 min) wurde der Gelschlitten in die mit Puffer gefüllte Kammer eingesetzt und der Kamm vorsichtig entfernt. Die Proben wurden mit 6 x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Längenstandard wurde der „GeneRuler™ 1 kb DNA

ladder“ nach Gebrauchsanleitung von Fermentas verwendet. Die Trennung der DNS-Fragmente erfolgte je nach Gelgröße bei 100-150 V. Die Dauer der DNS-Wanderung betrug etwa 15-50 min. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert oder es wurden spezifische DNS-Fragmente unter schwachem UV-Licht (366 nm) für die präparative Isolierung oder Reinigung herausgeschnitten.

2.2.6 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Erzeugung chemisch kompetenter Bakterien wurde die Calciumchlorid-Methode angewandt. Dafür wurde eine Bakterienvorkultur angesetzt und für 16 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde 1 ml Bakterienvorkultur in 100 ml frisches Medium überführt und unter identischen Bedingungen weiter kultiviert. Das Zellwachstum wurde durch Trübungsmessung bei 600 nm verfolgt, bis die optische Dichte (OD_{600}) einen Wert von 0,6 erreicht hatte. Daraufhin wurde die Bakterienkultur 5 min auf Eis gestellt und 10 min bei 3.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend in einer 50 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in einer 50 mM $CaCl_2$ -Lösung mit 10 % Glycerin resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetente Bakteriensuspension wurde in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, und bei -80°C gelagert.

2.2.7 Klonierung von DNS-Fragmenten in Plasmiden

2.2.7.1 Präparative Restriktionsendonukleasebehandlung

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die an spezifischen Erkennungssequenzen die DNS schneiden. In zwei getrennten 30 µl Ansätzen wurden Vektor und Insert mit den gleichen Restriktionsenzymen bei 37°C für 16 h inkubiert. Der Reaktionsansatz enthielt neben den Enzymen (je 10 U) den spezifischen Puffer (1x) und 0,5-1,5 µg DNS. Nach der Spaltung wurde der Vektoransatz auf ein Agarosegel (0,8-1 %ig) aufgetragen und anschließend die DNS-Bande des linearisierten Vektors unter schwachem UV-Licht ausgeschnitten. Die Elution der linearisierten Vektor-DNS aus dem Gel erfolgte mittels des „NucleoSpin Extract II“ Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Anleitung des Herstellers. Die Reinigung des Inserts erfolgte ebenfalls mittels „NucleoSpin Extract II“.

2.2.7.2 Generierung von glatten Enden an linearisierten Plasmiden

Die Erzeugung von glatten Enden (engl. *blunt ends*) am linearisiertem Vektor (2.2.7.1) erfolgte mittels Klenow Fragment (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), welches 5'-überstehende einzelsträngige DNS-Sequenzen auffüllt und 3'-überstehende einzelsträngige DNS-Sequenzen abbaut. Nach der Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonukleasen wurde der Ansatz mit 1 µl dNTP-Mix (2 mM), 10 U Klenow Fragment und dem

entsprechenden Klenow-Puffer (10 x) versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inaktivierung der verwendeten Enzyme (10 min, 75°C) wurde die Plasmid-DNS in der Regel dephosphoryliert (2.2.7.3).

2.2.7.3 Dephosphorylierung

Im Anschluss an die Klenow-Reaktion (siehe 2.2.7.2) wurde die Plasmid-DNS durch Zugabe von 1 U FastAP (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) in den Reaktionsansatz dephosphoryliert. Nach 1 h bei 37°C wurde die Reaktion durch 15-minütiges Erhitzen auf 65°C gestoppt.

2.2.7.4 Ligation

Die Ligation von Vektor und Fragment erfolgte entweder bei 22°C für 2 h oder bei 4°C über Nacht. Danach schloss sich bei beiden Varianten eine Hitzeinaktivierung der Ligase bei 65°C für 10 min an. Für die Ligation wurden die T4-DNS-Ligase und der entsprechende T4-DNS-Ligase-Puffer (1x) verwendet. Vom linearisierten Vektor wurden pro Ansatz 25 ng eingesetzt und die Berechnung der Masse des jeweiligen DNS-Inserts erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Masse (Fragment) [ng]} = 5 * \text{Masse (Vektor) [ng]} * \frac{\text{Länge (Fragment)[bp]}}{\text{Länge (Vektor)[bp]}}$$

Tab. 14: Pipettierschema einer Standard-Ligation (unter Verwendung der T4-DNS-Ligase).

Komponente	Ligation	Religationskontrolle	Verdaukontrolle
H ₂ O a.i.	x µl	x µl	x µl
10 x „Buffer for T4-DNA-Ligase“	2 µl	2 µl	2 µl
Vektor	25 ng	25 ng	25 ng
Insert	y µl	/	/
T4-DNS-Ligase	1 µl	1 µl	/
Gesamt	20 µl	20 µl	20 µl

2.2.7.5 Transformation in *E.coli*

Pro Transformationsansatz wurden 50 µl kompetente, bei -80°C gelagerte Bakterien (*E.coli* XL-1Blue, BL21) auf Eis aufgetaut und mit 20 µl Ligationsansatz (bzw. den Kontrollen) vorsichtig gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 sec mit anschließender Inkubation auf Eis für 2 min. Danach wurden 200 µl SOC-Medium zum Ansatz pipettiert und für 1 h bei 37°C geschüttelt, bevor der gesamte Ansatz auf vorgewärmte LB-Selektionsplatten (LB-Agar + 100 mg/l Ampicillin oder 25 mg/l Kanamycin) ausgestrichen wurde. Inkubiert wurden die Transformationsplatten im Brutschrank für maximal 17 h bei 37°C.

Zur Kontrolle ausgewählter Klone durch Restriktionsanalyse (siehe 2.2.7.8) und Sequenzierung (siehe 2.2.8) wurde mit einer sterilen Pipettenspitze Koloniematerial abgenommen, in ca. 7 ml LB-Selektionsmedium gegeben und für 16 h kultiviert (37°C, 220 rpm).

2.2.7.6 Mini-Präparation von Plasmid-DNS

Für die Plasmid-DNS-Präparation im kleinen Maßstab wurden zunächst die Bakterien einer 16 h-Kultur (2-8 ml) pelletiert (Zentrifugation 3.000 g, 3-5 min) und mit 200 µl Resuspensionspuffer S1 gemischt. Dann wurden 200 µl Lysepuffer S2 hinzu gegeben und vorsichtig 2-6mal geschwenkt. Nach maximal 5 min Inkubation bei RT erfolgte die Neutralisation mit 200 µl Neutralisationspuffer S3 und eine anschließende Zentrifugation bei 15.000 g, 4°C für 10 min. Der klare Plasmid-DNS-enthaltende Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 800 µl 100 % EtOH überführt und für 5 min auf Eis inkubiert. Durch die folgende Zentrifugation (15.000 g, 4°C, 10 min) wurde die Plasmid-DNS pelletiert und im Anschluss mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen. Nach der abschließenden Zentrifugation (15.000 g, 4°C, 10 min) wurde das DNS-Pellet durch eine kurze Inkubation in der SpeedVac getrocknet und in 30 µl H₂O aufgenommen.

2.2.7.7 Midi-Präparation von Plasmid-DNS

Zur Gewinnung großer DNS-Mengen wurden 100 ml einer 16 h-Kultur pelletiert (Zentrifugation 3.000 g, 3-5 min). Die anschließende Plasmidpräparation im großen Maßstab erfolgte mit dem „NucleoBond Xtra Midi Kit“ (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Angaben des Herstellers. Die präzipitierte DNS wurde in 150 µl H₂O gelöst und die Konzentration mittels NanoDrop (siehe 2.2.4) bestimmt.

2.2.7.8 Restriktionsanalyse

Zur Kontrolle von Plasmiden oder auch zum Überprüfen einer DNS-Fragmentinsertion wurden geeignete Restriktionsenzyme ausgewählt, die im Plasmid bzw. auch im Insert schneiden. Es wurden 100-250 ng Plasmid-DNS eingesetzt und zusammen mit den Enzymen und dem dazugehörigen Puffer für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Analyse der erzeugten DNS-Fragmente erfolgte über Agarosegelelektrophorese.

2.2.8 Sequenzierung von DNS

Zur Kontrolle des richtigen Inserteinbaus wurden alle selbst klonierten Plasmide in ausgewählten Bereichen von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) sequenziert.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung und Passagieren von adhärennten Zellen

Die adhärennten Zelllinien HEK293 und COS-7 wurden in DMEM Medium (+ 10 % FKS) kultiviert und bei 37°C, 5 % CO₂ und gesättigtem Wasserdampf inkubiert. Das Medium zur Kultivierung von MEFs enthielt noch zusätzlich 1 % Penicillin/Streptomycin. Die Zellpassage erfolgte alle 3-4 Tage mittels Trypsin/EDTA. Trypsin spaltet die Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche und löst die Zellen vom Flaschenboden und voneinander. Nach der direkten Zugabe von frischem FKS-haltigem Kulturmedium zur Inhibition von Trypsin wurden die abgelösten Zellen resuspendiert und je nach Zellbedarf im Verhältnis 1:2 bis 1:20 in eine neue 10 cm Kulturschale überführt und weiter geführt. Anschließend wurden die passagierten Zellkulturen mit frischem Kulturmedium aufgefüllt.

2.3.2 Zellzählung mittels Trypanblau

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurden diese mit einer Trypanblaulösung gemischt. Die angefärbte Zellsuspension wurde sofort auf die Neubauer Zählkammer aufgetragen und mindestens zwei Großquadrate (= 32 Kleinquadrate) ausgezählt. Die Zellzahl konnte nach nach folgender Formel berechnet werden:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Zahl der Großquadrate}} * \text{Verdünnung} \times 10^4$$

Während vitale Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen und unter dem Lichtmikroskop hell leuchtend erscheinen, werden abgestorbene Zellen tiefblau gefärbt.

2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Neben den in Zellkultur gehaltenen Zellen, wurden von allen Zelllinien Aliquote zur Aufbewahrung und späteren Wiederverwendung eingefroren. Hierzu wurden die konfluenten Zellen in Suspension gebracht und für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml kaltem Gefriermedium (10 % DMSO in vollständigem Zellkulturmedium) pro wegzufrierender Probe resuspendiert und in ein 1,5 ml Schraubdeckelröhrchen überführt. Zunächst wurden die Zellen für 24 Stunden im „Gefrierrondell“ (Nalgene, Rochester, USA) bei -80°C gelagert. Dies gewährte eine konstante Abkühlung der Proben von -1°C pro Minute. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (- 196°C) überführt.

Die aufzutauenden Röhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im 37°C Wasserbad fast vollständig aufgetaut. Unter der Sterilbank wurden die aufgetaute Zellsuspension möglichst schnell in ein 15 ml

Röhrchen mit 10 ml Zellkulturmedium gegeben und für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert, um das im Gefriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und zur Kultivierung in eine 10 cm Petrischale überführt und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Anwachsen der aufgetauten Zellen kontrolliert und tote Zellen durch Mediumwechsel entfernt.

2.3.4 Transfektion von adhärennten Zellen

Für die Transfektion wurden die Zellen am Vortag so ausgesät, dass sie am darauffolgenden Tag zu 60-70 % konfluent waren. Die Transfektion erfolgte mittels „TurboFect“ (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). Hierzu wurde die Plasmid-DNS in der entsprechenden DMEM-Menge ohne FKS gelöst und mit „TurboFect“ versetzt. Nach 15-30 min Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen getropft. Vor dem Zutropfen des Reaktionsansatzes wurde das alte Medium aus der Schale abgesaugt und vorsichtig durch frisches Kulturmedium ersetzt. Der jeweilige Transfektionsansatz für die verschiedenen Zellen und unterschiedlich großen Kulturschalen ist in Tab. 15 aufgeführt.

Zur Generierung stabil transfizierter HEK293 Zellen wurden 24 h nach der Transfektion das Kulturmedium erneuert und mit Neomycin versetzt. Nach dem Anwachsen einzelner Klone wurden geeignete ausgewählt, weiter kultiviert und per Western Blot oder durchflusszytometrischer Analyse auf die Expression der rekombinanten Proteine überprüft.

Ein Ansatz mit dem Plasmid pEGFP-N1 diente als Transfektionseffizienzkontrolle für HEK293 und COS-7 Zellen, die üblicherweise bei 80 % lag. MEFs wurden zusätzlich mit 1/10 pEGFP-N1 Plasmid co-transfiziert zur Überprüfung der einheitlichen Transfektion.

Die *Shedding*-Experimente erfolgten, wie im Abschnitt 2.3.5 beschrieben, 48 h nach der transienten Transfektion.

Tab. 15: Transfektionsansätze mit TurboFect für adhärennte Zellen.

Kultivierungs-Format	DMEM ^{7/-}	DNS-Menge	TurboFect
HEK293, COS-7			
10 cm Schale	1 ml	5 µg	10 µl
6-Loch-Platte	200 µl	1 µg	2 µl
12-Loch-Platte	100 µl	0,5-0,6 µg	1-1,2 µl
MEFs			
Loch-Platte	100 µl	2 µg	3 µl

2.3.5 *Shedding*-Experimente mit adhärenen Zellen

Um eine einheitliche Transfektionseffizienz für die einzelnen *Shedding*-Ansätze zu gewährleisten, wurden 24 h nach der Transfektion (2.3.4) die Zellen mit frischem Medium abgelöst, gepoolt, gezählt und anschließend gleichmäßig auf neue Kulturkavitäten ausplattiert (siehe Tab. 16). Nach weiteren 24 h Inkubation wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit der in Tab. 16 aufgeführten Menge an frischem Medium ohne FKS aufgefüllt. Daraufhin wurden die Stimulanzen zu den Zellen pipettiert. Die verwendeten Inhibitoren GI254023X (GI, ADAM10-spezifisch), GW280264X (GW, ADAM10- und ADAM17-spezifisch) und die rekombinante ADAM10 Prodomäne (A10Pro) wurden 30 min vor der Stimulation mit PMA (für 2 h), BzATP (für 30 min), Ionomycin (für 30 min) oder W7 (für 1 h) auf die Zellen gegeben.

Tab. 16: Protokoll zur Stimulation von *Shedding* für unterschiedliche Kultivierungsformate.

Kultivierungsformat für die Stimulation	ausplattierte Zellzahl 24 h nach der Transfektion	aufgefüllte DMEM ^{-/-} Menge	Inhibitoren (Konzentration)	Stimulanzen (Konzentration)
6-Loch-Platte	7 x 10 ⁵ /Loch	600 µl	GI (3 µM); GW (3 µM); A10Pro (10 µM)	PMA (100 nm); BzATP (250 µM); IM (2,5 µM); W7 (100 µM)
12-Loch-Platte	3,5 x 10 ⁵ /Loch	300 µl	GI (3 µM); GW (3 µM); A10Pro (10 µM)	PMA (100 nm); BzATP (250 µM); IM (2,5 µM); W7 (100 µM)
24-Loch-Platte	1,5 x 10 ⁵ /Loch	150 µl	GI (3 µM); GW (3 µM); A10Pro (10 µM)	PMA (100 nm); BzATP (250 µM); IM (2,5 µM); W7 (100 µM)

Für die die Stimulation mit BzATP mussten die HEK293 und COS-7 Zellen mit dem pcDNA6-hP2X7R Vektor co-transfiziert werden.

Zur Bestimmung des konstitutiven *Sheddings* in MEFs wurde 24 h nach der Transfektion frisches DMEM^{-/-} (ohne FKS) auf die Zellen pipettiert und für weitere 24 h inkubiert.

Nach der *Shedding*-Stimulation wurde sofort der Zellüberstand abgenommen und für 5 min bei 10.000 g, 4°C zentrifugiert, um eventuell vorhandene Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Der geklärte Zentrifugationsüberstand wurde dann in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Die in der Kulturschale verbliebenden Zellen wurden 1 x mit kaltem PBS gewaschen, anschließend mit PBS abgelöst und pelletiert (10.000 g, 4°C, 5min), um daraus ein Zelllysat zu erstellen (siehe 2.4.1).

Zur Analyse des Ektodomänen-*Sheddings* wurde die Menge an TIM-2 im Lysat und löslichem TIM-2 (sTIM-2) im Überstand via Western Blot detektiert oder per AP-Assay quantifiziert. Für eine bessere Western Blot Detektion von sTIM-2 im Überstand wurde dieser mittels „Speed Vac“ um die Hälfte eingengt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Lyse von Zellen

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden die kultivierten Zellen 1 x mit kaltem PBS gewaschen, in kaltem PBS aufgenommen und bei 10.000 g, 4°C für 5 min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden, je nach Menge, in 75-350 µl mildem Lysepuffer durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren resuspendiert und für 1 h bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Lysat zur Abtrennung von Zellkernen und Zelldebris bei 10.000 g, 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und vom Überstand wurde in der Regel die Proteinkonzentration (siehe 2.4.2) bestimmt.

2.4.2 Proteinbestimmung (BCA-Assay)

Zur Bestimmung des Proteingehalts von Zelllysaten wurde der BCATM Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Bonn) benutzt. Die Lysate wurden in der Regel im Verhältnis 1:20 mit Lysepuffer verdünnt. Zunächst wurde vom Proteinstandard BSA eine Verdünnungsreihe mit dem entsprechenden Puffer (z.B. Lysepuffer), in dem das Protein gelöst war, hergestellt. Dann wurde die Bradford-Stammlösung A mit dem Reagenz B im Verhältnis 1:50 gemischt. Anschließend wurden pro Ansatz 200 µl Bradfordgemisch in die Kavitäten einer 96-Loch-Platte vorgelegt und mit 25 µl der jeweiligen Probe (Standardverdünnungsreihe, die zu bestimmende Probe bzw. Probenverdünnungen, Proteinpuffer als Leerwert) gemischt. Für eine genauere Auswertung wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Nach der Inkubation der Proben im Dunkeln für 30 min, wurden die Proben resuspendiert und die Luftblasen entfernt, bevor die Messung der optischen Dichte bei 562 nm am „Tecan“ Photometer erfolgte. Mit den gemessenen Werten der Standardverdünnungsreihe wurde eine Eichkurve mit dem Computerprogramm Microsoft Office Excel erstellt und die Konzentration der zu bestimmenden Proben berechnet.

2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dient der Größenbestimmung von Proteinen. Durch den Zusatz der anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) im Probenpuffer werden die Polypeptide denaturiert und verlieren ihre Eigenladung. Die SDS-Moleküle lagern sich um die Proteine und es entstehen SDS-Proteinmizellen. Diese können im Polyacrylamidgel definierter Porenstruktur nach der Größe ihres Molekulargewichtes voneinander getrennt werden.

2.4.3.1 Herstellung des SDS-Polyacrylamidgels

Zur Herstellung der Gele dienten vertikale Minigel-Gießkammern „Mini-PROTEAN[®] 3 Cell“ von Bio-Rad. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurden Trenngel mit einem Acrylamidanteil von 7, 10 oder 12,5 % benutzt. Unter Rühren wurden die Komponenten für das Trenngel und das Sammelgel gemäß dem Ansatz in Tab. 17 gemischt. Zuerst wurde das Trenngel in die Gelkassette gefüllt und sofort mit Isopropanol (ca. 1 ml) überschichtet. Dadurch bildete sich eine horizontale Grenzfläche aus, während das Trenngel 20-30 min bei RT polymerisierte. Nach der vollständigen Entfernung des Isopropanols wurde das flüssige Sammelgel bis zum oberen Rand auf das Trenngel gegossen und eine Taschenschablone (10 Taschen-Kamm) eingesetzt. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte anschließend nach etwa 20-30 min.

Tab. 17: Pipettierschema für SDS-Polyacrylamidgele.

Komponente	Trenngel	10 %	Sammelgel	
Tris	2 M; pH 8,8	3 ml	0,5 M; pH 6,8	1 ml
30 % Rotiphorese [™] Gel		2 ml		280 µl
H ₂ O _{VE}		900 µl		700 µl
10 %iges SDS		50 µl		20 µl
10 %iges APS (4°C)		50 µl		20 µl
TEMED (4°C)		5 µl		3 µl

2.4.3.2 Elektrophorese

Die voneinander trennenden Proteinproben wurden mit 5 x Laemmli-Probenpuffer versetzt, 5-10 min bei 96°C denaturiert und in die Geltaschen pipettiert. Zum Western Blot-Nachweis wurden 4 µl des Größenmarkers „Page Ruler[™] Plus Prestained Protein Ladder“ aufgetragen und zur Coomassie-Färbung 6 µl „Page Ruler[®] Unstained Protein Ladder“. Die Elektrophorese erfolgte bei 100-180 V, bis die Bromphenolblau-Front die untere Trenngelkante erreicht hatte (ca. 50-80 min). Anschließend konnten die Proteine mittels Coomassie-Färbung oder durch eine Western Blot-Analyse nachgewiesen werden.

2.4.4 Coomassie-Färbung

Eine Methode, um Proteine sichtbar zu machen, ist die von (Neuhoff *et al.*, 1988) veröffentlichte Färbung durch Coomassie Brilliant-Blue R-250. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 0,1-2 µg Protein pro Bande. Zunächst wurde das SDS-Gel nach vollendeter Elektrophorese in der Coomassie-Färbelösung unter Schütteln inkubiert (mind. 1 h) bis es blau eingefärbt war. Anschließend wurde das Gel in die Entfärbelösung überführt und solange darin geschwenkt, bis sich die blau gefärbten Proteinbanden vom Hintergrund deutlich abhoben.

2.4.5 Western Blot und immunochemische Proteindetektion

Zur immunochemischen Identifizierung einzelner Proteine wurden die Proteine nach der SDS-PAGE im „Semi-Dry“-Verfahren geblottet. Bei diesem elektrophoretischen Transfer wurden die Proteine durch Anlegen einer Spannung aus dem Gel auf eine proteinbindende Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Das Blotverfahren erfolgte in einem „Trans-Blot SD Semi-Dry-Transfer“ System (Bio-Rad, München) bei konstanten 20 V für 60-90 min. War der gefärbte Größenmarker auf der PVDF-Membran sichtbar, sollten die Proteine ebenfalls auf die Membran transferiert sein. Die Membran wurde anschließend für 2 h in Blockpuffer inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Dann wurde der Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung direkt zum Blockpuffer gegeben und die Membran für ca. 16 h bei 4°C weiter inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS-T für jeweils 10 min, erfolgte die Inkubation in Sekundärantikörper-Blockpufferlösung (POD konjugiert) für etwa 2 h. Danach schloss sich erneut ein dreimaliger Waschschrift mit PBS-T an und die Zugabe des Substrates für die Peroxidase (POD) erfolgte. Zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wurde das „ECL-Plus-“, bzw. ECL-Advanced Western Blot Detektionsreagenz der Firma GE Healthcare (München) verwendet. Die Peroxidase oxidiert das Substrat Lumigen zu einem Acridiniumester. Durch eine weitere Reaktion mit Peroxid entsteht eine intensive Chemilumineszenz. Diese wurde mit einer speziellen CCD-Kamera (LAS-3000, FujiFilm, Japan) detektiert und als Bilddatei gespeichert.

2.4.6 „Stripping“ von Western Blot Membranen

Das sogenannte „Stripping“ von Western Blots ermöglicht es, auf einer Membran mehrere Proteine nacheinander nachzuweisen. Um die bereits gebundenen Antikörper von einer PVDF-Membran zu entfernen, wurde diese mit „Stripping“-Puffer für 30 min bei 60-70°C inkubiert und anschließend 5 x mit PBS-T gewaschen. Daraufhin konnte die Membran erneut blockiert und zur Immundetektion eines weiteren Proteins mit einem neuen primären Antikörper inkubiert werden.

2.4.7 Alkalische Phosphatase (AP)-Assay zur Bestimmung der Spaltungseffizienz

Um zu untersuchen, ob ein Transmembranprotein von einer Protease prozessiert wurde, wurden die Proteine an der extrazellulären Domäne mit einer Alkalischen Phosphatase (AP) fusioniert. Für die Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase, die proportional zu der Menge an Fusionsprotein im Zellpellet oder Überstand ist, wurde eine Tablette p-Nitrophenyl Phosphat (pNPP, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), nach Angaben des Herstellers, in AP-Puffer gelöst. In einer 96-Loch Mikrotiterplatte wurden die Proben in Triplikaten vorgelegt. Vom Zellkulturüberstand wurden jeweils 50 µl, vom Zelllysat 5 µl sowie zur Kontrolle 5 µl milder Lysepuffer und 50 µl DMEM^{-/-} eingesetzt. Das Zelllysat und der Lysepuffer wurden mit je 45 µL DMEM^{-/-} auf

50 µL aufgefüllt. Mit einer Multipipette wurden pro Kavität 50 µL AP-Substratlösung (mit pNPP) zugeben und die Absorptionen der Proben sofort bei 405 nm mittels „Tecan“ Photometer gemessen. Die gemessenen optischen Dichten (OD) wurden gemittelt und die spezifische Spaltungseffizienz wurde mit der nachstehenden Formel berechnet:

$$\text{Spaltungseffizienz} = \frac{\text{OD Zellüberstand}}{(\text{OD Zellüberstand} + \text{OD Zellysate})}$$

Die berechnete Spaltungseffizienz gibt an, wieviel exprimiertes AP-Fusionsprotein durch die jeweilige Protease prozessiert wurde.

2.4.8 Proteinexpression und Reinigung von H-Ferritin

Für die Expression von H-Ferritin wurde der Vektor pet22b(+)mH-Ferritin-PC (siehe Abb. 32) generiert und in *E.coli* BL21 Bakterien transformiert (siehe 2.2.7.5). In Vorbereitung auf die Expression wurden 8-20 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit dem *E.coli*-Expressionsstamm beimpft und für 16 h unter Schütteln bei 37°C kultiviert. 200 µl der Vorkultur wurden in 20 ml frischem Medium (bzw. für die präparative Expression 1 ml Vorkultur in 1 l Medium) überführt und unter gleichen Bedingungen weitergeführt. Das Zellwachstum wurde durch Trübungsmessung bei 600 nm verfolgt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) zu einer Endkonzentration von 1 mmol. Nach weiteren 2 h Inkubation wurden die Bakterien durch Zentrifugation (3.000 g, 4°C, 10 min) pelletiert, in kaltem PBS resuspendiert und mittels Sonifikation lysiert. Der resultierende Überstand enthielt das murine H-Ferritin Protein und wurde bei 70°C für 15-20 min inkubiert. Aufgrund dieser hohen Temperatur denaturierten fast alle im Überstand enthaltenden Proteine, wodurch das relativ hitzestabile H-Ferritin Protein angereichert wurde (Stefanini *et al.*, 1996). Das H-Ferritin Protein wurde anschließend durch Zentrifugation bei 13.000 g, 4°C für 10 min von den denaturierten bakteriellen Proteinen getrennt.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Durchflusszytometrie

Mit der durchflusszytometrischen Analyse (FACS, engl. *fluoreszenz activated cell sorting*) erfolgte die Charakterisierung der Oberflächenexpression verschiedener Proteine auf einzelnen Zellen. Zum Nachweis der Oberflächenmoleküle wurden spezifische Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper verwendet. Dabei ist die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Menge an gebundenen Fluoreszenz-markierten Antikörpern und somit zur Expression der Antigene. Zusätzlich konnten durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße (im *Forward-Scatter*) und die Granularität der Zelle (im *Sideward-Scatter*) gewonnen werden. Die isolierten primären murinen B Zellen aus der Milz wurden vor der Fluoreszenzmarkierung mit 1 µg/100 µl anti-CD16/32 Antikörpern (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) für 10 min auf Eis inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper an Fcγ-Rezeptoren zu verhindern. Pro Färbung wurden 0,5 bis 1 x 10⁶ Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (300 g, 4°C, 5 min) und mit 1 µg Primärantikörper in 100 µl FACS-Puffer für 1 h auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen 2 x mit je 1 ml FACS-Puffer gewaschen. War der Primärantikörper nicht direkt Fluoreszenz-gekoppelt, mussten die Zellen weiterhin mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper (im Verhältnis 1:100) für 1 h auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend wieder 2 x mit FACS-Puffer gewaschen werden. Nach der FACS-Färbung wurden die markierten Zellen in 200-400 µl FACS-Puffer resuspendiert, in ein FACS-Röhrchen überführt und bis zur Messung in Dunkelheit bei 4°C inkubiert. Die Messung erfolgte mit dem „FACSCanto“ Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) und die Auswertung via „DIVA“ Software.

2.5.2 Co-Immunpräzipitation von H-Ferritin mit löslichem TIM-2Fc

Für die Co-Immunoprecipitation (Co-IP) wurden HEK293 Zellen in einer 10 cm Petrischale (in 5-6 ml DMEM^{+/+}) mit dem Plasmid pcDNA3.1(+)-smTIM-2-hFc oder dem Kontrollvektor pcDNA_DEST40sgp130-hFc transfiziert (2.3.4) und für 48 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zur Präzipitation von löslichem TIM-2 (sTIM-2Fc) und H-Ferritin wurde je 1 ml Zellkulturüberstand der transient transfizierten Zellen mit 25 µl Protein-G-Sepharose (Roche, Mannheim, Germany) versetzt, die vorher 2 x mit kaltem PBS gewaschen wurde. Nach der Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Immunkomplexe präzipitiert (1.500 g, 4°C, 3 min), 2 x mit PBS gewaschen und mit 75 µl H-Ferritin Proteinlösung für mindesten 6 h bei 4 °C inkubiert. Vorab wurde die H-Ferritin Suspension mit der Protein-G-Sepharose vorinkubiert, um unspezifische Bindungen von H-Ferritin an die Sepharose-Kügelchen zu vermeiden. Die Co-Immunoprecipitate wurden anschließend 3 x mit PBS gewaschen und in 30-50 µl Laemmli-Puffer bei 96°C für 10 min erhitzt. Nach der Probentrennung mittels SDS-Page (2.4.3) erfolgte die Western Blot-Analyse (2.4.5) mit einem POD-anti-human-Fc- und einen murinen anti-PC-(HPC4) Antikörper. Da die Bindung des anti-PC Antikörpers Ca²⁺-abhängig ist, wurden die Western Blot Puffer mit 4 mM CaCl₂

versetzt. Für die Input-Detektion wurde jeweils 1 ml Zellkulturüberstand (sTIM-2Fc bzw. sgp130Fc) mit 40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ präzipitiert und 75 μl H-Ferritin-Lösung mittels „SpeedVac“ auf etwa 30 μl einkonzentriert.

2.5.3 ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Als weitere Methode neben der in Abschnitt 2.5.2 beschriebenen Co-IP, zum Nachweis der Bindung zwischen H-Ferritin und löslichem TIM-2Fc, diente ein ELISA-Assay. Hierfür wurde H-Ferritin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{l}/\text{Kavität}$) über Nacht bei 4°C an eine 96-Loch-Platte (Nunc, Greiner Microton, Solingen) gebunden und die noch freien Bindungsstellen auf der Platte anschließend durch Inkubation mit Blockpuffer für 1-2 h besetzt. Der Kulturüberstand von sTIM-Fc bzw. sgp130Fc transfizierten HEK293 Zellen wurde mit PBS verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit 200 μl PBS-T, um ungebundenes H-Ferritin von der Platte zu entfernen, wurden 100 μl der einzelnen Verdünnungsstufen (1:10-1:1200) in Triplikaten in die Kavitäten pipettiert und für 2 h unter Schütteln inkubiert. Nicht gebundenes Protein wurde wiederum durch dreimaliges Waschen mit PBS-T entfernt und die Detektion von gebundenem sTIM-2 bzw. sgp130Fc erfolgte mit einem POD-gekoppelten anti-humanen-Fc Antikörper (siehe Tab. 4). Nach 1 h Inkubation wurden die Kavitäten 2 x mit PBS-T und 1 x mit PBS gewaschen. Zur Messung der enzymatischen POD-Reaktion wurden mit einer Multipipette je 100 μl Substratlösung „BM blue POD“ (Roche Diagnostics, Mannheim) pro Kavität pipettiert und die Platte anschließend für 5-15 min im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μl 1,8 M H_2SO_4 gestoppt und die colorimetrische Auswertung bei einer Absorption von 450 nm mittels „Tecan“ Plattenlesegerät (Tecan, Maennedorf, Schweiz) durchgeführt.

2.5.4 AP-ELISA

Um die Bindung zwischen H-Ferritin und AP-TIM-2, löslichem AP-TIM-2 (sAP-TIM-2 im Überstand nach der Stimulation mit Ionomycin (IM)) oder den AP-Mutanten (AP-TIM-2_Δ1, Δ2, Δ3, ΔIgV, ΔICD) zu analysieren, wurde ein AP-ELISA etabliert. Im Unterschied zum allgemeinen ELISA (siehe 2.5.3) erfolgte hier die Detektion der gebundenen Moleküle nicht mit einem POD-gekoppelten Antikörper, sondern mithilfe der Alkalischen Phosphatase, die N-Terminal an die Proteine fusioniert war. H-Ferritin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{l}/\text{Kavität}$) wurde über Nacht bei 4°C an eine 96-Loch-Platte gebunden. Nach der Blockierung mit Blockpuffer für 1-2 h, wurden 10 μl Lysat plus 90 μl PBS oder 100 μl Zellkulturüberstand von transient transfizierten HEK293 Zellen (unstimuliert oder stimuliert mit IM, GI, GW) für 2 h dazugegeben. Anschließend wurden die Kavitäten der Platte 3-5 x mit PBS gewaschen, bevor 100 μl AP-Substratlösung (1mg p-Nitrophenylphosphat (pNPP, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)/10ml AP-Puffer (siehe Tab. 3)) zugegeben wurden. Daraufhin erfolgte sofort die Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität bei 405 nm an einem SLT Rainbow Plattenlesegeräte („Tecan“), um die Menge an gebundenen AP-Konstrukten nachzuweisen.

2.5.5 Kompetitiver AP-ELISA

Der kompetitive AP-ELISA erfolgte nach dem Prinzip des AP-ELISAs und diente auch dem Bindungsnachweis von H-Ferritin mit löslichem AP-TIM-2. Hierfür wurde ebenfalls eine 96-Loch-Platte mit H-Ferritin (10 µg/ml, 50 µl/Kavität) über Nacht bei 4°C beschichtet und anschließend freie Bindungsstellen mit Blockpuffer besetzt. 100 µl Zellkulturüberstand mit gespaltenem AP-TIM-2 (sAP-TIM-2) von transient transfizierten HEK293 Zellen nach IM-Stimulation wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an sTIM-2Fc oder sgp130Fc (als Kontrolle) gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Je 100 µl der verschiedenen Verhältnisse von sAP-TIM-2/sTIM-2Fc bzw. sAP-TIM-2/sgp130Fc (im Verhältnis von 1:3 bis 1:0,3125) wurden dann in die H-Ferritin beschichteten Kavitäten gegeben und für 2 h inkubiert. Die Platte wurde mit PBS (3 x) gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Zur Bestimmung der Menge an gebundenen löslichen AP-TIM-2 wurden 100 µl AP-Substratlösung (mit pNPP) zugegeben und sofort die Alkalische Phosphatase-Aktivität bei 405 nm via SLT Rainbow Photometer („Tecan“) gemessen.

2.5.6 Calmodulin-Bindungs-Assay (CaM-IP)

Für die Analyse der Calmodulin-Bindung wurden zuerst HEK293 Zellen in einer 10 cm Schale transient mit AP-TIM-2, AP-TIM-2_Δ1 oder ΔICD transfiziert und nach 48 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C in 400 µl eiskaltem, milden Lysepuffer lysiert. Zum Bindungsnachweis wurden 200 µl Calmodulin-gekoppelte Sepharose 4B (in 650 µl milden Lysepuffer; GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) mit 150 µl Zelllysate gemischt und unter ständiger Bewegung bei 4°C über Nacht inkubiert. Als Kontrolle wurden jeweils 150 µl Zelllysate mit 200 µl ungekoppelter Sepharose 4B unter identischen Bedingungen inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Lysepuffer wurden die immunopräzipitierten Proteine (AP-TIM-2, AP-TIM-2_Δ1 oder ΔICD) in 50-80 µl Laemmli-Puffer für 10 min bei 96°C erhitzt, via SDS-PAGE (siehe 2.4.3) voneinander getrennt und anschließend mit dem anti-Flag M1 Primärantikörper (siehe Tab. 4) im Western Blot (siehe 2.4.5) nachgewiesen.

2.5.7 Präparation und Aktivierung von primären murinen B Zellen aus der Milz

Für die Isolation von B Zellen aus muriner Milz wurden 8-12 Wochen alte Mäuse (Charles River Laboratories) durch zervikale Dislokation getötet und die Milz entnommen. Die Milz wurde in ein 50 ml Falcon Röhrchen mit 10 ml eiskaltes PBS + 0,2 % BSA überführt. Danach wurde die Milzsuspension durch ein Metallsieb passagiert und bei 300 g, 4°C für 10 min zentrifugiert. Um die Erythrozyten aus der Zellsuspension zu entfernen, wurde das Pellet in 5 ml Erythrozytenlysepuffer (siehe Tab. 3) resuspendiert und für 7 min auf Eis inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 20 ml PBS + 0,2 % BSA gestoppt. Nach 2 x Waschen (300 g, 4°C für 10 min) mit je 10 ml PBS + 0,2 % BSA wurden die Zellen in 5 ml PBS + 0,2 % BSA resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (siehe 2.3.2). Die anschließende Präparation von B Zellen aus den Milzzellen erfolgte mit dem „MACS Pan B Cell

Isolation Kit“ (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) nach Angaben des Herstellers. Dabei handelte es sich um eine Negativselektion d.h. alle nicht B Zellen wurden durch ein Gemisch an biotinylierten Antikörpern des Herstellers markiert (20 min bei 4°C). Nach einem zweiten Inkubationsschritt, für 20 min bei 4°C mit anti-Biotin-gekoppelten, magnetischen Kügelchen, wurden alle Zellen mit 2-10 ml MACS-B Zell-Separationspuffer gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in Puffer (10^8 Zellen/500 μ l) resuspendiert und mittels Separationsfilter vereinzelt, bevor sie über eine MACS-Säule sortiert wurden. Alle markierten Zellen waren magnetisch und konnten an die Säule im Magneten binden, während die unbehandelten B Zellen durchflossen und aufgefangen wurden.

Die gereinigten B Zellen wurden dann in RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin (PAA Laboratories, Cölbe, Germany), 10 % FKS und 50 μ M β -Mercaptoethanol (GIBCO) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Induktion der TIM-2 Oberflächenexpression wurden die B Zellen mit anti-IgM (5 μ g/ml, eBioscience, San Diego, CA, USA) und anti-CD40 (5 μ g/ml, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) Antikörpern für 24-72 h stimuliert. Daraufhin erfolgten die *Shedding*-Experimente (siehe 0) mit BzATP, IM und den spezifischen Inhibitoren sowie eine FACS-Auswertung.

2.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse und zum Erstellen der entsprechenden Diagramme wurde das Computerprogramm Microsoft Office Excel verwendet. Soweit nicht anders angegeben, entsprechen die Werte dem berechneten Mittelwert +/- der Standardabweichung (SD). Mit Hilfe des „student's unpaired t tests“ erfolgte die Berechnung der Signifikanzen. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde hierbei als statistisch signifikant angesehen und mit einem „*“ gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Expression und *in vitro* Shedding-Analyse von TIM-2 nach Stimulation mit PMA, BzATP und Ionomycin

3.1.1 Generierung der TIM-2 Expressionsplasmide

Zuerst wurde der vollständige, offene Leserahmen (ohne die Signalpeptidsequenz) des murinen TIM-2 Rezeptors in einer PCR (siehe 2.2.3.1) mit den beiden Oligonukleotiden 5'mTIM-2_AfIII und 3'mTIM-2_NotI aus Thymus cDNS amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen AfIII und NotI behandelt (siehe 2.2.7.1). Der für die Ligation verwendete Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kodiert für eine Signalpeptidsequenz der murinen kappa-Kette der Immunglobuline, ein aminotermiales Flag-Epitop und ein carboxyterminales Histidin-Epitop. Dieser Vektor wurde ebenfalls mit AfIII und NotI behandelt und anschließend gereinigt. Das Insert wurde in den Zielvektor subkloniert, Klone identifiziert und durch Sequenzierung verifiziert. Das nach der Ligation entstandene Plasmid wurde pcDNA3.1(+)mTIM-2 genannt. Für eine höhere Expressionsrate wurde die TIM-2 Expressionskassette in den eukaryotischen Expressionsvektor p409 kloniert. Dazu wurde die gesamte TIM-2 Expressionskassette aus den pcDNA3.1(+)mTIM-2 Vektor mit PmeI ausgeschnitten und in den PmeI behandelten und dephosphorylierten p409 Vektor kloniert. Der entstandene Vektor wurde im Folgenden p409mTIM-2 genannt.

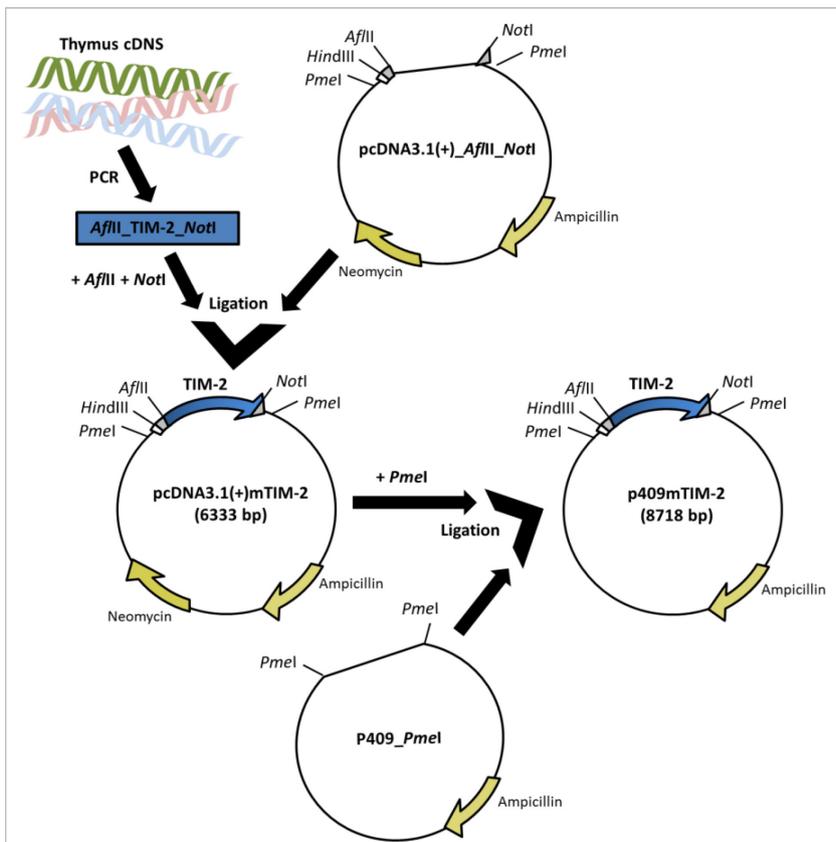


Abb. 10: Konstruktion der Expressionsvektoren pcDNA3.1(+)-mTIM-2 und p409mTIM-2. Die genaue Beschreibung ist unter 3.1.1 aufgeführt.

3.1.2 Expression von TIM-2 auf der Zelloberfläche von transfizierten HEK293 Zellen

Das für die *Shedding*-Experimente verwendete TIM-2 Protein ist in Abb. 11A schematisch dargestellt. TIM-2 ist ein Typ I Transmembranprotein (Santiago *et al.*, 2007a) und die verwendete cDNS codiert für eine N-terminale variable Immunglobulindomäne (IgV), gefolgt von einer Mucindomäne, einer Transmembrandomäne (TM) und einer intrazellulären Domäne (ICD). Zur Detektion von TIM-2 im Western Blot und in der durchflusszytometrischen Analyse wurde am N-Terminus ein Flag-Epitop und am C-Terminus ein Polyhistidin-Epitop (6 x) fusioniert. Das aminoterminal Signalpeptid (SP) stammt von der murinen kappa-Kette der Immunglobuline und ermöglicht den korrekten Transport des TIM-2 Proteins zur Zellmembran.

Für die nachfolgenden *Shedding*-Experimente war es wichtig, dass TIM-2 korrekt auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Deshalb wurde eine durchflusszytometrische Analyse (siehe 2.5.1) durchgeführt. Hierzu wurden HEK293 Zellen mit der TIM-2 cDNS stabil transfiziert und mit einem anti-Flag (M2) Primärantikörper und einen APC-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messung ist in Abb. 11B dargestellt. Es war deutlich eine Zunahme der Fluoreszenzintensität für die TIM-2 transfizierten Zellen (schwarze Kurve) detektierbar, was darauf schließen lässt, dass TIM-2 auf der Zelloberfläche exprimiert wurde.

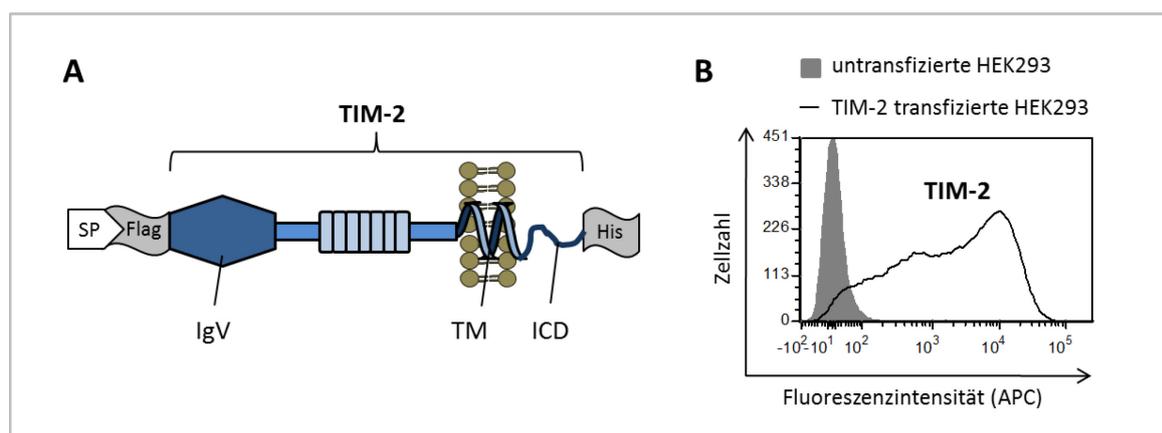


Abb. 11: Schematische Darstellung und Zelloberflächenexpression von TIM-2. (A) Das TIM-2 Protein, bestehend aus: Signalpeptid (SP), Flag-Epitop, variable Immunglobulindomäne (IgV), Mucindomäne, Transmembrandomäne (TM), intrazelluläre Domäne (ICD) und Histidin-Epitop (His). (B) Durchflusszytometrische Analyse von TIM-2 auf HEK293 Zellen. HEK293 Zellen wurden mit dem pcDNA3.1(+)-mTIM-2 Vektor stabil transfiziert und für die Durchflusszytometrie mit einem anti-Flag M2 und einem APC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt. Als Kontrolle wurden untransfizierte HEK293 Zellen identisch gefärbt. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Zellen.

3.1.3 PMA-Stimulation führt nicht zum *Shedding* von TIM-2 durch ADAM17

Nachdem TIM-2 korrekt auf der Oberfläche von stabil transfizierten HEK293 Zellen detektiert wurde, war der nächste Schritt die Western Blot-Analyse von TIM-2 im Zelllysate. Dafür wurden COS-7 Zellen mit dem Expressionsplasmid p409mTIM-2 transient transfiziert und 48 h später lysiert. Nach der Gelelektrophorese erfolgte der Western Blot und TIM-2 konnte im Zelllysate mithilfe eines anti-Flag (M1) Primärantikörpers

nachgewiesen werden. Abb. 12A zeigt das detektierte TIM-2 Protein als Doppelbande zwischen 55 und 80 kDa. Die Doppelbande entstand wahrscheinlich auf Grund der unterschiedlichen Glykosylierung des TIM-2 Proteins.

Die nächste Frage war, ob TIM-2 proteolytisch freigesetzt wird. Dazu wurden HEK293 Zellen mit p409mTIM-2 transient transfiziert und für 48 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen für 1 h mit 100 nM Phorbol-12-acetat-13-myristat (PMA), welches die Prozessierung vieler unterschiedlicher Zelloberflächenproteine aktiviert (Scheller *et al.*, 2011a). Zur Detektion von TIM-2 im Western Blot wurde der anti-Flag (M1) Primärantikörper verwendet. Wie in Abb. 12B dargestellt ist, konnte TIM-2 im Zelllysat von unstimulierten und PMA-stimulierten HEK293 Zellen nachgewiesen werden. Im Zellkulturüberstand dagegen war sowohl ohne als auch mit PMA-Stimulation keine lösliche TIM-2 (sTIM-2) Variante im Western Blot detektierbar. Da PMA hauptsächlich ADAM17 aktiviert und nicht ADAM10 (Matthews *et al.*, 2003b), deuteten die Ergebnisse an, dass ADAM17 TIM-2 nicht schneidet. Deshalb wurde als Nächstes die Freisetzung von löslichem TIM-2 durch ADAM10 untersucht.

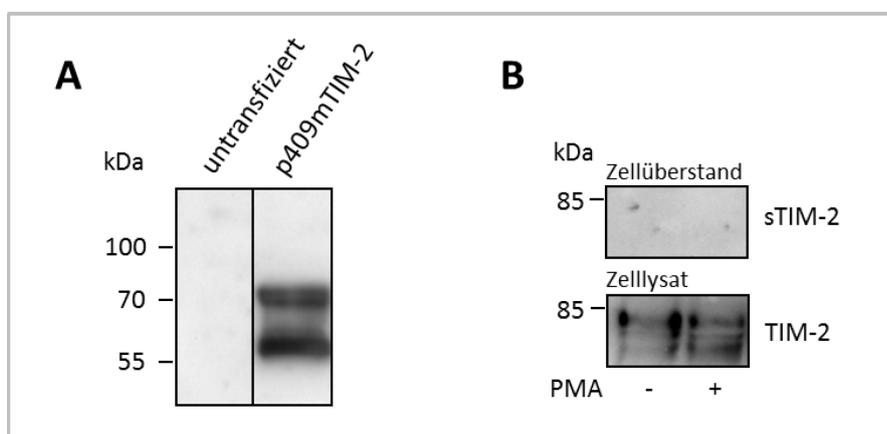


Abb. 12: Western Blot-Nachweis und Shedding-Analyse von TIM-2 nach Stimulation mit PMA. (A) Western Blot. COS-7 Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid p409mTIM-2 transient transfiziert und 48 h später lysiert. Jeweils 40 μ g Gesamtlisat von transfizierten und nicht transfizierten Zellen wurde für die Western Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion von TIM-2 erfolgte mit einem anti-Flag (M1) Primärantikörpers. **(B)** HEK293 Zellen wurden mit TIM-2 cDNS transfiziert und 48 h später mit PMA (100 nm) für 1 h stimuliert. Die Western Blot Detektion erfolgte mit einem anti-Flag (M1) Primärantikörper. Oben wurde der Zellkulturüberstand und unten das Zelllysat aufgetragen.

3.1.4 ADAM10 prozessiert TIM-2 nach Stimulation mit BzATP oder Ionomycin

Um herauszufinden, ob TIM-2 durch ADAM10 proteolytisch gespalten wird, wurden HEK293 Zellen mit p409TIM-2 transient transfiziert und 48 h später mit BzATP oder Ionomycin (IM) für 30 min in An- und Abwesenheit des ADAM10 Inhibitors GI254023X (GI) stimuliert. BzATP und IM aktivieren hauptsächlich die Protease ADAM10 (Garbers *et al.*, 2011) und der spezifische Inhibitor GI hemmt die ADAM10-Aktivität (Ludwig *et al.*, 2005). Zur Western Blot Detektion von membranständigem TIM-2 im Zelllysat und löslichem TIM-2 (sTIM-2) im Zellkulturüberstand wurde der anti-Flag (M1) Primärantikörper verwendet.

In Abb. 13A und B ist, anhand der aufgetragenen Zelllysate, zu erkennen, dass TIM-2 ohne und mit BzATP, IM oder GI etwa gleich stark exprimiert wurde. Nach der BzATP- oder IM-Stimulation war eine lösliche TIM-2 Variante (siehe Pfeile) im Zellkulturüberstand detektierbar. Der spezifische ADAM10 Inhibitor GI führte zur Hemmung der BzATP- und IM-vermittelten limitierten Proteolyse von TIM-2, da kein sTIM-2 im Überstand nachweisbar war. Diese Ergebnisse deuteten eine Prozessierung von TIM-2 durch ADAM10 an. Um diese Theorie zu stützen, wurden stabil transfizierte TIM-2 HEK293 Zellen mit IM in An- und Abwesenheit der rekombinanten ADAM10 Prodomäne (A10Pro) stimuliert. Dieses Protein blockiert spezifisch die katalytische Domäne der humanen ADAM10-Protease (Moss *et al.*, 2007). Das lösliche TIM-2 wurde nach IM-Stimulation im Western Blot nachgewiesen, aber durch die Zugabe der ADAM10 Prodomäne war es nicht mehr im Zellkulturüberstand detektierbar (siehe Abb. 13C). Demnach wurde die proteolytische Freisetzung von sTIM-2 durch ADAM10 vermittelt und konnte mit der ADAM10 Prodomäne gehemmt werden. Die Experimente zeigen, dass TIM-2 durch die Protease ADAM10 und nicht durch ADAM17 prozessiert wurde, wodurch eine lösliche TIM-2 Variante im Zellüberstand detektiert werden konnte. Im Folgenden wurde das *Shedding* von TIM-2 genauer durch verschiedene *in vitro* Methoden untersucht und quantifiziert.

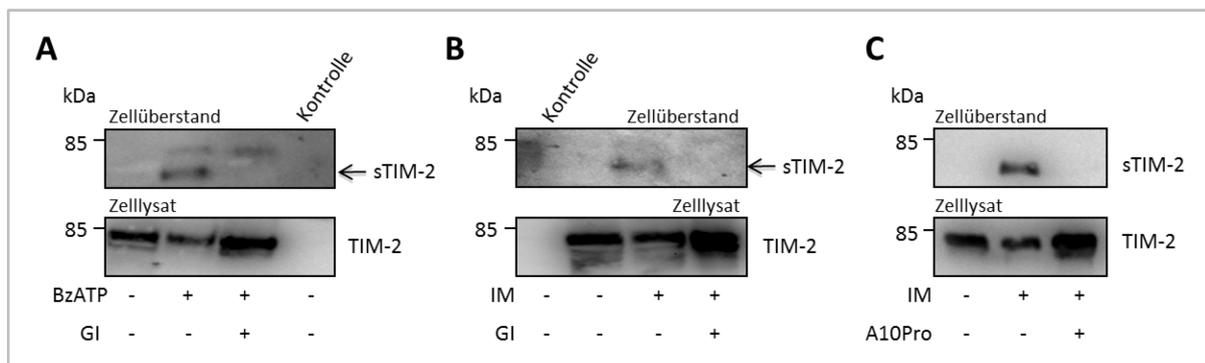


Abb. 13: Western Blot-Analyse von ADAM10-induziertem TIM-2 Shedding nach Stimulation mit BzATP und IM. (A, B) Western Blots. HEK293 Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid p409mTIM-2 transient transfiziert. Für die BzATP Aktivierung wurden die Zellen co-transfiziert mit hP2X7R cDNS. Nach 48 h Inkubation folgte die Stimulation mit BzATP (500 μ M) oder Ionomycin (IM, 2,5 μ M) für 30 min. Der ADAM10-spezifische Inhibitor GI254023X (GI, 3 μ M) wurde 30 min vor der Stimulation zugegeben. Die Western Blot Detektion erfolgte mit einem anti-Flag (M1) Primärantikörper. Als Kontrolle dienten untransfizierte HEK293 Zellen. **(C)** Western Blot. HEK293 Zellen wurden stabil mit der TIM-2 cDNS transfiziert und mit IM (2,5 μ M) für 30 min stimuliert. Zur spezifischen Blockade von ADAM10 wurde die ADAM10 Prodomäne (A10Pro) 30 min vor der Stimulation zugegeben. Die Western Blot-Analyse wurde, wie unter A beschrieben, durchgeführt.

3.2 Die quantitative *Shedding*-Analyse via AP-Assay bestätigt ADAM10 als Protease von TIM-2

3.2.1 Generierung des AP-TIM-2 Expressionsplasmids

Für die quantitative *Shedding*-Analyse war es nötig, eine Alkalische Phosphatase (AP) N-terminal an das TIM-2 Protein zu fusionieren. Dazu wurde die plazentale Alkalische Phosphatase cDNA mit *Hind*III aus dem Vektor

pCRscript-AP-TGF α ausgeschnitten, anschließend gereinigt und in das *Hind*III-verdaute, dephosphorylierte Plasmid pcDNA3.1(+)*m*TIM-2 kloniert. Anschließend wurde das korrekte Leseraster der Alkalischen Phosphatase per Restriktionsendonuklease-Analyse und Sequenzierung überprüft und der erhaltene Vektor (für die Expression eines AP-TIM-2 Fusionsproteins) wurde pcDNA3.1(+)*AP-m*TIM-2 genannt.

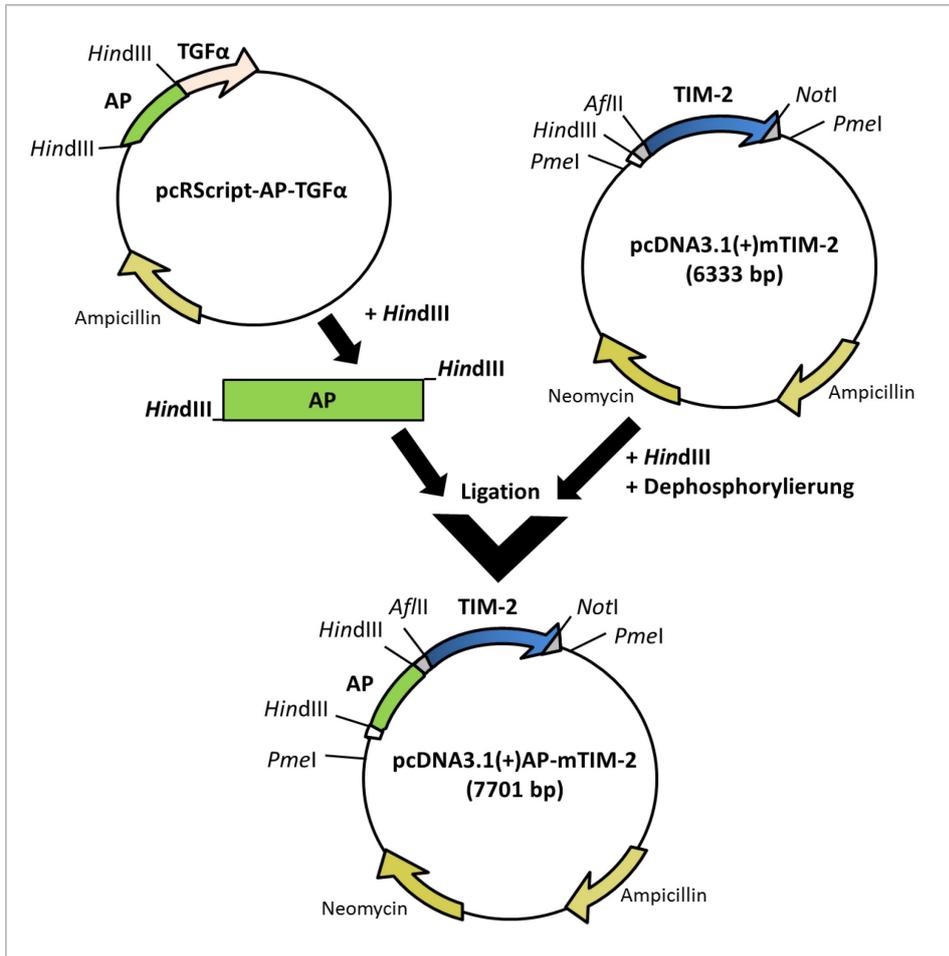


Abb. 14: Konstruktion des Expressionsvektors pcDNA3.1(+)*AP-m*TIM-2. Alle Details sind unter 3.2.1 beschrieben.

3.2.2 Zelloberflächenexpression von AP-TIM-2 auf transfizierten HEK293 Zellen

Um das *Shedding* von TIM-2 zu bestätigen und zu quantifizieren, wurde eine Alkalische Phosphatase an TIM-2 fusioniert. Das in Abb. 15 dargestellte AP-TIM-2 Fusionsprotein besteht aus einem Signalpeptid (SP), der Alkalischen Phosphatase (AP), einem Flag-Epitop, dem TIM-2 Protein mit einer extrazellulären Transmembran (TM)- und intrazellulären (ICD) Domäne sowie einem C-terminalen His-Epitop. Zum Nachweis der Zelloberflächenexpression von AP-TIM-2 erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse. Dafür wurden HEK293 Zellen mit der AP-TIM-2 cDNS stabil transfiziert und mit einem anti-Flag (M2) Primärantikörper, gefolgt von einem APC-gekoppelten Sekundärantikörper, markiert. In der durchflusszytometrischen Auswertung (Abb. 15B) war eine Fluoreszenzzunahme (von 10^4) für die AP-TIM-2 transfizierten Zellen detektierbar, und demzufolge wurde AP-TIM-2 auf der Oberfläche von HEK293 Zellen exprimiert.

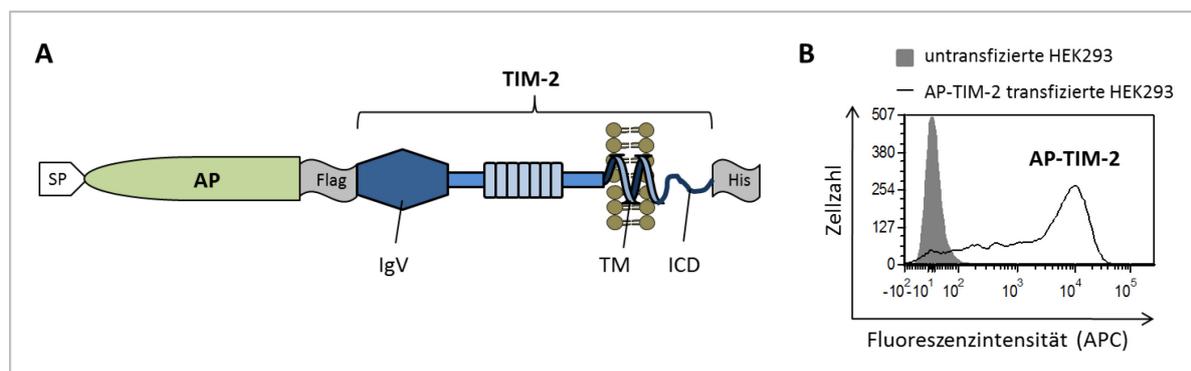


Abb. 15: Schematische Darstellung und Zelloberflächenexpression von AP-TIM-2 (A) AP-TIM-2 Protein mit Signalpeptid (SP), Alkalischer Phosphatase (AP), Flag-Epitop, variable Immunglobulindomäne (IgV), Mucindomäne, Transmembrandomäne (TM), intrazelluläre Domäne (ICD) und Histidin-Epitop (His). (B) Durchflusszytometrische Analyse von AP-TIM-2 auf HEK293 Zellen. HEK293 Zellen wurden mit pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2 stabil transfiziert und für die Durchflusszytometrie mit einem anti-Flag (M2) und einem APC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt. Als Kontrolle wurden untransfizierte HEK293 Zellen identisch gefärbt. Angezeigt ist die Fluoreszenzintensität der Zellen.

3.2.3 ADAM17 prozessiert nicht AP-TIM-2 nach Stimulation mit PMA

Durch die Fusion der Alkalischen Phosphatase (AP) an TIM-2 konnte die Alkalische Phosphatase-Aktivität von membrangebundenem AP-TIM-2 im Zelllysat und löslichem AP-TIM-2 (sAP-TIM-2) im Überstand gemessen werden (siehe 2.4.7). Die daraus berechnete Spaltungseffizienz gibt das Verhältnis von sAP-TIM-2 (= AP-Aktivität im Überstand) zur AP-TIM-2-Gesamtmenge (= AP-Aktivität im Lysat + Überstand) an und dient somit als Maß für die Stärke der TIM-2 Spaltung. Da das AP-TIM-2 Protein, zusätzlich zur extrazellulären Alkalischen Phosphatase am zytoplasmatischen Ende ein Flag-Epitop enthält, war es möglich, mit dem anti-Flag (M1) Primärantikörper sowohl das membrangebundene AP-TIM-2 als auch das lösliche AP-TIM-2 im Western Blot nachzuweisen. Der untere Western Blot in Abb. 16A zeigt, dass AP-TIM-2 als Doppelbande detektiert wurde, die aufgrund des fusionierten AP-Peptids zwischen 100 und 125 kDa lag. Im oberen Blot war nach ADAM17-Stimulation mit PMA keine lösliche AP-TIM-2 Ektodomäne (sAP-TIM-2) identifizierbar. Dadurch wurde bestätigt, dass TIM-2 kein ADAM17 Substrat ist.

Für den AP-Versuch wurden AP-TIM-2 transient transfizierte HEK293 Zellen mit PMA in An- und Abwesenheit der spezifischen Inhibitoren stimuliert, anschließend lysiert und die AP-Aktivität bei 405 nm im Zelllysat sowie Zellüberstand gemessen, um daraus die Spaltungseffizienz zu berechnen. In Abb. 16B sind die berechneten Spaltungseffizienzen in einem Diagramm dargestellt. Es war kein Unterschied zwischen PMA-stimulierten und unstimulierten Zellen zu erkennen. Nach der Zugabe der spezifischen Inhibitoren GI und GW nahmen die Spaltungseffizienzen minimal um etwa 0,05 ab. Folglich wurde AP-TIM-2 nicht durch ADAM17 nach Stimulation mit PMA prozessiert. Um sicherzustellen, dass das verwendete PMA und die Protease ADAM17 in HEK293 Zellen richtig aktiv sind, wurden HEK293 Zellen mit dem Plasmid pCRscript-AP-TGF α transient transfiziert, mit PMA stimuliert und die Spaltungseffizienzen mittels AP-Aktivitätsmessung bestimmt. TGF α ist ein bereits beschriebenes Substrat von ADAM17 (Lee *et al.*, 2003; Sahin *et al.*, 2004). Wie in Abb. 16C dargestellt ist, kam es nach der Stimulation mit PMA zu einem hoch signifikanten Anstieg der TGF α -Spaltungseffizienz.

Dementsprechend war der verwendete Phorbol ester funktionsfähig und konnte ADAM17-abhängiges *Shedding* in HEK293 Zellen aktivieren. Da die berechneten Spaltungseffizienzen von AP-TIM-2 die Western Blot Ergebnisse bestätigten, wurden im Folgenden weitere AP-Versuche zur quantitativen *Shedding*-Analyse durchgeführt.

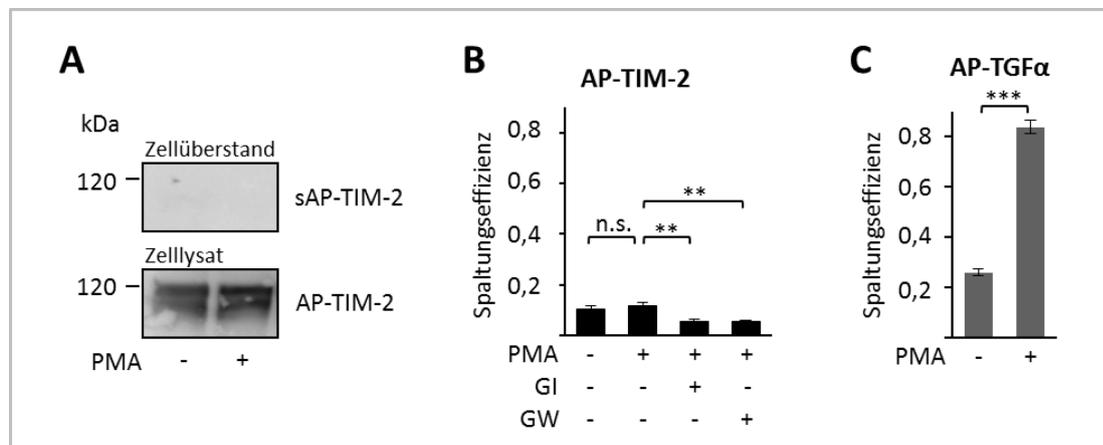


Abb. 16: Western Blot Detektion und quantitativer AP-Assay von AP-TIM-2 nach Stimulation mit PMA. (A) Western Blot-Nachweis. Zellen wurden mit AP-TIM-2 cDNS transient transfiziert und nach 48 h Inkubation mit PMA (100 nm) für 2 h stimuliert. Die Detektion von AP-TIM-2 im Zelllysate (unterer Blot) und löslichen AP-TIM-2 (sAP-TIM-2, oberer Blot) im Zellüberstand erfolgte mit einem anti-Flag (M1) Primärantikörper. **(B)** AP-Assay von AP-TIM-2. HEK293 Zellen wurden wie unter A beschrieben transfiziert und stimuliert. Die Inhibitoren GI254023X (GI, 3 μ M) und GW280264X (GW, 3 μ M) wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. Nach der Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität von AP-TIM-2 im Zelllysate und sAP-TIM-2 im Zellüberstand bei 405 nm wurde die Spaltungseffizienz (= $\text{AP-Aktivität}_{\text{Überstand}} / (\text{AP-Aktivität}_{\text{Lysat}} + \text{AP-Aktivität}_{\text{Überstand}})$) berechnet. Alle gemessenen Werte wurden dreifach bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwert \pm SD eines repräsentativen Experimentes (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$). **(C)** AP-Assay von TGF α . HEK293 Zellen wurden mit pCRscript-AP-TGF α transient transfiziert und 48 h später mit PMA (100 nm) für 2 h stimuliert. Die Bestimmung der AP-Aktivität und Spaltungseffizienz für TGF α erfolgte, wie unter B beschrieben.

3.2.4 Stimulation mit BzATP oder Ionomycin führt zum *Shedding* von AP-TIM-2 durch ADAM10

Zur Quantifizierung des *Sheddings* von TIM-2 durch ADAM10 nach BzATP und Ionomycin-Stimulation wurde das Fusionsprotein aus Alkalischer Phosphatase (AP) und TIM-2, wie oben bereits beschrieben, verwendet. HEK293 Zellen wurden mit AP-TIM-2 cDNS transient transfiziert und 48 h später mit BzATP oder IM in An- und Abwesenheit von GI, GW oder A10Pro stimuliert. Der Western Blot-Nachweis (Abb. 17A-C) zeigte die AP-TIM-2 Expression im Zelllysate anhand der spezifischen Doppelbande zwischen 110 und 125 kDa. Wie bereits schon für TIM-2 nachgewiesen wurde, spaltet ADAM10 auch das AP-TIM-2 Protein in transfizierten HEK293 Zellen. Eine lösliche AP-TIM-2 Ektodomäne (sAP-TIM-2) im Überstand war nach BzATP- oder Ionomycin-Stimulation mittels Western Blot-Analyse detektierbar (siehe oberen Western Blots in Abb. 17A-C). Durch den spezifischen ADAM10 Inhibitor GI sowie den kombinierten ADAM10 und 17 Inhibitor GW wurde die sAP-TIM-2 Freisetzung in den Zellkulturüberstand blockiert. Auch durch die Zugabe der ADAM10 Prodomäne wurde die Prozessierung von AP-TIM-2 gehemmt, da keine lösliche AP-TIM-2 Variante im Western Blot nachweisbar war. Die Verwendung dieser spezifischen ADAM10-Hemmstoffe belegte, dass ADAM10 und nicht ADAM17 das TIM-2 Protein schneidet.

Die in Abb. 17D-F aufgeführten AP-Assays bestätigten die Western Blot Ergebnisse. Es war ein hoch signifikanter Anstieg der Spaltungseffizienzen (von 0,1 auf 0,6 bis 0,8) nach der Zugabe der ADAM10 Stimulanzen BzATP oder IM detektierbar und ein Rückgang der Spaltungseffizienzen (von über 70 %) wenn zuvor die ADAM10 Inhibitoren GI, GW oder die A10Pro zugegeben wurden. Die Hemmung der Spaltungseffizienz nach GI Zugabe war noch stärker als nach GW Zugabe. Dies spricht für eine bessere ADAM10 Selektivität des ADAM10-spezifischen Inhibitors GI im Vergleich zum kombinierten ADAM10 und 17 Inhibitor GW.

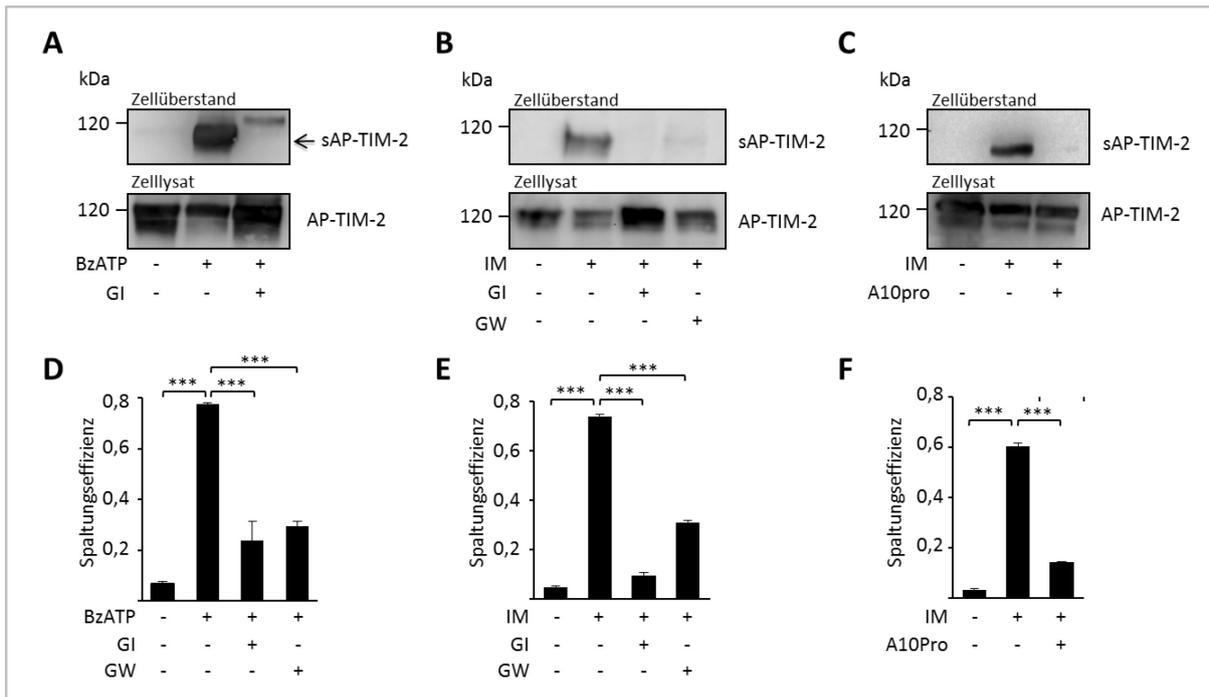


Abb. 17: BzATP- und IM-Stimulation induzieren ADAM10-abhängiges *Shedding* von AP-TIM-2. (A, B, C) Western Blots. HEK293 Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2 transient transfiziert. Für die BzATP-Aktivierung wurden die Zellen co-transfiziert mit hP2X7R cDNS. 48 h nach der Transfektion folgte die Stimulation mit BzATP (500 μ M) oder Ionomycin (IM, 2,5 μ M) für 30 min, in An- und Abwesenheit von GI254023X (GI, 3 μ M, hemmt ADAM10), GW280264X (GW, 3 μ M, hemmt ADAM10 und ADAM17) oder der ADAM10 Prodomäne (A10Pro, 10 μ M). Die Inhibitoren wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. Die Western Blot Detektion erfolgte mit dem anti-Flag (M1) Primärantikörper. **(D, E, F) AP-Assay.** Die AP-TIM-2 Transfektion und Stimulation der HEK293 Zellen erfolgte analog der Western Blot-Analyse (unter A, B, C). Nach der Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität von AP-TIM-2 im Zellysate und sAP-TIM-2 im Zellüberstand bei 405 nm wurde die Spaltungseffizienz (= $\text{AP-Aktivität}_{\text{Überstand}} / (\text{AP-Aktivität}_{\text{Lysat}} + \text{AP-Aktivität}_{\text{Überstand}})$) berechnet. Alle gemessenen Werte wurden dreifach bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Experimentes (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$).

3.2.5 *Shedding*-Analyse von AP-TIM-2 in ADAM10- und ADAM17-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Im Folgenden wurden ADAM10- und ADAM17-defiziente murine embryonale Fibroblasten (MEFs) verwendet, um die Rolle von ADAM10 als TIM-2-Sheddase unabhängig zu verifizieren. Diese Zellen wurden sowohl aus Wildtyp-Mäusen als auch aus ADAM10-, ADAM17- und doppelt (ADAM10 und ADAM17)-defizienten Mäusen isoliert und immortalisiert. Dadurch ist spezifisch nur das Proteasegen bzw. die Proteasegenkombination in den

generierten MEFs ausgeschaltet und die jeweilige/n Protease/n nicht aktiv. Im Gegensatz dazu, ist die Selektivität der bisher verwendeten Hemmstoffe (GI, GW, A10Pro) zum Teil sehr unterschiedlich, weil die meisten Inhibitoren nicht nur eine Protease blockieren können (Ludwig *et al.*, 2005).

Zur Untersuchung des konstitutiven *Sheddings* von TIM-2 wurden die MEFs mit der AP-TIM-2 cDNS transient transfiziert und nach 24 stündiger Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem DMEM ohne FKS. Nach einer weiteren 24 h Inkubation wurde das Kulturmedium für die AP-Analyse abgenommen und die Zellen lysiert. Im Anschluss folgte die Quantifizierung von AP-TIM-2 im Zelllysat und Zellüberstand per AP-Assay. Das Diagramm in Abb. 18A zeigt die berechneten Spaltungseffizienzen für die verschiedenen MEFs. Nach 24 stündiger Kultivierung wurde AP-TIM-2 in Wildtyp MEFs und ADAM17^{-/-} MEFs annähernd gleich stark konstitutiv geschnitten, während in den ADAM10^{-/-} MEFs und in den doppelt-defizienten MEFs nahezu kein konstitutives TIM-2 *Shedding* nach 24 stündiger Inkubation detektierbar war.

Im nächsten Schritt wurden die AP-TIM-2 transfizierten MEFs mit PMA oder Ionomycin stimuliert. PMA führte in ADAM17^{-/-} MEFs erwartungsgemäß nicht zur Proteolyse von TIM-2. Die berechneten Spaltungseffizienzen nach PMA-Stimulation (siehe Abb. 18B) waren nahezu identisch mit denen der unbehandelten Kontrolle. Ionomycin hingegen stimulierte die Freisetzung von AP-TIM-2 in Wildtyp MEFs und ADAM17^{-/-} MEFs, da die Spaltungseffizienz auf 0,6 anstieg (siehe Abb. 18B). Dieser Anstieg war wiederum gehemmt in ADAM10^{-/-} sowie ADAM10^{-/-}/ADAM17^{-/-} doppelt-defizienten MEFs.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass ADAM10 konstitutiv TIM-2 spalten kann und durch Ionomycin (aber nicht PMA) diese ADAM10-vermittelte TIM-2 Prozessierung verstärkt wird.

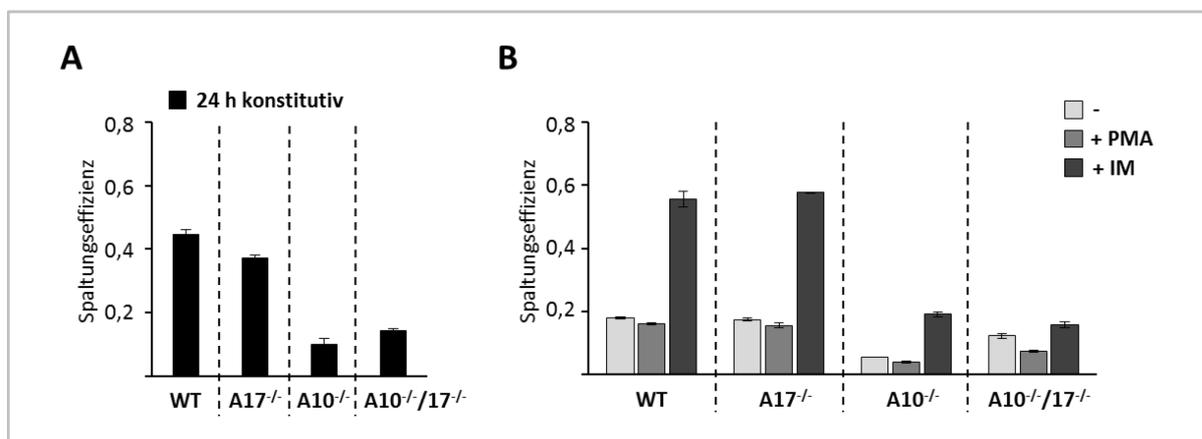


Abb. 18: Shedding-Analyse von AP-TIM-2 in WT, A10^{-/-}, A17^{-/-} und A10^{-/-}/A17^{-/-} MEFs. (A) AP-Assay. Wildtyp (WT), ADAM10 (A10^{-/-}), ADAM17 (A17^{-/-})- und doppelt (A10^{-/-}/A17^{-/-})-defiziente MEFs wurden transient mit AP-TIM-2 cDNS transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM^{-/-} und die Zellen wurden für weitere 24 h inkubiert. Danach wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen lysiert. Nach der Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität von AP-TIM-2 im Zelllysat und sAP-TIM-2 im Zellüberstand bei 405 nm wurden die Spaltungseffizienzen (= $\text{AP-Aktivität}_{\text{Überstand}} / (\text{AP-Aktivität}_{\text{Lysat}} + \text{AP-Aktivität}_{\text{Überstand}})$) berechnet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit den Mittelwerten einer Dreifachbestimmung \pm SD (n.s.=nicht signifikant, *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001). **(B)** AP-Assay. Die MEFs wurden wie unter A beschrieben transfiziert und 48 h nach der Transfektion mit PMA (100 nm) für 2 h oder Ionomycin (IM, 2,5 μ M) für 30 min stimuliert. Der AP-Assay und die Bestimmung der Spaltungseffizienzen erfolgten analog zu Abb. A.

3.3 Shedding von endogenem TIM-2 in primären murinen B Zellen

Nachdem in Zellkulturlinien durch TIM-2 Überexpression gezeigt wurde, dass die Protease ADAM10 TIM-2 spaltet, sollte als Nächstes der endogene *Shedding*-Nachweis in primären murinen B Zellen erfolgen. Es war bereits beschrieben, dass B Zellen nach Stimulation mit anti-IgM und anti-CD40 Antikörpern endogen TIM-2 exprimieren (Chen *et al.*, 2005; Kawamoto *et al.*, 2011). Daher wurden B Zellen aus der Milz von Mäusen isoliert und mit anti-IgM und anti-CD40 Antikörpern für 0-72 h aktiviert. Zuerst wurde in der durchflusszytometrischen Analyse anhand des B Zelloberflächenrezeptors CD45R/B220 die B Zellpopulation bestimmt (siehe Abb. 19A). In diesen B Zellen wurde dann die TIM-2 Expression gemessen, die in Abb. 19B dargestellt ist. Es war nach 48 und 72 h Inkubation mit anti-IgM und anti-CD40 Antikörpern eine deutliche Fluoreszenzzunahme und dementsprechend die endogene TIM-2 Expression auf B Zellen detektierbar.

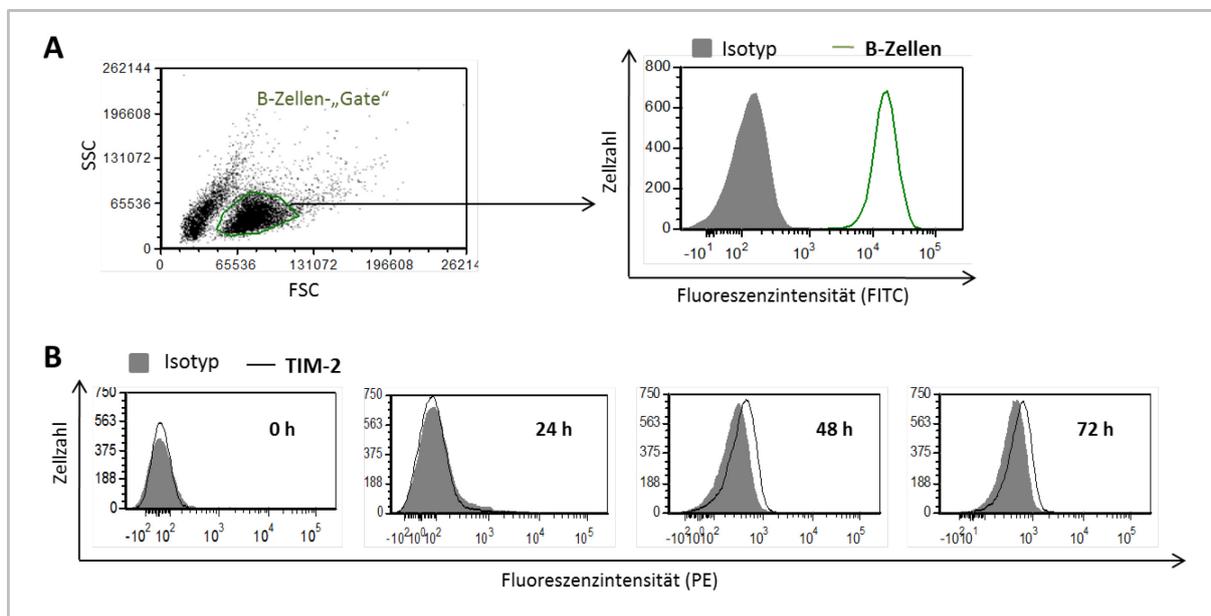


Abb. 19: Zelloberflächenexpression von endogenem TIM-2 auf primären murinen B Zellen. (A) Durchflusszytometrische Detektion der B Zellen. Primäre murine B Zellen aus der Milz wurden für 72 h mit 5 µg/ml anti-IgM und 5 µg/ml anti-CD40 stimuliert und mit einem FITC-markierten anti-CD45R/B220 Antikörper gefärbt. Als Kontrolle wurden identische Zellen mit dem FITC-Isotyp Antikörper markiert. Links im grünen „Gate“ ist die B Zellpopulation dargestellt und rechts die dazugehörige Fluoreszenzintensität der Zellen. (B) Isolierte murine B Zellen aus der Milz wurden für 0-72 h mit 5 µg/ml anti-IgM und 5 µg/ml anti-CD40 zur TIM-2 Expression aktiviert und für die Durchflusszytometrie mit einem PE-anti-TIM-2 Antikörper markiert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit einem PE-Isotyp Antikörper markiert. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Zellen.

Als Nächstes wurden die aktivierten B Zellen (nach 72 h Stimulation mit anti-IgM und anti-CD40) für 30 min mit BzATP oder Ionomycin in An- und Abwesenheit des ADAM10-spezifischen Inhibitors GI stimuliert. Durch die Aktivierung von ADAM10 mit BzATP oder Ionomycin wurde die endogene TIM-2 Zelloberflächenexpression auf das Kontrollniveau des Isotyps reduziert (Abb. 20A, B). Allerdings verhinderte der ADAM10-spezifische Inhibitor GI diesen TIM-2 Verlust auf der Zelloberfläche von B Zellen. Diese Ergebnisse deuten an, dass primäre B Zellen endogenes TIM-2 durch ADAM10 prozessieren können.

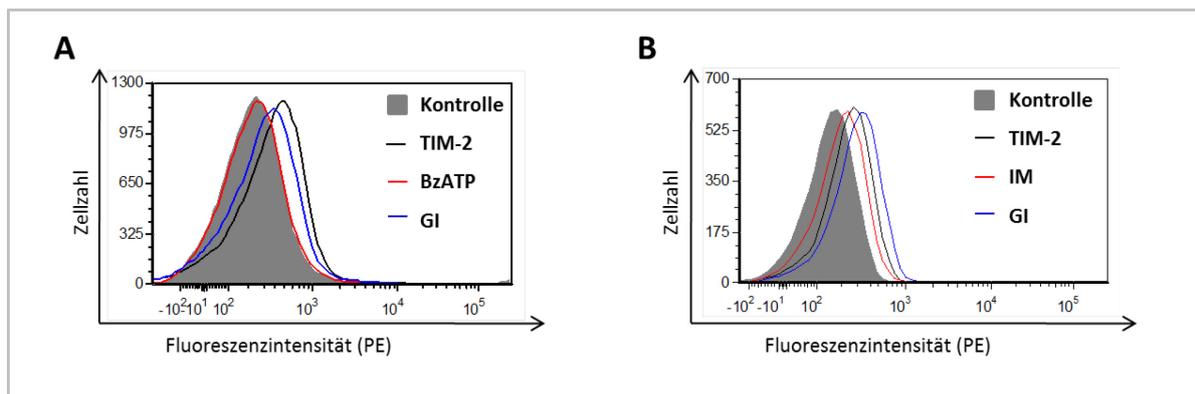


Abb. 20: Shedding-Analyse von endogenem TIM-2 auf primären murinen B Zellen nach Stimulation mit BzATP und IM. (A, B) Primäre murine B Zellen aus der Milz wurden mit 5 µg/ml anti-IgM und 5 µg/ml anti-CD40 zur TIM-2 Expression aktiviert und 72 h später mit BzATP (500 µM) oder Ionomycin (IM, 2,5 µM) für 30 min, in An- und Abwesenheit von GI254023X (GI, 3 µM, hemmt ADAM10) stimuliert. Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit einem PE-anti-TIM-2 Antikörper markiert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit einem PE-Isotyp Antikörper markiert. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität der Zellen.

3.4 Herstellung einer nicht-spaltbaren TIM-2 Variante

Eine Prognose der ADAM10-Schnittstelle im TIM-2 Protein war nicht möglich, weil keine eindeutige ADAM10-Konsensussequenz existiert. Allerdings bevorzugt ADAM10 aliphatische Reste wie Alanin oder Threonin an der P1 Position und Valin, Glutamin oder Leucin an der P1' Position (Caescu et al., 2009). Außerdem befinden sich viele ADAM-Schnittstellen in direkter Nähe zur Plasmamembran (Hooper et al., 1997; Scheller et al., 2011a). Beispielsweise die Schnittstelle des Interleukin-6 Rezeptors (L-6R), ein Substrat von ADAM10 und ADAM17, ist 10 Aminosäuren von der Transmembrandomäne entfernt und liegt zwischen Gln357 und Asp358. Eine Deletion von 10 Aminosäuren im Bereich dieser Schnittstelle hemmte die ADAM17-vermittelte Spaltung des IL-6R nach PMA-Stimulation (Müllberg *et al.*, 1994), aber nicht das ADAM10-induzierte *Shedding* (Baran et al., 2013).

Interessanterweise beschreiben Zhang et al. eine nicht-spaltbare TIM-1 Variante, die eine Deletion von 7 Aminosäuren in der Mucinregion vor der Transmembrandomäne enthält ($\Delta 278-283$ FLEHSL). Diese Deletion führte zur Inhibition der TIM-1 Proteolyse nach der Stimulation mit dem Tyrosinphosphatase Inhibitor Pervanadat (Zhang et al., 2007). Dementsprechend wurden als nächstes jeweils 10 Aminosäuren lange Abschnitte im juxtamembranen Bereich der TIM-2 Mucindomäne deletiert, um einen relevanten Bereich für die ADAM10-vermittelte TIM-2 Spaltung zu finden.

3.4.1 Generierung der Expressionsplasmide für die Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3

Um gezielt 10 Aminosäuren im TIM-2 Protein zu deletieren, musste der spezifische Sequenzabschnitt mithilfe einer SOE-PCR (siehe 2.2.3.3) aus der TIM-2 cDNS entfernt werden. Die dafür verwendeten „Mutations-Primer“ enthielten nicht den zu deletierenden Sequenzbereich. Als Ausgangstemplate für die ersten beiden Amplifikationsschritte, mit jeweils einem äußeren TIM-2-Primer und einem „Mutations-Primer“ (siehe Tab. 7), diente der Vektor pcDNA3.1(+)-mTIM-2. Die beiden generierten Deletionsamplifikate wurden dann in einer dritten PCR vereinigt, da die „Mutations-Primer“ so gewählt wurden, dass sie zueinander komplementär sind. Die finalen TIM-2 Mutationsprodukte wurden anschließend gereinigt und wie der Vektor pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2 mit *Afl*III und *Not*I geschnitten. Nach der Reinigung des *Afl*III und *Not*I gespaltenen Plasmids folgte die Ligation zwischen dem jeweiligen TIM-2 Deletionsprodukt (Δ1, Δ2 oder Δ3) und dem geöffneten Vektor. Die erzeugten Vektoren wurden per DNA-Sequenzierung überprüft und im Folgenden als pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3 bezeichnet.

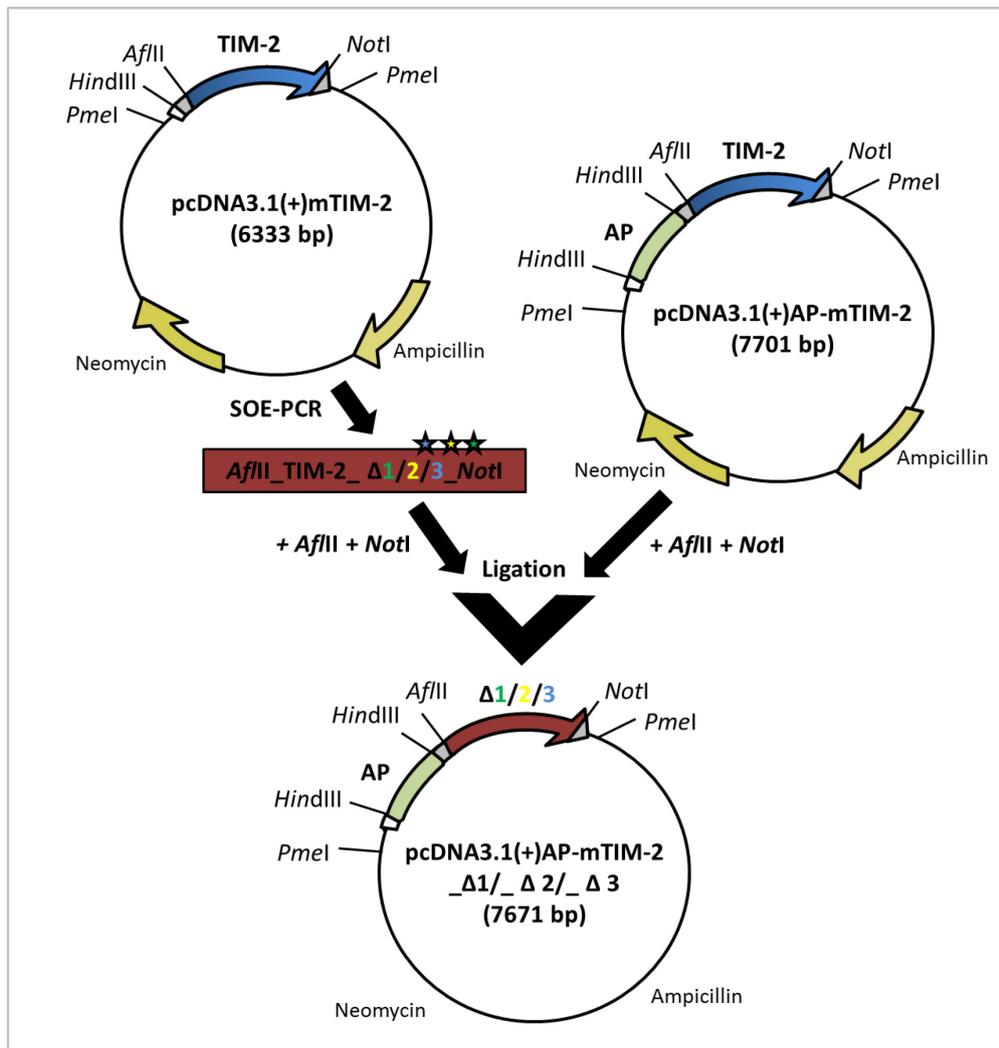


Abb. 21: Konstruktion der Expressionsplasmide für die drei Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2, und _Δ3. Die genaue Generierung der Plasmide ist unter 3.4.1 beschrieben.

3.4.2 Die Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3 werden auf der Oberfläche von HEK293 Zellen exprimiert

Die generierten Mutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3 enthalten jeweils eine Deletion von 10 Aminosäuren innerhalb der Mucindomäne im juxtamembranen Bereich des TIM-2 Proteins. Die AP-TIM-2_Δ1 Mutante enthält einen 10 Aminosäuren langen Deletionsabschnitt im extrazellulären Bereich von TIM-2, der direkt an die Transmembrandomäne grenzt. Die darauffolgenden 10 Aminosäuren der TIM-2 Mucindomäne wurden bei der Mutante AP-TIM-2_Δ2 entfernt und die daran anschließenden 10 Aminosäuren fehlen bei der AP-TIM-2_Δ3 Mutante. Die genaue Lage der Deletionen und die exakten Aminosäuresequenzen sind in Abb. 22A dargestellt. Bis auf ihre Deletionen sind die Mutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3 mit dem AP-TIM-2 Protein identisch und besitzen ebenfalls am N-Terminus ein Signalpeptid (SP), die Alkalischen Phosphatase (AP), ein Flag-Epitop sowie ein C-terminales His-Epitop.

Für den Nachweis der Zelloberflächenexpression der AP-TIM-2 Deletionsmutanten wurden HEK293 Zellen mit pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2_Δ1, _Δ2 oder _Δ3 transient transfiziert und via Durchflusszytometrie analysiert. Wie in Abb. 22B dargestellt ist, war für alle drei Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3 eine Fluoreszenzzunahme (von 10^5) detektierbar und demnach wurden die Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3 auf der Oberfläche von HEK293 Zellen exprimiert. Als nächstes galt es die proteolytische Spaltung der Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3 durch ADAM10 und ADAM17 zu überprüfen.

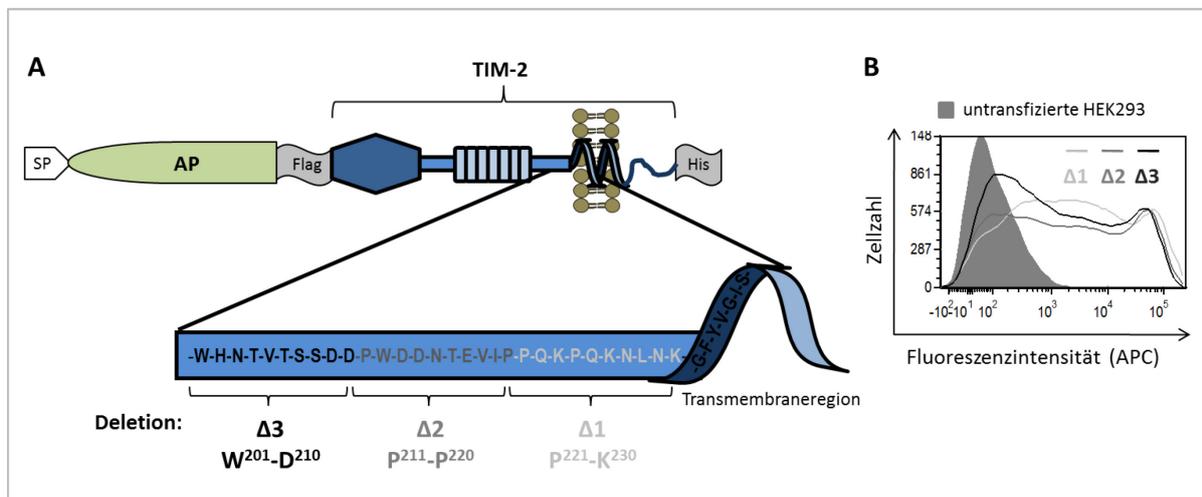


Abb. 22: Schematische Darstellung und Zelloberflächenexpression der Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3. (A) Übersicht der AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3 Proteine mit Signalpeptid (SP), Alkalischer Phosphatase (AP), Flag-Epitop, variable Immunglobulindomäne (IgV), Mucindomäne, Transmembrandomäne (TM), intrazelluläre Domäne (ICD) und Histidin-Epitop (His). (B) Durchflusszytometrische Analyse der Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3 auf HEK293 Zellen. HEK293 Zellen wurden mit pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2_Δ1, _Δ2 oder _Δ3 transient transfiziert und für die Durchflusszytometrie mit einem anti-Flag (M2) und einem APC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt. Als Kontrolle wurden untransfizierte HEK293 Zellen identisch gefärbt. Angezeigt ist die Fluoreszenzintensität der Zellen.

3.4.3 Die Deletionsmutante AP-TIM-2_Δ1 wird nicht durch ADAM10 gespalten

Ziel dieser Mutagenesestudien war es, einen für das ADAM10-vermittelte *Shedding* relevanten Bereich in der Mucinregion des TIM-2 Proteins zu identifizieren. Deshalb wurde das *Shedding*-Verhalten der drei Deletionsvarianten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3 untersucht und quantifiziert. Für diese Analyse wurden HEK293 oder COS-7 Zellen mit den Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 oder _Δ3 transient transfiziert und 48 h später mit PMA, BzATP oder Ionomycin stimuliert. Der *Shedding*-Nachweis erfolgte per Western Blot mit dem anti-Flag Primärantikörper M1 und zur Verifizierung über einen AP-Assay. Die Expression der Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3 in den Zelllysaten war mittels Western Blot-Analyse nachweisbar, aber eine lösliche Variante der drei Deletionsmutanten in den Zellkulturüberständen nach der Stimulation mit PMA konnte nicht detektiert werden (Abb. 23A). Sowohl ohne als auch mit PMA-Stimulation lagen die im AP-Assay gemessenen Spaltungseffizienzen der Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3 bei 0 (Abb. 23B). Dementsprechend wurden die untersuchten Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3, analog zu TIM-2, nach der Stimulation mit PMA nicht durch ADAM17 prozessiert. Nach der ADAM10-Aktivierung mit BzATP oder Ionomycin wurden die Deletionsmutanten AP-TIM-2_Δ2 und _Δ3 geschnitten aber interessanterweise nicht die Mutante AP-TIM-2_Δ1. Es konnte keine löslich AP-TIM-2_Δ1 Variante im Zellkulturüberstand nach BzATP- oder IM-Stimulation per Western Blot detektiert werden (Abb. 23C, E). Die AP-Analyse verifiziert, dass die Deletionsmutante AP-TIM-2_Δ1 nicht durch ADAM10 gespalten wird (Abb. 23).

Interessanterweise war die im Western Blot detektierte AP-TIM-2_Δ2 Proteinbande im Zellkulturüberstand nach der Stimulation mit BzATP oder IM deutlich schwächer als die Bandenintensität der identisch behandelten AP-TIM-2_Δ3 Mutante (Abb. 23C, E). Außerdem führte die Stimulation mit BzATP oder IM zu einem sehr geringen Anstieg der Spaltungseffizienz von AP-TIM-2_Δ2 im AP-Assay (Abb. 23D, F). Die spezifischen Inhibitoren GI (ADAM10-spezifisch) und GW (ADAM10- und 17-spezifisch) konnten das BzATP- oder Ionomycin-induzierte *Shedding* von AP-TIM-2_Δ2 und _Δ3 hemmen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die ADAM10-vermittelte Spaltung von AP-TIM-2_Δ2 nach der Stimulation mit BzATP oder IM deutlich geringer als die AP-TIM-2_Δ3 Prozessierung war und, dass die Deletionsmutante AP-TIM-2_Δ1 nicht durch ADAM10 oder ADAM17 geschnitten wurde. Demnach könnte die vermutete ADAM10-Schnittstelle im juxtamembranen Bereich des TIM-2 Proteins zwischen P²²¹-K²³⁰ liegen.

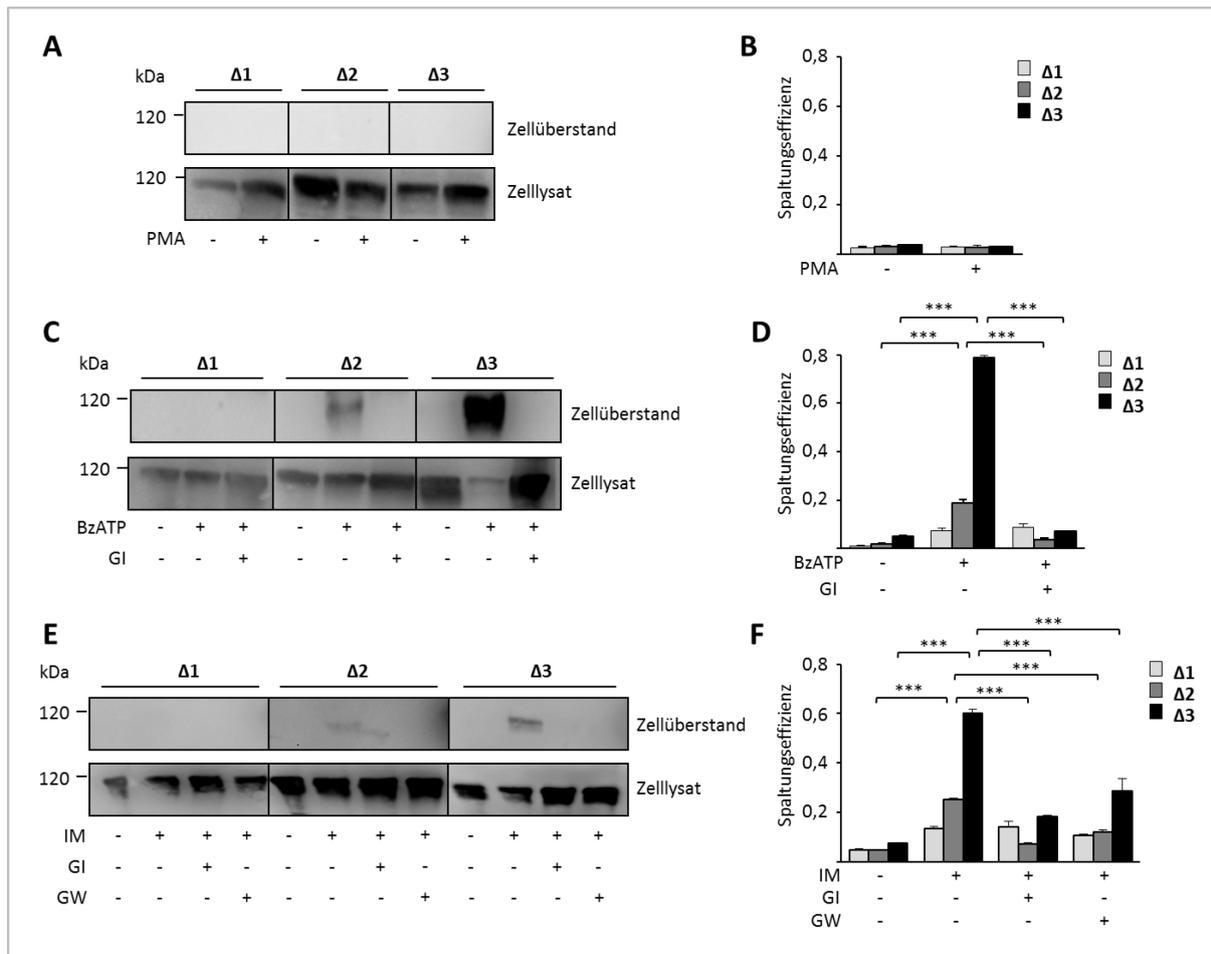


Abb. 23: Shedding-Analyse von AP-TIM-2 Δ_1 , Δ_2 und Δ_3 nach Stimulation mit PMA, BzATP oder IM. (A, C, E) Western Blots. HEK293 (A, C) und COS-7 (E) Zellen wurden transient mit AP-TIM-2 Δ_1 , Δ_2 oder Δ_3 cDNS transfiziert. Für die BzATP-Aktivierung wurden die Zellen co-transfiziert mit hP2X7R cDNS. 48 h nach der Transfektion folgte die Stimulation mit PMA (100 nM) für 2 h, mit BzATP (500 μ M) oder Ionomycin (IM, 2,5 μ M) für 30 min, in An- und Abwesenheit von GI254023X (GI, 3 μ M, hemmt ADAM10) oder GW280264X (GW, 3 μ M, hemmt ADAM10 und ADAM17). Die Inhibitoren wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. Die Western Blot Detektion erfolgte mit dem anti-Flag (M1) Primärantikörper. **(B, D, F) AP-Assays.** Hierzu wurden die Zellen, wie unter A beschrieben, transfiziert und stimuliert. Nach der Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivitäten im Zellysat und im Zellüberstand bei 405 nm wurden die Spaltungseffizienzen (= $AP\text{-Aktivität}_{\text{Überstand}} / (AP\text{-Aktivität}_{\text{Lysat}} + AP\text{-Aktivität}_{\text{Überstand}})$) berechnet. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment mit den Mittelwerten einer Dreifachbestimmung \pm SD (n.s.=nicht signifikant, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$).

3.4.4 Shedding-Analyse der Deletionsmutanten AP-TIM-2 Δ_1 , Δ_2 und Δ_3 in ADAM10- und ADAM17-defizienten MEFs

Zur unabhängigen Verifizierung, dass ADAM10 die AP-TIM-2 Δ_1 Mutante nicht prozessiert, wurde die Shedding-Analyse in den bereits beschriebenden Protease-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) durchgeführt. Dazu wurden ADAM10-, ADAM17- und ADAM10/17-defiziente MEFs mit der AP-TIM-2 Δ_1 , Δ_2 oder Δ_3 cDNS transient transfiziert und 48 h später mit Ionomycin stimuliert. Die berechneten Spaltungseffizienzen nach der AP-Analyse sind in Abb. 24 dargestellt. Nach der Stimulation mit Ionomycin wurde die AP-TIM-2 Δ_3 Deletionsmutante in Wildtyp sowie ADAM17-defizienten MEFs prozessiert, jedoch nicht in ADAM10- und ADAM10/17-doppelt-defizienten MEFs. Die AP-TIM-2 Δ_2 Mutante hingegen

wurde in Wildtyp MEFs sehr schwach und in den Protease-defizienten MEFs nicht prozessiert. Erwartungsgemäß sollte die AP-TIM-2_Δ2 Mutante auch in den ADAM17^{-/-} MEFs durch ADAM10 gespalten werden. Die AP-TIM-2_Δ1 Mutante wurde sowohl in den Wildtyp MEFs als auch in den ADAM-defizienten MEFs nicht gespalten, da alle berechneten Spaltungseffizienzen unter 0,1 lagen. Dementsprechend legen diese Daten nahe, dass die ADAM10-Schnittstelle zwischen P221 und K230 im TIM-2 Protein liegen könnte.

Als nächstes wurde der Einfluss der Immunglobulin- und der intrazellulären Domäne auf das ADAM10-vermittelte TIM-2 *Shedding* untersucht.

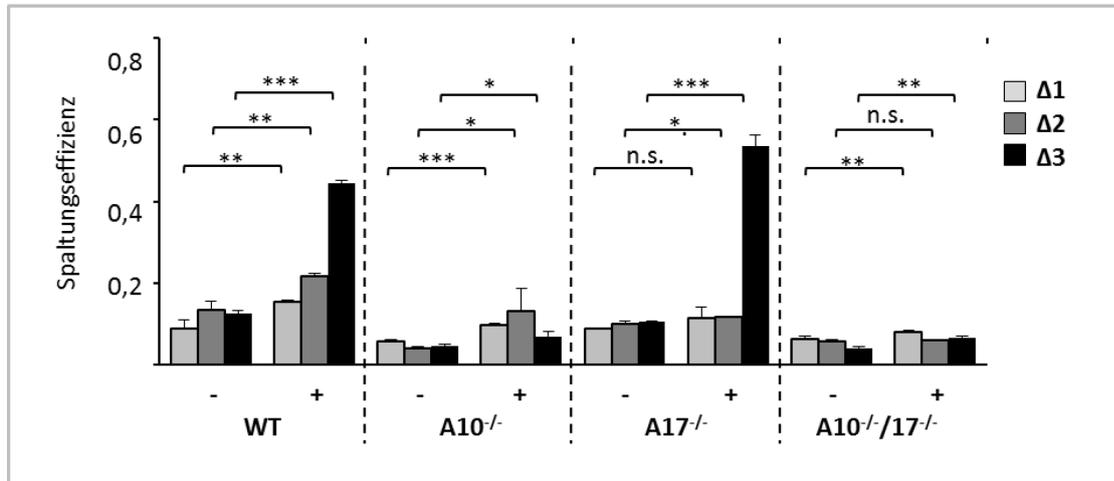


Abb. 24: *Shedding*-Analyse von AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 und _Δ3 in WT, A10^{-/-}, A17^{-/-} und A10^{-/-}/A17^{-/-} MEFs. AP-Assay. Wildtyp (WT), ADAM10 (A10^{-/-}), ADAM17 (A17^{-/-}) und doppelt(A10^{-/-}/A17^{-/-})-defiziente MEFs wurden transient mit AP-TIM-2_Δ1, _Δ2 oder _Δ3 cDNS transfiziert und 48 h später mit Ionomycin (IM, 2,5 μM) für 30 min stimuliert. Nach der Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivitäten im Zellysat und im Zellüberstand bei 405 nm wurden die Spaltungseffizienzen (= AP-Aktivität_{Überstand}/(AP-Aktivität_{Lysat} + AP-Aktivität_{Überstand})) berechnet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit den Mittelwerten einer Dreifachbestimmung ±SD (n.s.=nicht signifikant, *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001).

3.5 Die Immunglobulindomäne und der intrazelluläre Teil von TIM-2 spielen keine Rolle für die Prozessierung durch ADAM10

3.5.1 Generierung der Expressionsplasmide für die Mutanten AP-TIM-2_ΔIgV und AP-TIM-2_ΔICD

Für die Mutation der Immunglobulindomäne (ΔIgV) wurde eine PCR mit dem Primerpaar 5'ΔIgV_AfII und 3'TIM-2(+Stop)_NotI (siehe Tab. 7) sowie dem pcDNA3.1(+)-mTIM-2 Vektor als Template durchgeführt. Zur Amplifikation des TIM-2 Proteins ohne zytoplasmatische Domäne wurde das gleiche Template sowie die Primer 5'mTIM-2_AfII und 3'ΔICD_NotI für die PCR verwendet. Die erzeugten PCR-Produkte wurden jeweils über AfII und NotI in einen pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2 Vektor kloniert und im Folgenden als pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2_ΔIgV und _ΔICD bezeichnet.

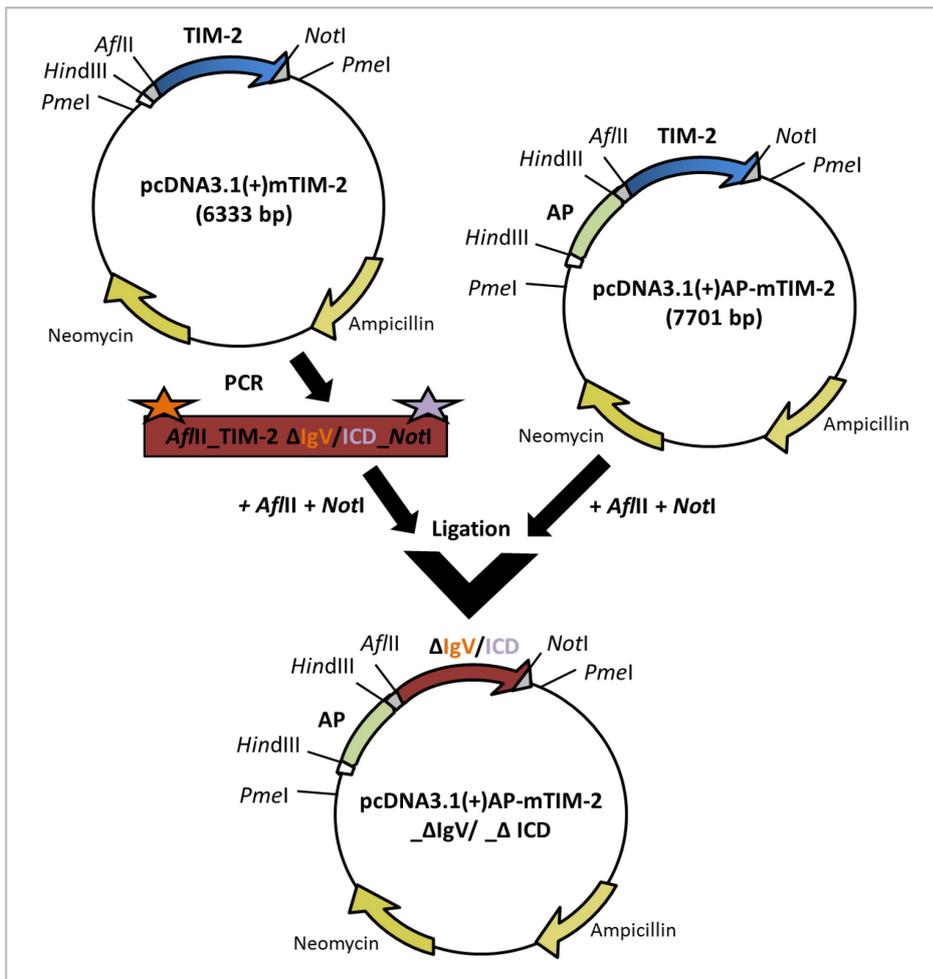


Abb. 25: Konstruktion der Expressionsplasmide für die Deletionsmutanten AP-TIM-2 Δ IgV und Δ ICD. Die genaue Beschreibung der Plasmid-Generierung ist unter 3.5.1 aufgeführt.

3.5.2 AP-TIM-2 Δ IgV und Δ ICD werden auf der Oberfläche von HEK293 Zellen exprimiert

Zur weiteren Charakterisierung der ADAM10-induzierten Spaltung von TIM-2 sollte der Einfluss der Immunglobulin (IgV)- sowie der intrazellulären Domäne (ICD) von TIM-2 untersucht werden. In Abb. 26A ist die AP-TIM-2 Δ IgV Mutante ohne N-terminaler Immunglobulindomäne grafisch dargestellt, während Abb. 26B die AP-TIM-2 Δ ICD Mutante ohne C-terminalen intrazellulären Teil zeigt. Beide Deletionsmutanten besitzen am N-Terminus ein Signalpeptid (SP), die Alkalischen Phosphatase (AP) und ein Flag-Epitop.

Zum Nachweis der Expression von AP-TIM-2 Δ IgV und Δ ICD auf der Oberfläche von HEK293 Zellen wurden diese mit pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2 Δ IgV oder Δ ICD transient transfiziert und für die durchflusszytometrische Messung mit einem anti-Flag (M2) Primärantikörper gefolgt von einem APC-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Für beide Deletionsmutanten war eine deutliche Fluoreszenzzunahme (von 10^5) nachweisbar (Abb. 26) und demnach wurden die Deletionsmutanten AP-TIM-2 Δ IgV und Δ ICD auf der Oberfläche von HEK293 Zellen exprimiert.

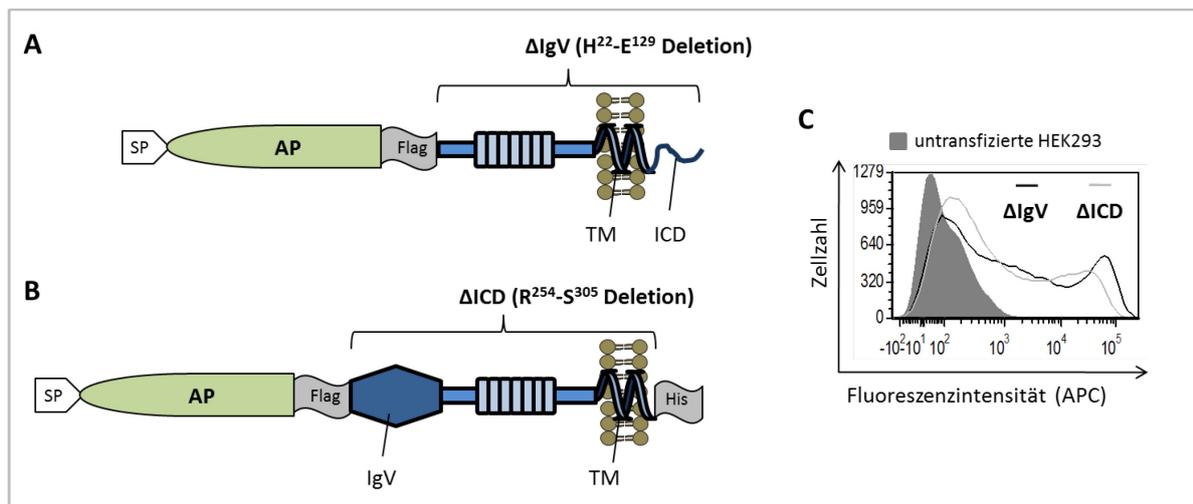


Abb. 26: Schematische Darstellung und Zelloberflächenexpression von AP-TIM-2_ΔIgV und _ΔICD. (A) Übersicht der AP-TIM-2_ΔIgV Mutante mit Signalpeptid (SP), Alkalischer Phosphatase (AP), Flag-Tag, extrazellulärer Teil mit der Mucindomäne, Transmembrandomäne (TM), intrazelluläre Domäne (ICD). **(B)** Übersicht der AP-TIM-2_ΔICD Mutante mit Signalpeptid (SP), Alkalischer Phosphatase (AP), Flag-Epitop, extrazellulärer Teil mit der variablen Immunglobulin (IgV)- und Mucindomäne, Transmembrandomäne (TM) und Histidin-Epitop (His). **(C)** Durchflusszytometrische Analyse von AP-TIM-2_ΔIgV und _ΔICD in HEK293 Zellen. HEK293 Zellen wurden mit pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2_ΔIgV oder _ΔICD transient transfiziert und für die Durchflusszytometrie mit einem anti-Flag (M2) und einem APC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt. Als Kontrolle wurden untransfizierte HEK293 Zellen identisch gefärbt. Angezeigt ist die Fluoreszenzintensität der Zellen.

3.5.3 Die Mutanten AP-TIM-2_ΔIgV und _ΔICD werden durch ADAM10 nach Stimulation mit BzATP oder Ionomycin prozessiert

Um zu untersuchen, ob die N-terminale Immunglobulindomäne (IgV) von TIM-2 oder die C-terminale intrazelluläre Domäne (ICD) das ADAM10-vermittelte *Shedding* von TIM-2 beeinflussen, wurden die Deletionsvarianten AP-TIM-2_ΔIgV und _ΔICD generiert. Für die Analyse der beiden Mutanten wurden HEK293 Zellen mit pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2_ΔIgV oder _ΔICD transient transfiziert und 48 h später mit PMA, BzATP oder Ionomycin stimuliert (Abb. 27).

Erwartungsgemäß kam es nach der PMA-Stimulation nicht zur Spaltung der Mutanten AP-TIM-2_ΔIgV und _ΔICD durch ADAM17. Nach der Stimulation mit BzATP oder Ionomycin wurden beide Mutanten wie das Wildtyp-TIM-2 prozessiert. Dies konnte zum einen durch die Western Blot-Analyse (siehe Abb. 27A, C, E) und zum anderen im AP-Assay (Abb. 27B, D, F) gezeigt werden. Durch die hemmende Wirkung der beiden Inhibitoren GI und GW auf das stimulierte *Shedding* von AP-TIM-2_ΔIgV und _ΔICD wurde gezeigt, dass ADAM10 für die Prozessierung beider Mutanten verantwortlich ist.

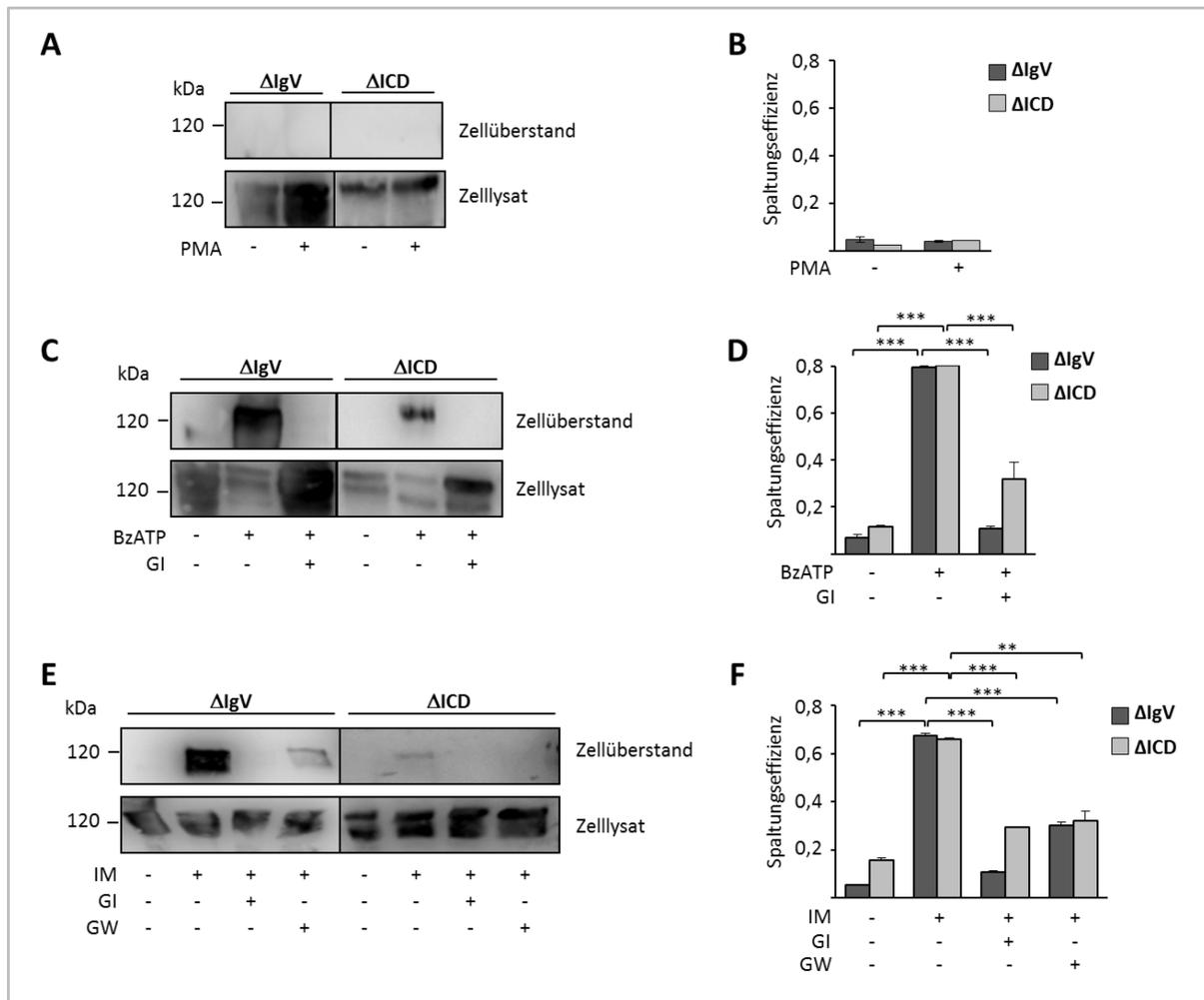


Abb. 27: Shedding-Analyse von AP-TIM-2_ΔIgV und ΔICD nach Stimulation mit PMA, BzATP oder IM. (A, C, E) Western Blots. HEK293 Zellen wurden mit der AP-TIM-2_ΔIgV oder ΔICD cDNS transient transfiziert. Für die BzATP-Aktivierung wurden die Zellen co-transfiziert mit hP2X7R cDNS. 48 h nach der Transfektion folgte die Stimulation mit PMA (100 nM) für 2 h und mit BzATP (500 μM) oder Ionomycin (IM, 2,5 μM) für 30 min, in An- und Abwesenheit von GI254023X (GI, 3 μM, hemmt ADAM10) oder GW280264X (GW, 3 μM, hemmt ADAM10 und ADAM17). Die Inhibitoren wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. Die Western Blot Detektion erfolgte mit dem anti-Flag (M1) Primärantikörper. **(B, D, F)** AP-Assays. Hierfür wurden die HEK293 Zellen, wie unter A beschrieben, transfiziert und stimuliert. Nach der Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivitäten im Zelllysat und im Zellüberstand bei 405 nm wurden die Spaltungseffizienzen ($= \text{AP-Aktivität}_{\text{Überstand}} / (\text{AP-Aktivität}_{\text{Lysat}} + \text{AP-Aktivität}_{\text{Überstand}})$) berechnet. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment mit den Mittelwerten einer Dreifachbestimmung \pm SD (n.s.=nicht signifikant, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$).

3.5.4 Shedding-Analyse der Deletionsmutanten AP-TIM-2_ΔIgV und ΔICD in ADAM10- und ADAM17-defizienten MEFs

Um sicherzustellen, dass ADAM10 die Prozessierung der Deletionsmutanten AP-TIM-2_ΔIgV und ΔICD vermittelt, wurden Protease-defiziente murine embryonale Fibroblasten (MEFs) mit der AP-TIM-2_ΔIgV oder ΔICD cDNS transient transfiziert und nach 48 h mit Ionomycin stimuliert. Die berechneten Spaltungseffizienzen sind in Abb. 28 grafisch dargestellt. Es wurde gezeigt, dass ADAM10 nach der Stimulation mit Ionomycin sowohl die AP-TIM-2_ΔIgV als auch die AP-TIM-2_ΔICD Mutante in Wildtyp und

ADAM17-defizienten MEFs prozessiert. In den ADAM10-defizienten MEFs $A10^{-/-}$ und $A10^{-/-}/A17^{-/-}$ war kein *Shedding* von AP-TIM-2_ΔIgV oder ΔICD detektierbar, da die Spaltungseffizienzen deutlich unter 0,2 lagen.

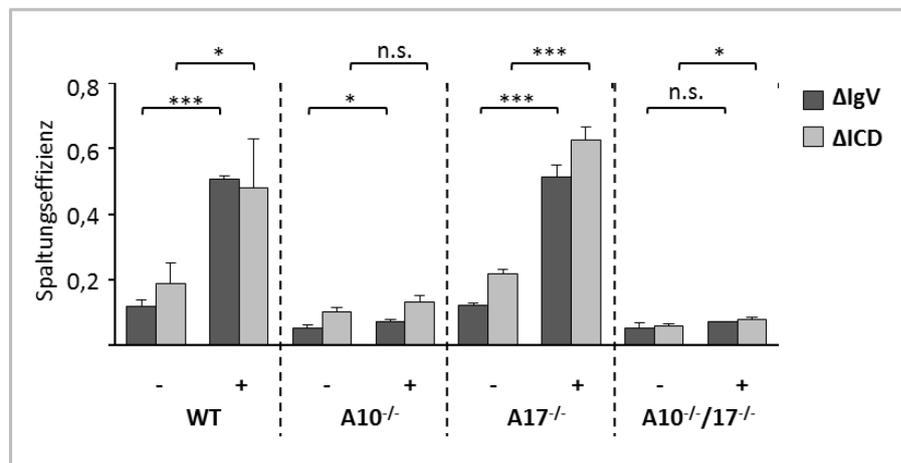


Abb. 28: *Shedding*-Nachweis von AP-TIM-2_ΔIgV und ΔICD in WT, $A10^{-/-}$, $A17^{-/-}$ und $A10^{-/-}/A17^{-/-}$ MEFs. AP-Assay. Wildtyp (WT), ADAM10 ($A10^{-/-}$), ADAM17 ($A17^{-/-}$)- und doppelt ($A10^{-/-}/A17^{-/-}$)-defiziente MEFs wurden mit pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2_ΔIgV oder ΔICD transient transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Ionomycin (IM, 2,5 μM) für 30 min stimuliert. Nach der Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivitäten im Zelllysat und im Zellüberstand bei 405 nm wurden die Spaltungseffizienzen (= $AP\text{-Aktivität}_{\text{Überstand}} / (AP\text{-Aktivität}_{\text{Lysat}} + AP\text{-Aktivität}_{\text{Überstand}})$) berechnet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit den Mittelwerten einer Dreifachbestimmung \pm SD (n.s.=nicht signifikant, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$).

3.6 Einfluss von Calmodulin auf das *Shedding* von TIM-2

3.6.1 Der Calmodulin-Antagonist W7 induziert *Shedding* von TIM-2

Eine Reihe von Studien zeigten, dass Calmodulin (CaM) das *Shedding* von Transmembranproteinen, wie zum Beispiel L-Selektin (Kahn *et al.*, 1998), APP (Canobbio *et al.*, 2011) und Semaphorin4D (Mou *et al.*, 2013), reguliert. Dabei bindet Calmodulin an die intrazelluläre oder auch transmembrane Region dieser Proteine und die Blockade dieser Interaktion durch den Calmodulin-Inhibitor W7 führte zur Induktion des ADAM-abhängigen *Sheddings*. Wie die bisherigen Ergebnisse belegen, wurde TIM-2 nach Stimulation mit BzATP oder Ionomycin durch ADAM10 prozessiert. Deshalb sollte als Nächstes untersucht werden, ob der Calmodulin-Antagonist W7 ebenfalls die Spaltung von TIM-2 aktiviert. Hierzu wurden HEK293 Zellen mit TIM-2 cDNS transient transfiziert und nach 48 h mit W7 (100 μM) für 1 h in An- und Abwesenheit der Inhibitoren GI (spezifisch für ADAM10) und GW (blockiert ADAM10 und 17) stimuliert. Wie in der Western Blot-Analyse von Abb. 29A dargestellt ist, war nach der Stimulation mit W7 lösliches TIM-2 (sTIM-2) im Zellkulturüberstand nachweisbar. Diese Spaltung von TIM-2 wurde durch den ADAM10-spezifischen Inhibitor GI oder durch den ADAM10/17-spezifischen Inhibitor GW gehemmt. Identische Resultate zeigten sich für AP-TIM-2 transient transfizierte HEK293 Zellen sowohl im Western Blot (Abb. 29B) als auch im AP-Assay (Abb. 29C). Demzufolge scheint Calmodulin an der Regulation der TIM-2 Freisetzung durch ADAM10 beteiligt zu sein.



Abb. 29: Shedding-Analyse von TIM-2 und AP-TIM-2 nach der Stimulation mit W7. (A, B) Western Blots. HEK293 Zellen wurden mit der TIM-2 oder der AP-TIM-2 cDNS transient transfiziert. 48 h nach der Transfektion folgte die Stimulation mit W7 (100 μ M) für 1 h in An- und Abwesenheit von GI254023X (GI, 3 μ M, hemmt ADAM10) oder GW280264X (GW, 3 μ M, hemmt ADAM10 und ADAM17). Die Inhibitoren wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. Die Western Blot Detektion erfolgte mit dem anti-Flag (M1) Primärantikörper. (C) AP-Assay. Hierfür wurden die HEK293 Zellen, wie unter A beschrieben, transfiziert und stimuliert. Nach der Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität von AP-TIM-2 im Zelllysat und sAP-TIM-2 im Zellüberstand bei 405 nm wurde die Spaltungseffizienz (= $\text{AP-Aktivität}_{\text{Überstand}} / (\text{AP-Aktivität}_{\text{Lysat}} + \text{AP-Aktivität}_{\text{Überstand}})$) berechnet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit den Mittelwerten einer Dreifachbestimmung \pm SD (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$).

3.6.2 Shedding-Analyse der Deletionsmutanten AP-TIM-2_ Δ 1 und Δ ICD nach der Inhibition von Calmodulin durch W7

Nach erfolgreichem Nachweis, dass der Calmodulin-Antagonist W7 *Shedding* von TIM-2 durch ADAM10 aktiviert, wurde als Nächstes die W7 induzierte Spaltung von AP-TIM-2_ Δ 1, der Deletionsmutante ohne potentielle ADAM10-Schnittstelle, untersucht. In Abb. 30 ist der dazugehörige Western Blot (A) und AP-Assay (C) dargestellt, die jeweils keine Spaltung der AP-TIM-2_ Δ 1 Mutante nach der Stimulation mit W7 zeigten. Sowohl der ADAM10-spezifische Inhibitor GI als auch der ADAM10/17-spezifische Inhibitor GW konnten die W7-induzierte Freisetzung der Mutante AP-TIM-2_ Δ 1 hemmen. Dementsprechend war ADAM10 nicht in der Lage nach der Calmodulin Inhibition durch W7 die Deletionsmutante AP-TIM-2_ Δ 1 zu schneiden.

Da, wie bereits erläutert, W7 die Interaktion zwischen Calmodulin und den transmembranen/intrazellulären Teil eines Proteins blockiert, stellte sich die Frage, ob die intrazelluläre Domäne von TIM-2 das W7 induzierte *Shedding* beeinträchtigt. Interessanterweise wurde die AP-TIM-2_ Δ ICD Mutante ohne intrazelluläre Domäne nach der Stimulation mit W7 ebenfalls von ADAM10 geschnitten, was sowohl im Western Blot (Abb. 30B) als auch im AP-Assay (Abb. 30C) nachgewiesen wurde. Die beiden Inhibitoren GI und GW verhinderten die W7-stimulierte Spaltung von AP-TIM-2_ Δ ICD durch ADAM10. Demzufolge scheint die Deletion der intrazellulären Domäne von TIM-2 keine Bedeutung für das W7-vermittelte *Shedding* durch ADAM10 zu haben.



Abb. 30: Shedding-Analyse von AP-TIM-2_Δ1 und ΔICD nach der Stimulation mit W7. (A, B) Western Blots. HEK293 Zellen wurden mit pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2_Δ1 oder ΔICD transient transfiziert. 48 h nach der Transfektion folgte die Stimulation mit W7 (100 μM) für 1 h, in An- und Abwesenheit von GI254023X (GI, 3 μM, hemmt ADAM10) oder GW280264X (GW, 3 μM, hemmt ADAM10 und ADAM17). Die Inhibitoren wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. Die Western Blot Detektion erfolgte mit dem anti-Flag (M1) Primärantikörper. **(C) AP-Assay.** Hierfür wurden die HEK293 Zellen wie unter A beschrieben, transfiziert und stimuliert. Nach der Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivitäten im Zelllysate und im Zellüberstand bei 405 nm wurden die Spaltungseffizienzen (= $\text{AP-Aktivität}_{\text{Überstand}} / (\text{AP-Aktivität}_{\text{Lysat}} + \text{AP-Aktivität}_{\text{Überstand}})$) berechnet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit den Mittelwerten einer Dreifachbestimmung ±SD (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$).

3.6.3 Interaktion zwischen TIM-2 und Calmodulin

Falls Calmodulin direkt an der *Shedding*-Regulation von TIM-2 durch ADAM10 beteiligt ist, sollte Calmodulin an TIM-2 binden. Deshalb wurde für das nächste Experiment Calmodulin (CaM)-gekoppelte Sepharose zur Präzipitation der Fusionsproteine AP-TIM-2, AP-TIM-2_Δ1 und ΔICD verwendet. In Abb. 33 ist dargestellt, dass sowohl AP-TIM-2 als auch die AP-TIM-2-Deletionsmutanten Δ1 und ΔICD durch die CaM-Sepharose präzipitiert wurden, jedoch aber nicht durch die ungekoppelte Sepharose. Demzufolge interagiert AP-TIM-2 sowie die Mutanten AP-TIM-2_Δ1 und ΔICD mit Calmodulin.

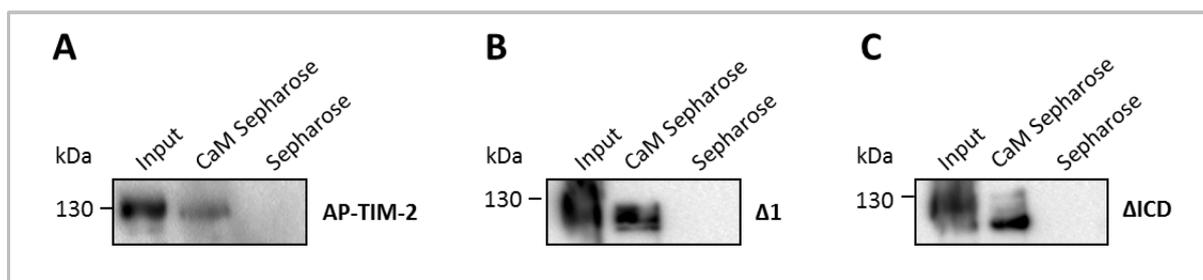


Abb. 31: Präzipitation von AP-TIM-2, AP-TIM-2_Δ1 und ΔICD mit Calmodulin-gekoppelter Sepharose. (A-C) Western Blots. HEK293 Zellen wurden mit pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2, pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2_Δ1 oder ΔICD transient transfiziert und 48 h später erfolgte die Zellyse. 150 μl Zelllysate wurden mit 200 μl Calmodulin (CaM) Sepharose oder ungekoppelte Sepharose über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Nachweis der präzipitierten Proteine erfolgte im Western Blot mit einem anti-Flag (M1) Primärantikörper.

3.7 Interaktion zwischen H-Ferritin und löslichem TIM-2Fc Protein

3.7.1 Vektorkonstruktion, schematische Darstellung und Expression von H-Ferritin

Für die *E.coli* Expression von H-Ferritin, dem Liganden von TIM-2, wurde der Vektor pet22b(+)-mH-Ferritin-PC erzeugt. Zuerst erfolgte die H-Ferritin PCR-Amplifikation von muriner Leber cDNS mit den *Primern* 5'H-Ferritin_*NdeI* und 3'H-Ferritin_*Bam*HI. Nach der Restriktion mit *NdeI* und *Bam*HI wurde das PCR-Produkt in den ebenfalls geschnittenen Vektor pet22b(+) (Novagen, Darmstadt) kloniert. Um am C-Terminus ein PC-Epitop zu erhalten, wurde ein PC-Linker mit den beiden *Primern* 5'L-PC-Tag_*Bam*HI und 3'L-PC-Tag_*Xho*I generiert. Nach der Anlagerung beider Oligonukleotide wurde der *Linker* in den *Bam*HI und *Xho*I geschnittenen H-Ferritin-Vektor kloniert.

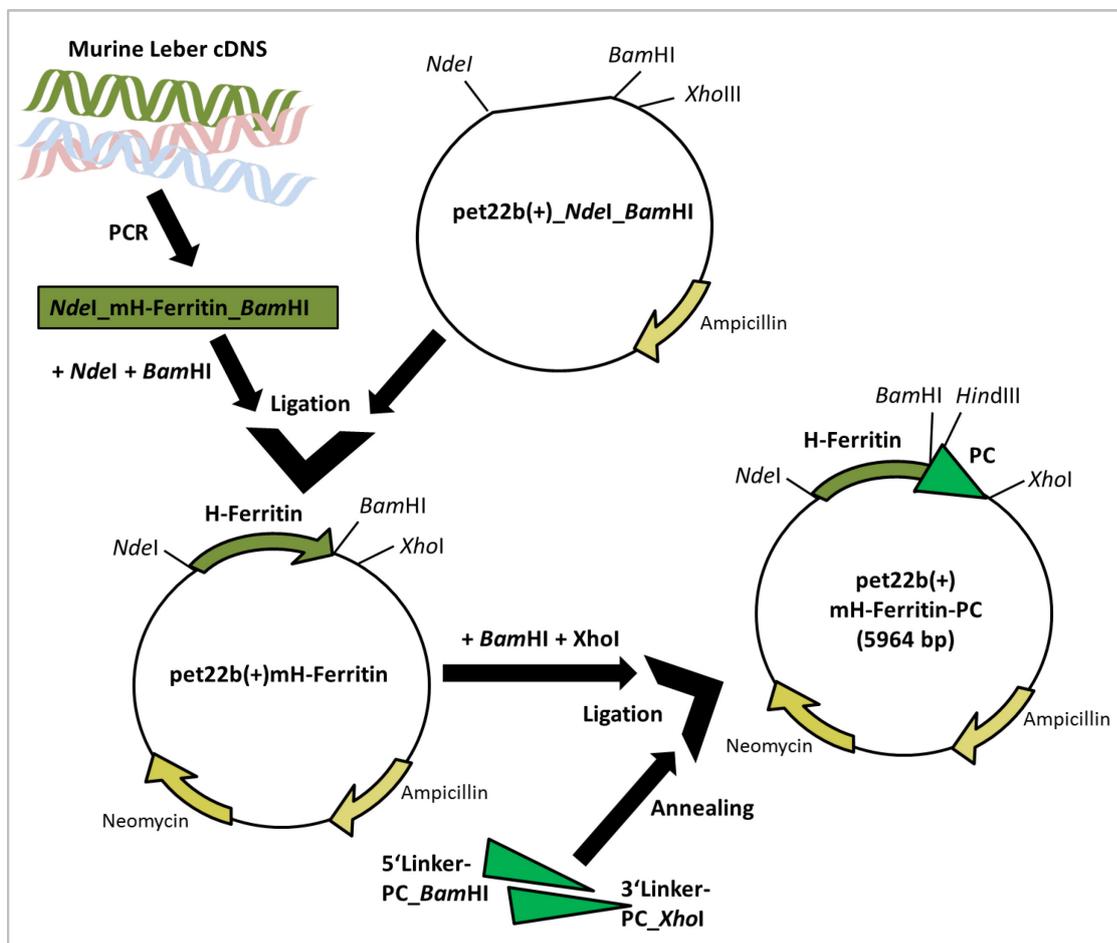


Abb. 32: Generierung des pet22b(+)-mH-Ferritin-PC Vektors. Unter 3.7.1 ist die exakte Erläuterung zur Plasmid-Konstruktion beschrieben.

In Abb. 33A ist das H-Ferritin Konstrukt schematisch dargestellt. Es besteht aus der vollständigen kodierenden Region für das murine H-Ferritin und einem C-terminalen PC-Epitop. Zum Nachweis der Expression von H-Ferritin wurde jeweils eine Probe vor und nach IPTG Zugabe mittels SDS-Page und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Hierfür wurde zuerst der *E.coli*-Stamm BL21 mit dem H-Ferritin

Expressionsvektor transformiert. Nach erfolgter Kultivierung der Bakterien und Induktion der Expression von H-Ferritin durch IPTG-Zugabe wurden die Bakterien lysiert und zentrifugiert. Der H-Ferritin-haltige Bakterienüberstand wurde bei 70°C für 20 min erhitzt, um unspezifische Bakterienproteine zu denaturieren und das hitzestabile H-Ferritin anzureichern.

In Abb. 33B (+ IPTG + 70°C) ist das exprimierte und gereinigte H-Ferritin als Proteinbande zwischen 20 und 25 kDa dargestellt. Das generierte H-Ferritin Protein wurde im Folgenden für Bindungsstudien mit löslichem TIM-2 verwendet.

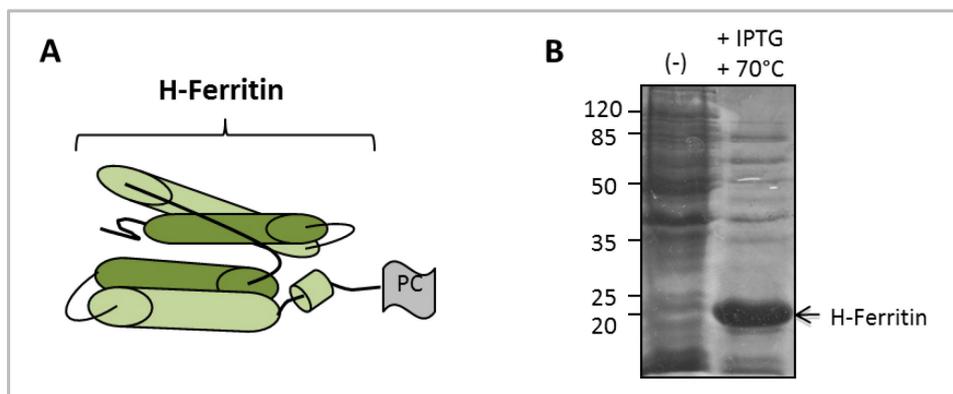


Abb. 33: Schema von H-Ferritin und dessen Expression in *E.coli* BL21. (A) Grafische Darstellung des murinen H-Ferritin Proteins mit C-terminalen PC-Epitop. (B) BL21 Bakterien wurden mit dem Expressionsplasmid pet22b(+)-mH-Ferritin-hPC transformiert. Nach erfolgter Expression von H-Ferritin durch IPTG Induktion und Reinigung über Hitze erfolgte der Expressionsnachweis via SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. Linke Spur: Bakterienüberstand vor der IPTG-Induktion als Negativkontrolle. Rechte Spur: Exprimiertes H-Ferritin im Bakterienüberstand, nach 2 h IPTG-Induktion und anschließender Reinigung durch Aufkochen bei 70°C für 20 min.

3.7.2 Vektorkonstruktion und schematische Übersicht von sTIM-2Fc

H-Ferritin wurde als natürlicher Ligand von TIM-2 beschrieben (Chen *et al.*, 2005; Todorich *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2011). Es konnte allerdings noch nicht gezeigt werden, ob H-Ferritin auch an lösliches TIM-2 bindet. Deshalb wurde eine TIM-2 cDNS, kodierend für sTIM-2, ohne Transmembran- und intrazelluläre Domäne, aber mit C-terminalem Fc-Epitop generiert. Zur Fusionierung der extrazellulären TIM-2 Domäne mit humanem Fc-Epitop wurde die bereits beschriebene SOE-PCR Strategie verwendet. Dementsprechend erfolgte in der ersten PCR die Amplifikation von sTIM-2 mit den *Primern* 5'sTIM-2_ HindIII sowie i3'sTIM-2(EcoRI) und den pcDNA3.1(+)-mTIM-2 Vektor als Template. In einer zweiten PCR wurde die humane IgG1-Fc Domäne amplifiziert mit dem *Primer*-Paar i5'hFc(EcoRI) und 3'hFc_NotI sowie dem Vektor pcDNA_DEST40sgp130-hFc(opt) als Template. In der darauffolgenden finalen PCR wurden beide Konstrukte vereinigt, anschließend gereinigt und wie der Vektor pcDNA3.1(+)-mTIM-2 mit HindIII und NotI geschnitten. Nach erfolgreicher Ligation entstand das Plasmid pcDNA3.1(+)-smTIM-2-hFc.

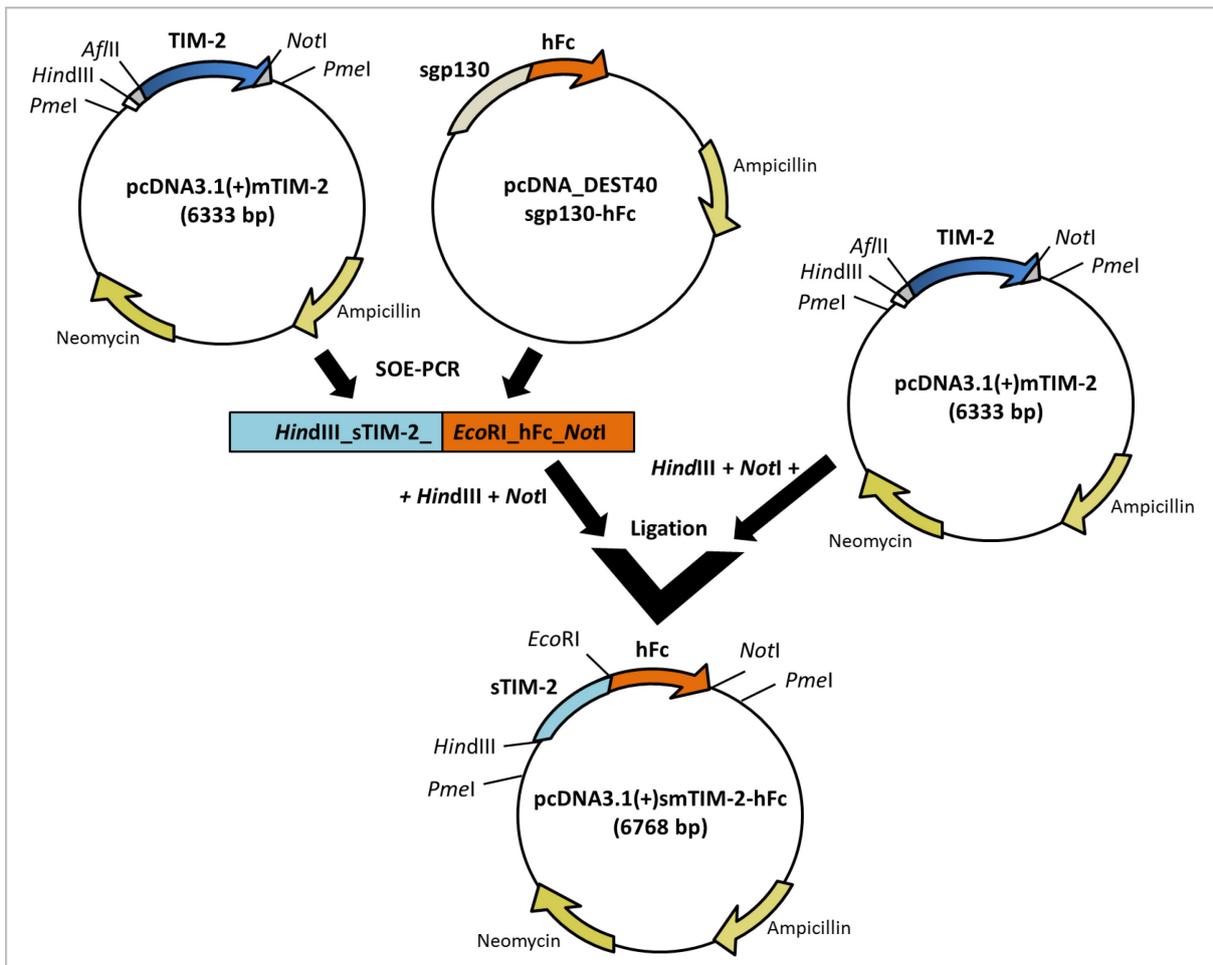


Abb. 34: Generierung des pcDNA3.1(+smTIM-2-hFc) Vektors. Die genaue Beschreibung zur Plasmid-Konstruktion ist unter 3.7.2 aufgeführt.

In Abb. 35 ist das lösliche TIM-2Fc Protein ohne Transmembran- und intrazelluläre Domäne, aber mit dem gesamten extrazellulären Bereich, bestehend aus N-terminaler Immunglobulin-domäne sowie der Mucinregion, grafisch dargestellt. Außerdem enthält das sTIM-2Fc Protein ein Signalpeptid (SP) am N-Terminus und ein humanes IgG1-Fc-Epitop am C-Terminus.

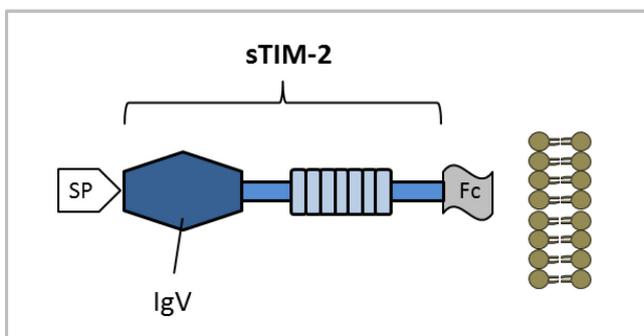


Abb. 35: Schematische Darstellung von sTIM-2-Fc. Am N-Terminus befindet sich ein Signalpeptid (SP), gefolgt vom extrazellulären Bereich (Immunglobulin (IgV)- und Mucindomäne) des TIM-2 Proteins, der die kodierende Region von Aminosäure H²²-K²³⁰ umfasst. Am C-Terminus ist ein humanes IgG1-Fc-Epitop fusioniert.

3.7.3 Das lösliche sTIM-2Fc Protein bindet an rekombinantes H-Ferritin

Da der Zelloberflächenrezeptor TIM-2 an H-Ferritin bindet, sollte als Nächstes untersucht werden, ob lösliches TIM-2 (sTIM-2Fc) in der Lage ist, an rekombinantes H-Ferritin zu binden. Wie der Western Blot in Abb. 36A belegt, führte die Präzipitation von sTIM-2Fc mit Protein-G-Sepharose in Anwesenheit von H-Ferritin zur Co-Präzipitation von H-Ferritin. Im Überstand des sTIM-2Fc Protein-G-Sepharose Sedimentes war kein H-Ferritin und sTIM-2Fc nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass sTIM-2Fc vollständig durch die Protein-G-Sepharose präzipitiert wurde und H-Ferritin vollständig an sTIM-2 gebunden hat. Als Negativkontrolle wurde gezeigt, dass das nicht verwandte Fc-Fusionsprotein sgp130Fc (Jostock *et al.*, 2001) nicht das H-Ferritin Protein co-präzipitieren konnte. Dementsprechend handelte es sich nicht, um eine unspezifische H-Ferritin Bindung an das Fc-Epitop von sTIM-2Fc.

Als weitere Nachweismethode für die Bindung zwischen sTIM-2Fc und H-Ferritin sowie zur genauen Quantifizierung von gebundenen sTIM-2Fc wurde ein ELISA etabliert. Dazu wurde H-Ferritin an eine ELISA-Platte gekoppelt und mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen (1:10 bis 1:1200) von sTIM-2Fc (exprimiert in HEK293 Zellen) oder sgp130Fc (als Negativkontrolle) inkubiert. Die Detektion von gebundenen Fc-Proteinen erfolgte mit einem POD-anti-hFc Antikörper. Die in Abb. 36B dargestellten Messwerte zeigen, dass durch eine Konzentrationsabnahme von sTIM-2Fc weniger sTIM-2Fc in der Lage war, an das Platten-gekoppelte H-Ferritin zu binden. Bei der Analyse von sg130Fc oder PBS (als Negativkontrollen) wurde erwartungsgemäß keine Bindung an H-Ferritin gemessen. Dementsprechend scheint das generierte lösliche TIM-2Fc Protein spezifisch an rekombinantes H-Ferritin zu binden.

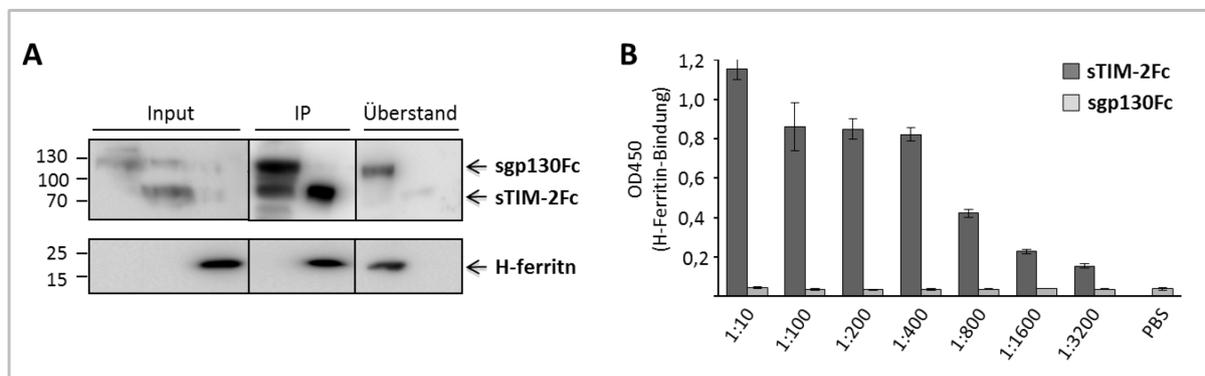


Abb. 36: Bindungsnachweis von sTIM-2Fc mit H-Ferritin via Co-Immunopräzipitation und ELISA. (A) Co-IP. Zellkulturüberstand von sTIM-2Fc oder sgp130Fc (als Negativkontrolle) transient transfizierten HEK293 Zellen wurde mit Protein-G-Sepharose über Nacht bei 4°C inkubiert. Das H-Ferritin Protein (exprimiert in *E.coli*) wurde anschließend co-präzipitiert mit dem sTIM-2Fc-Immunkomplex. Dargestellt ist ein Western Blot der immunpräzipitierten Proteine. Die Nitrocellulose Membran wurde auf der Höhe von 45 kDa zerschnitten, um im oberen Teil sTIM-2Fc bzw. sgp130Fc mittels POD-anti-hFc Antikörper zu detektieren und im unteren Bereich erfolgte der H-Ferritin Nachweis mit dem anti-PC Primärintikörper. **(B)** ELISA (siehe 2.5.3). Die Platte wurde mit je 50 µl H-Ferritin Suspension (10 µg/ml) pro Kavität beschichtet. Nach dem Blocken freier Bindungsstellen wurden 100 µl der jeweiligen Verdünnung von sTIM-2Fc oder sgp130Fc (HEK293 Überstand) zugegeben. Die Detektion der gebundenen Fc-Proteine erfolgte mit einem POD-anti-hFc Antikörper bei 450 nm.

3.8 Bindung von H-Ferritin an ADAM10-gespaltenes lösliches AP-TIM-2

Um zu analysieren, ob das vollständige Transmembranprotein TIM-2 und das prozessierte TIM-2 (nach Ionomycin-Stimulation) an rekombinantes H-Ferritin binden können, wurde ein AP-ELISA (siehe 2.5.4) entwickelt. Hierfür wurde eine H-Ferritin beschichtete Platte mit Zelllysat oder Zellüberstand von AP-TIM-2 cDNS transient transfizierten HEK293 Zellen inkubiert. Die Detektion der Alkalischen Phosphatase-Aktivität wurde dann genutzt, um die Menge an gebundenem Transmembranprotein AP-TIM-2 im Lysat oder gebundenem, löslichen AP-TIM-2 (sAP-TIM-2) im Überstand nach erfolgter Proteolyse zu messen. Wie in Abb. 37 dargestellt ist, konnte das nicht prozessierte Transmembranprotein AP-TIM-2 im Zelllysat an das Platten-gekoppelte H-Ferritin binden, da die gemessenen optischen Dichten (sowohl mit als auch ohne Stimulanzien) über 0,7 lagen. Ferner war zu erkennen, dass nach Ionomycin Zugabe die Menge an gebundenen sAP-TIM-2 im Zellüberstand deutlich anstieg (ca. um das Doppelte) im Vergleich zur Menge an gebundenen konstitutiven sAP-TIM-2. Durch die Zugabe von GI (blockiert ADAM10) oder GW (hemmt ADAM10 und 17) sank die H-Ferritin-Bindungsrate des prozessierten sAP-TIM-2 im Zellüberstand auf unter 0,2 ab. Das Lysat und der Überstand von eGFP transient transfizierten HEK293 Zellen (als Negativkontrollen) zeigten keine Interaktion zu H-Ferritin, denn die Bindungsraten lagen unter 0,1. Diese Ergebnisse belegten, dass nicht nur membranständiges TIM-2 in der Lage ist an H-Ferritin zu binden, sondern auch die lösliche TIM-2 Variante nach Ionomycin stimulierter Prozessierung durch ADAM10.

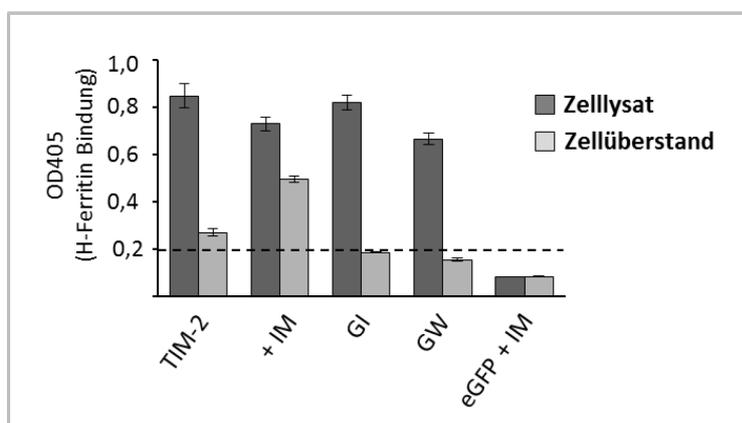


Abb. 37: Interaktion von H-Ferritin mit AP-TIM-2 im Lysat und sAP-TIM-2 im Überstand. HEK293 Zellen wurden mit pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2 transient transfiziert. 48 h nach der Transfektion folgte die Stimulation mit Ionomycin (IM, 2,5 μ M) für 30 min, in An- und Abwesenheit von GI254023X (GI, 3 μ M, hemmt ADAM10) oder GW280264X (GW, 3 μ M, hemmt ADAM10 und ADAM17). Die Inhibitoren wurden 30 min vor der Stimulation zugegeben. Die Detektion von gebundenem Transmembranprotein AP-TIM-2 im Lysat oder löslichem AP-TIM-2 im Überstand erfolgte per AP-ELISA (siehe 2.5.4). Hierfür wurden jeweils 10 μ l Lysat oder 100 μ l Überstand auf eine H-Ferritin (10 μ g/ml, je 50 μ l pro Kavität) beschichtete ELISA Platte gegeben. Die Messung der gebundenen Proteine erfolgte bei 405 nm nach Substratzugabe für die AP.

Zur weiteren Bestätigung, dass H-Ferritin auch an ADAM10-geschnittenes TIM-2 (nach Stimulation mit IM) bindet, wurde ein kompetitiver AP-ELISA (siehe 2.5.5) durchgeführt. Wie in Abb. 38 dargestellt ist, konnte durch die Reduktion der sTIM-2Fc Konzentration mehr sAP-TIM-2 an das Platten-gekoppelte H-Ferritin binden.

Bei der Inkubation mit dem Fc-Kontrollprotein sgp130Fc war keine kompetitive Hemmung der sAP-TIM-2 H-Ferritin Bindung feststellbar, da alle Messwerte bei 0,8 lagen. Die Negativkontrolle ohne sAP-TIM-2 in der Ausgangslösung zeigte erwartungsgemäß keine Bindung an H-Ferritin. Diese Resultate stützen noch einmal die Theorie, dass ADAM10-gespaltenes sTIM-2 an H-Ferritin binden kann.

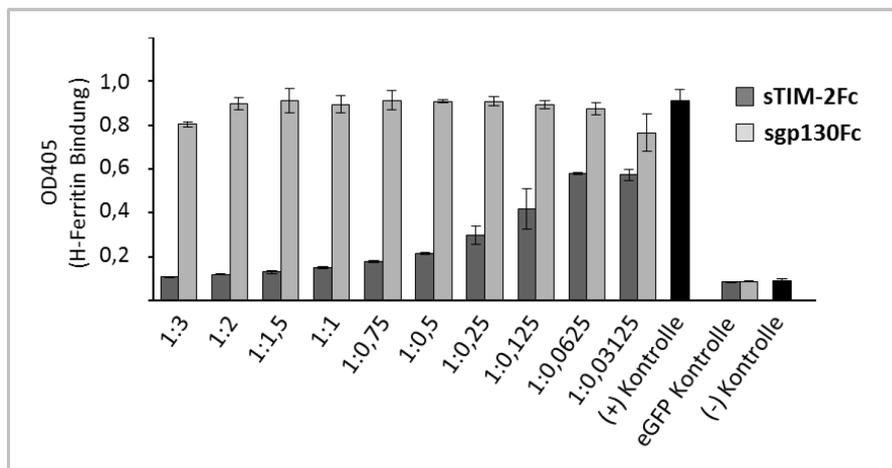


Abb. 38: Interaktion von H-Ferritin mit ADAM10-gespaltenem sAP-TIM-2. Kompetitiver AP-ELISA (siehe 2.5.5). HEK293 Zellen wurden mit pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2 transient transfiziert. 48 h nach der Transfektion folgte die Stimulation mit Ionomycin (IM, 2,5 μ M) für 30 min. 100 μ l Zellkulturüberstand mit sAP-TIM-2 (nach Stimulation mit IM) wurden mit verschiedenen Konzentrationen an sTIM-2Fc oder sgp130Fc (als Negativkontrolle) von transient transfizierten HEK293 Zellen inkubiert. Je 100 μ l der unterschiedlichen Verdünnungslösungen von sAP-TIM-2/sTIM-2Fc oder sAP-TIM-2/sgp130Fc wurden auf eine H-Ferritin beschichtete Platte gegeben und die AP-Aktivität von gebundenem sAP-TIM-2 wurde bei 405 nm nach Substratzugabe gemessen.

3.9 Die Immunglobulindomäne von TIM-2 vermittelt die H-Ferritin Interaktion

Als Nächstes sollte mittels AP-ELISA untersucht werden, ob die TIM-2 Deletionsvarianten an rekombinantes H-Ferritin binden. Hierzu wurde eine H-Ferritin beschichtete Platte mit Zellysate, von AP-TIM-2, AP-TIM-2 Δ IgV, Δ ICD, Δ 1, Δ 2 oder Δ 3 transient transfizierten HEK293 Zellen, inkubiert. Durch die Detektion der Alkalischen Phosphatase-Aktivität konnten dann die gebundenen Proteine nachgewiesen werden.

Wie Abb. 39 zeigt, wurden für AP-TIM-2 sowie den Deletionsmutanten AP-TIM-2 Δ ICD, Δ 1, Δ 2 und Δ 3 (HEK293 Lysate) eine OD₄₀₅ von über 0,7 gemessen. Dementsprechend konnten die Deletionsmutanten AP-TIM-2 Δ ICD, AP-TIM-2 Δ 1, AP-TIM-2 Δ 2 und AP-TIM-2 Δ 3 wie auch AP-TIM-2 an das Platten-gekoppelte H-Ferritin binden. Interessanterweise war jedoch keine Bindung der AP-TIM-2 Δ IgV Mutante an H-Ferritin nachweisbar, da die gemessene optische Dichte genauso wie die Negativkontrolle (Lysat von eGFP transient transfizierten HEK293) unter 0,2 lag. Daraus lässt sich schließen, dass die Immunglobulindomäne von TIM-2 die Bindung an H-Ferritin vermittelt. Zur Expressionskontrolle wurde zusätzlich eine Western Blot-Analyse der untersuchten Deletionsmutanten durchgeführt, die im unteren Teil von Abb. 39 dargestellt ist.

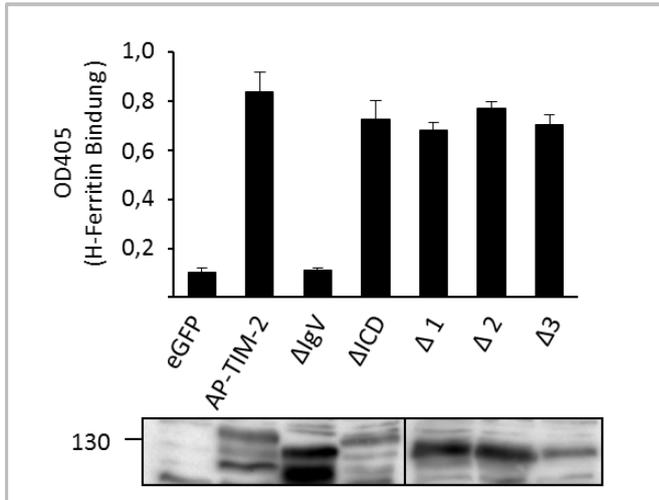


Abb. 39: AP-ELISA zur Bindungsanalyse von H-Ferritin an die AP-TIM-2 Deletionsmutanten. HEK293 Zellen wurden mit cDNS für AP-TIM-2, ΔIgV, ΔICD, Δ1, Δ2, Δ3 und eGFP als Kontrolle transient transfiziert. Die Bindung der Mutanten an H-Ferritin erfolgte per AP-ELISA (siehe 2.5.4). Dazu wurden jeweils 10 μl Lysat auf eine H-Ferritin (10 μg/ml, je 50 μl pro Kavität) beschichtete Platte gegeben. Die Messung der gebundenen Proteine erfolgte bei 405 nm nach der Substratzugabe für die AP. Zum Expressionsnachweis wurde eine Western Blot-Analyse mit dem anti-Flag (M1) Primärantikörper durchgeführt.

4 Diskussion

4.1 TIM-2 ist kein ADAM17 Substrat

Die TIM Proteine gehören zur Gruppe der Typ I Transmembranproteine und spielen bei verschiedenen Entzündungsreaktionen wie beispielsweise Asthma, Rheuma oder Autoimmunerkrankungen eine entscheidende Rolle (Freeman *et al.*, 2010). Das murine TIM-2 wird unter anderem auf ausdifferenzierten Th2 Zellen exprimiert und der TIM-2 Signalweg scheint die Th2-vermittelte Zellantwort negativ zu regulieren (Chakravarti *et al.*, 2005; Rennert *et al.*, 2006).

TIM-1, welches ebenfalls von Th2 Zellen exprimiert wird und homolog zu TIM-2 ist, wird dagegen als positiver Th2 Zellaktivator beschrieben (Umetsu *et al.*, 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass TIM-1 *gesheddet* wird (Ichimura *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2007) und dass die lösliche TIM-1 Variante als Biomarker für Nierenerkrankungen sowie Nierenzellkarzinome im Menschen genutzt wird (Bonventre & Yang, 2010; Cuadros *et al.*, 2013). Neueste Studien beschreiben, dass humanes TIM-1, TIM-3 (Moller-Hackbarth *et al.*, 2013) und TIM-4 (Schweigert *et al.*, 2013) sowohl durch ADAM10 nach Ionomycin-Stimulation als auch durch ADAM17 nach PMA Induktion prozessiert werden. Da bis jetzt eine lösliche TIM-2 Variante noch nicht bekannt war, wurde in der vorliegenden Arbeit das *Shedding* von TIM-2 untersucht.

Für das TIM-2-Homolog, TIM-1, wurde bereits gezeigt, dass ERK am konstitutiven *Shedding* beteiligt ist und dass durch die Aktivierung der p38-MAPK die Spaltung gesteigert werden kann (Zhang *et al.*, 2007). Sowohl ERK als auch die p38-MAPK können nach der Stimulation mit PMA zu einer Aktivierung von ADAM17 führen (Xu & Derynck, 2010). Der Stimulus PMA vermittelt die Rekrutierung der Proteinkinase C (PKC) an die Zellmembran und übernimmt somit die Funktion des natürlichen PKC-Aktivators Diacylglycerol (Kraft & Anderson, 1983). So ist ADAM17 u.a. in der Lage TGF α zu schneiden nach Aktivierung des p38-MAPK-Signalwegs (Xu & Derynck, 2010). Ferner kann ADAM17 auch direkt mit ERK-MAPK interagieren, wodurch es zu einer Phosphorylierung von ADAM17 am Thr⁷³⁵ kommt (Diaz-Rodriguez *et al.*, 1999).

Zur Zeit sind über 70 Substrate für ADAM17 bekannt. Darunter befinden sich sehr wichtige immunregulatorische Cytokine wie TNF α , aber auch Zelladhäsionsmoleküle wie L-Selektin oder ICAM-1, einige Erb-Liganden und -Rezeptoren, und der IL-6R (Scheller *et al.*, 2011a). Für einige *Shedding*-Studien mit dem humanen IL-6-Rezeptor wurden HEK293-Zellen verwendet, die nach PMA-Stimulation den hIL-6R spalten (Lorenzen *et al.*, 2012). Auf diesen Daten basierend wurden für die hier durchgeführten *Shedding*-Analysen ebenfalls HEK293 Zellen verwendet, da davon ausgegangen werden konnte, dass sie ADAM17 exprimieren. Dies konnte anhand der gezeigten Spaltung des ADAM17 Substrates TGF α noch einmal bestätigt werden.

Interessanterweise, wurde TIM-2 (exprimiert in HEK293-Zellen) nicht von der ADAM17-Protease nach PMA-Stimulation prozessiert. Die Expression von TIM-2 konnte jedoch mittels Western Blot erfolgreich nachgewiesen werden. Dabei war TIM-2 meistens als Doppelbande zwischen 55 und 85 kDa detektierbar, vermutlich auf Grund der differentiellen Glykosylierung der Mucindomäne. Per Durchflusszytometrie konnte

die richtige Orientierung des TIM-2 Proteins auf der Zelloberfläche von HEK293 Zellen gezeigt werden. Um eventuelle speziesspezifische Unterschiede der ADAM17-Protease auszuschließen, wurde das *Shedding* von TIM-2 in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) untersucht. Dazu wurden Wildtyp, ADAM10-, ADAM17- oder doppelt (ADAM10 und 17)-defiziente MEFs mit mTIM-2 cDNS transient transfiziert und anschließend mit PMA stimuliert. Aber auch hier war keine lösliche TIM-2 Variante detektierbar. Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass TIM-2 nach der Stimulation mit PMA nicht durch die murine oder humane ADAM17 Protease gespalten wird.

4.2 ADAM10-vermitteltes Ektodomänen-*Shedding* von TIM-2

Neben ADAM17 spielt auch ADAM10 eine wichtige Rolle im Immunsystem (Edwards *et al.*, 2008), denn durch die proteolytische Aktivität von ADAM10 werden viele biologische Funktionen wie beispielsweise die Wundheilung, Herzentwicklung, Zellproliferation oder Apoptose beeinflusst (Reiss & Saftig, 2009). Frühere Studien zeigten, dass nach PMA-Stimulation ADAM17 das membranständige CX3CL1-Chemokin, auch Fraktalkin genannt, spaltet. ADAM10 hingegen vermittelt das konstitutive *Shedding* dieses Fraktalkins (Hundhausen *et al.*, 2003). Besonders interessant war hierbei die Tatsache, dass das Fraktalkin in seinem strukturellen Aufbau den TIM Proteinen sehr ähnlich ist und auch aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne (beim Fraktalkin = Chemokin-ähnlich, bei den TIMs = Immunglobulin-ähnlich), einer hoch glykosylierten Mucinregion, einer Transmembrandomäne sowie einen intrazellulären Teil besteht. Das konstitutive *Shedding* von TIM-2 wurde deshalb mithilfe der bereits beschriebenen MEFs analysiert. Eine Spaltung von TIM-2 in Wildtyp- sowie ADAM17-defizienten MEFs war ohne Stimulation nach 24 Stunden Inkubation nachweisbar, wohingegen TIM-2 nicht von den ADAM10- und doppelt (ADAM10 und 17)-defizienten MEFs freigesetzt wurde. Daraus lässt sich schließen, dass ADAM10 (und nicht ADAM17) für das konstitutive *Shedding* von TIM-2 verantwortlich ist.

Ob diese TIM-2 Prozessierung durch ADAM10 auch induzierbar ist, war eine weitere Fragestellung dieser Arbeit. Zum Beispiel werden die N-Cadherin Proteine ausschließlich nur von ADAM10, sowohl konstitutiv als auch nach Induktion, geschnitten (Maretzky *et al.*, 2005a; Reiss *et al.*, 2005). Dagegen werden viele weitere Substrate wie beispielsweise das Prion-Protein (PrP) (Vincent *et al.*, 2001) oder das Amyloid-Vorläuferprotein APP (Buxbaum *et al.*, 1998) sowohl durch ADAM17 als auch durch ADAM10 gespalten. Ein weiteres Beispiel für die Beteiligung beider ADAM-Proteasen stellt der humane IL-6-Rezeptor dar, dessen Prozessierung zum einen nach PMA-Stimulation (Mullberg *et al.*, 1992; Müllberg *et al.*, 1993) und zum anderen durch die Stimulanzen Ionomycin oder BzATP (Garbers *et al.*, 2011) erfolgt, wobei PMA ADAM17 induziert und Ionomycin sowie BzATP ADAM10 aktivieren (Garbers *et al.*, 2011). Experimente mit proTGF α (pro *tumor growth factor* α) haben gezeigt, dass die intrazellulären Signalwege der PKC und des Calcium-Ionophors A23187 unabhängig voneinander arbeiten (Pandiella & Massague, 1991). Demnach verläuft die ADAM10-Stimulation mit dem

Calcium-Ionophor Ionomycin wahrscheinlich ohne PKC Beteiligung ab, sondern wird durch den Ca^{2+} -Anstieg im Zellinnenraum ausgelöst. Die Aktivierung des purinergen P2X7R durch das ATP-Analogon BzATP führt ebenfalls zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, was wiederum ADAM10 aktiviert. Bekannte Membranproteine, die ebenfalls nach P2X7R-Aktivierung gespalten werden, sind u.a. CD21, CD23 und CD62/L-Selektin. HEK293 Zellen besitzen keinen P2X7R und wurden deshalb co-transfiziert mit TIM-2 und dem humanen P2X7R. Nach erfolgreicher Transfektion wurden die Zellen mit BzATP stimuliert, woraufhin eine lösliche TIM-2 Variante im Überstand der Zellen nachweisbar war. Dies bestätigte die Annahme, dass die Proteolyse von TIM-2 mit BzATP induzierbar ist. Durch die Verwendung der spezifischen Inhibitoren GI, welches ADAM10 blockiert, sowie GW, das ADAM10 und 17 blockiert, wurde die Freisetzung von löslichem TIM-2 gehemmt. Demzufolge scheint ADAM10 die verantwortliche Protease für das P2X7R-vermittelte *Shedding* nach BzATP-Aktivierung zu sein.

Außerdem wurde der Einfluss von Ionomycin hinsichtlich einer TIM-2 Spaltung untersucht. Auch die Stimulation mit dem Calcium-Ionophor führte zu einer rapiden Freisetzung einer löslichen TIM-2 Variante innerhalb von 30 min, die sowohl nach GI- als auch nach GW-Präinkubation nicht mehr nachweisbar war. Somit stellt Ionomycin einen weiteren Stimulus für die ADAM10-vermittelte TIM-2 Prozessierung dar. Der *Shedding*-Nachweis von TIM-2 nach BzATP- oder Ionomycin-Stimulation konnte zum einen durch die Akkumulation des löslichen TIM-2 Proteins im Überstand mittels Western Blot gezeigt werden und zum anderen per AP-Analyse quantifiziert werden.

Da die Selektivität der verwendeten Inhibitoren GI und GW nicht vollständig spezifisch ist (Ludwig *et al.*, 2005), wurde zur Blockade von ADAM10 auch die rekombinante ADAM10 Prodomäne (Moss *et al.*, 2007) verwendet, mit deren Hilfe noch einmal die Beteiligung von ADAM10 am Ionomycin-stimulierten *Shedding* von TIM-2 bestätigt wurde. Um ferner ein artifizielles Verhalten der humanen Zelllinie HEK293 auszuschließen, konnte in den murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) gezeigt werden, dass TIM-2 nach Ionomycin-Stimulation in Wildtyp und ADAM17-defizienten MEFs prozessiert wurde, aber nicht in ADAM10- und doppelt (ADAM10 und 17)-defizienten MEFs. Demzufolge findet die Ionomycin-vermittelte TIM-2-Spaltung speziesübergreifend durch humanes und murines ADAM10 statt. Es wurde auch keine *Shedding*-Kompensation durch ADAM17 in den ADAM10-defizienten MEFs beobachtet, was bereits für einige Substrate in bestimmten Zelllinien beschrieben wurde (Le Gall *et al.*, 2009).

TIM-2 wird *in vivo* nicht nur auf Th2 Zellen sondern auch auf B Zellen exprimiert (Kawamoto *et al.*, 2011). Zum Nachweis der physiologischen Relevanz der *in vitro*-Ergebnisse wurden *Shedding*-Experimente mit primären murinen B Zellen aus der Milz durchgeführt. Die Expression von TIM-2 nach der Aktivierung mit anti-IgM und anti-CD40 monoklonalen Antikörpern sowie die proteolytische Freisetzung des endogenen TIM-2 Rezeptors durch murines ADAM10 nach BzATP- oder Ionomycin-Stimulation konnte anhand einer durchflusszytometrischen Analyse bestätigt werden. Insofern wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass nicht nur das überexprimierte TIM-2, sondern auch das endogene TIM-2 auf isolierten B Zellen von ADAM10 nach der Stimulation mit BzATP oder Ionomycin gespalten wird. Eine Zusammenfassung über die Spaltung von TIM-2 ist in Abb. 40 schematisch dargestellt.

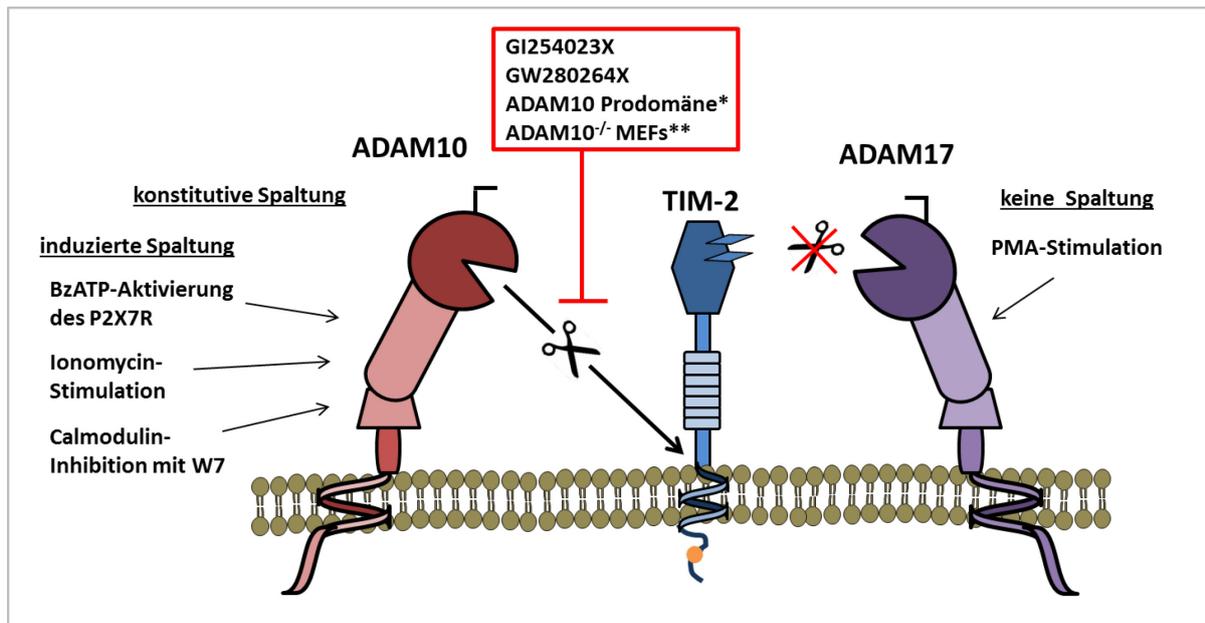


Abb. 40: Schematische Zusammenfassung der *Shedding*-Stimulation von TIM-2. TIM-2 wird sowohl konstitutiv als auch nach der BzATP-Stimulation des P2X7R sowie nach der Ionomycin- oder W7 (N-(6-Aminoheyl)-5-chlor-1-naphthalinsulfonamid)-Stimulation durch ADAM10 gespalten. Die spezifischen Inhibitoren GI254023X und GW280264X hemmen diese ADAM10-vermittelte Spaltung von TIM-2. ADAM17 kann TIM-2 nicht schneiden, auch nicht nach PMA-Stimulation. (*) Die Ionomycin-vermittelte TIM-2 Prozessierung wird durch die ADAM10 Prodomäne inhibiert. (**) In ADAM10-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (ADAM10^{-/-} MEFs) findet kein TIM-2 *Shedding* statt, sowohl unstimuliert als auch nach Ionomycin-Aktivierung.

4.3 Spekulation einer ADAM10-Schnittstelle im membranproximalen Bereich von TIM-2

Nachdem gezeigt werden konnte, dass TIM-2 durch ADAM10 sowohl konstitutiv als auch induzierbar *geshededet* wird, sollte als nächstes die Schnittstelle für ADAM10 im TIM-2 Protein näher eingegrenzt werden. Eine spezifische Konsensussequenz für ADAM10 existiert leider nicht und die Schnittstellen der einzelnen Substrate unterscheiden sich sehr stark (Black *et al.*, 2003; White, 2003). Bekannt ist jedoch, dass die Spaltung meistens im membranproximalen Bereich der Substrate stattfindet (Hooper *et al.*, 1997). Diese Annahme würde auch erklären, weshalb die lösliche TIM-2 Variante im Western Blot fast auf gleicher Höhe wie die Proteinbande des membranständigen TIM-2 Proteins detektiert wurde. Denn die Transmembrandomäne von TIM-2 umfasst zusammen mit den intrazellulären Bereich nur 76 Aminosäuren und diese geringe Differenz von etwa 19 kD kann mithilfe der Western Blot-Technik nicht genau aufgelöst werden.

Es wurden drei TIM-2-Mutanten (AP-TIM-2_Δ1, Δ2, Δ3) mit je einer 10 Aminosäuren langen Deletion in der Mucinregion, N-terminal der Transmembrandomäne, generiert. Die *Shedding*-Analyse dieser Deletionsmutanten ergab, dass AP-TIM-2_Δ2 und Δ3 nach Stimulation mit BzATP- und Ionomycin von ADAM10 geschnitten werden. Interessanterweise wurde die AP-TIM-2_Δ1-Mutante, die direkt an die Transmembrandomäne angrenzt, nicht prozessiert. Dementsprechend wird das ADAM10-Spaltmotiv von TIM-2 innerhalb der

Position Prolin²²¹ und Lysin²³⁰ vermutet. Die nicht-spaltbare AP-TIM-2_Δ1 Mutante belegt außerdem die Hypothese, dass ADAM10 im membranproximalen Bereich des Proteins schneidet. Wahrscheinlich ist die sterische Beschaffenheit im juxtamembranen Abschnitt der Substrate verantwortlich für die Zugänglichkeit und Spaltung durch Proteasen. So beginnt im extrazellulären Bereich des TIM-2 Proteins kurz oberhalb der Transmembrandomäne die stark glykosylierte Mucinregion, die vermutlich keinen direkten Angriffspunkt für die Metalloproteinase ADAM10 bietet.

Um innerhalb der deletierten Δ1-Region nach potentiellen ADAM10 Spaltungsmotiven zu suchen, wurde in der sogenannten MEROPS-Datenbank recherchiert. In Abb. 41 ist die MEROPS-Tabelle für ADAM10-Schnittstellen dargestellt. Dabei geben die Zahlenwerte die bis jetzt ermittelte Häufigkeit bzw. Spezifikation der einzelnen Aminosäuren an der jeweiligen Position in der Schnittstelle an. Die anhand dieser Tabelle berechnete Schnittstelle mit der größten Häufigkeit lautet: Ser-Ala-Gln-Ala-Val-Val-Ser-Gln (siehe Abb. 41 A, in rot unterhalb der Tabelle aufgeführt). Innerhalb der deletierten Δ1-Sequenz fallen zwei potentielle Schnittstellen mit hoher Spezifikation auf (siehe Abb. 41, S1 lilanes und S2 oranges Dreieck). Bei diesen beiden Spaltmotiven würde der Schnitt jeweils zwischen Prolin und Glutamin erfolgen. Da bei den durchgeführten *Shedding*-Experimenten auffällig war, dass die AP-TIM-2_Δ2-Mutante etwas weniger prozessiert wurde als der Wildtyp und die AP-TIM-2_Δ3-Mutante, könnte die vermutete Schnittstelle nahe der Δ2-Sequenz liegen. Dementsprechend würde die potentielle Spaltungsstelle S1 (lila) zwischen der Position Val²¹⁸ und Gln²²⁵ in Frage kommen, weil der Erkennungsbereich für diese Schnittstelle in die Δ2-Region hinein ragt. Die Deletion Δ2 verringerte vermutlich die Erkennung der „unvollständigen“ Schnittstelle durch ADAM10.

Um die ADAM10-Schnittstelle im TIM-2 Protein genau zu identifizieren, wurde die lösliche AP-TIM-2 Variante aus dem Überstand von Ionomycin-stimulierten HEK293 Zellen immunopräzipitiert und per Massenspektroskopie analysiert, die leider kein Ergebnis lieferte (nicht gezeigte Daten). Zur weiteren Untersuchung der Schnittstelle müsste die Massenspektroskopie wiederholt werden oder weitere Analysen mittels Proteinsequenzierungstechniken erfolgen.

Wie auch die MEROPS-Tabelle widerspiegelt, besitzt ADAM10 keine ausgesprochene Sequenzspezifität. Daher stellte sich die Frage, wie ADAM10 sein Substrat erkennt (Selektivität) und ob sich eventuell die Schnitt- von der Erkennungsstelle unterscheidet. Außerdem scheint nicht die Primärsequenz sondern viel mehr die sekundäre Struktur des extrazellulären Bereichs sowie die Zugänglichkeit einzelner Domänen von ausschlaggebender Bedeutung für die Substraterkennung und Ektodomänen-Spaltung zu sein (Seals & Courtneidge, 2003). Gestützt wird diese Hypothese durch Studien mit Antikörpern, die das *Shedding* von CD30 und HB-EGF inhibieren können. Dabei wurde das Bindungsepitop dieser Antikörper weit entfernt von der eigentlichen Schnittstelle gefunden und demnach ist die extrazelluläre Region entscheidend für die Substraterkennung durch die ADAM-Proteasen (Hansen *et al.*, 2004; Hamaoka *et al.*, 2010). Deshalb wurde eine TIM-2-Mutante generiert, die keine N-terminale Immunglobulindomäne besitzt (AP-TIM-2_ΔIgV), um deren Einfluss auf das ADAM10-vermittelte *Shedding* zu untersuchen. Auf Grund der Resultate, dass nach BzATP- und Ionomycin-Stimulation die AP-TIM-2_ΔIgV Mutante gleichermaßen von ADAM10 wie das

Wildtyp-TIM-2 Protein gespalten wurde, scheint die Immunglobulindomäne nicht für die TIM-2 Erkennung oder Prozessierung durch ADAM10 entscheidend zu sein.

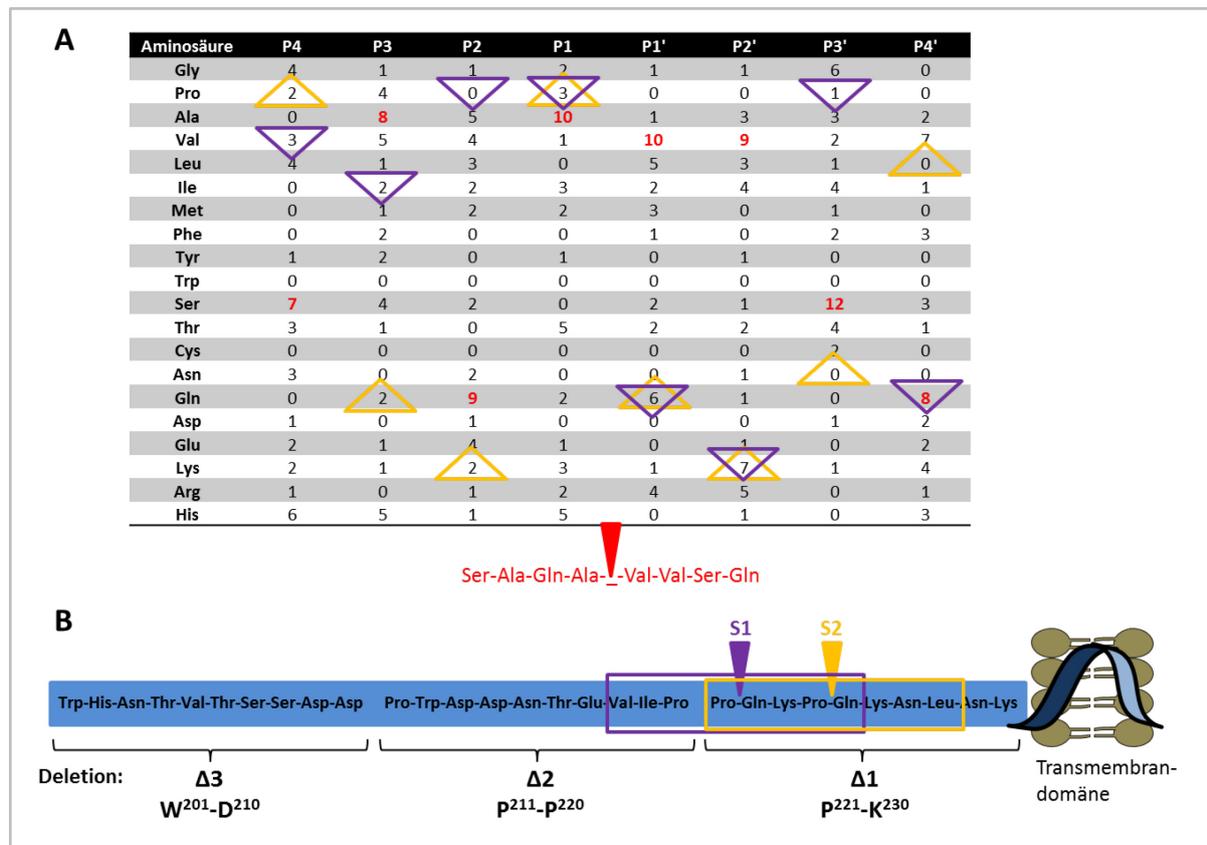


Abb. 41: Spekulation von potentiellen Schnittstellen für ADAM10 im membranproximalen Bereich von TIM-2 mithilfe der MEROPS-Datenbank. (A) Siehe unter <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/pepsum?id=M12.210;type=P>. In der Tabelle sind links alle Aminosäuren und oben die Position innerhalb der ADAM10-Schnittstelle aufgeführt. Die Protease schneidet zwischen P1 und P1'. Die Zahlenwerte geben an, wie häufig die jeweilige Aminosäure an den einzelnen Positionen der Substratschnittstellen identifiziert wurde. Unter der Tabelle ist in rot die potentielle ADAM10-Schnittstelle aufgeführt, mit der bis jetzt am höchsten ermittelten Spezifität. **(B)** Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der drei TIM-2 Deletionsmutanten mit potentiellen ADAM10-Schnittstellen, die anhand der oben aufgeführten MEROPS-Tabelle ermittelt wurden. Mögliche Schnittstellen (S1, S2) in der TIM-2 Sequenz sind mit ausgefüllten Dreiecken markiert, welche die gleiche Farbe haben, wie ihre dazugehörige Spezifität in der Tabelle unter A.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Intrazelluläre Domäne für das *Shedding* von TIM-2 eine Rolle spielt. Betrachtet man beispielsweise L-Selektin, wurde bereits beschrieben, dass die intrazelluläre Domäne von L-Selektin wichtig für das ADAM-vermittelte *Shedding* ist (Ivetic et al., 2004). Dahingegen wurde der intrazelluläre Teil des hIL-6R nicht für das PMA-induzierte *Shedding* durch ADAM17 benötigt (Müllberg et al., 1994). Die hier durchgeführten Experimente mit der TIM-2-Mutante ohne intrazelluläre Domäne (AP-TIM-2_ΔICD) deuteten keine Beteiligung der intrazellulären Domäne am *Shedding* von TIM-2 weder nach PMA-Stimulation von ADAM17 noch nach ADAM10-Aktivierung durch BzATP oder Ionomycin an.

4.4 Calmodulin-reguliertes TIM-2-Shedding

Das ADAM10-vermittelte *Shedding* von TIM-2 wird vermutlich durch den Calciumeinstrom in den Zellinnenraum induziert. Ein wichtiger intrazellulärer Mediator von verschiedenen Ca^{2+} -abhängigen Vorgängen ist Calmodulin (CaM) (James *et al.*, 1995; Rhoads & Friedberg, 1997). CaM spielt bei der Regulation des *Sheddings* ebenfalls eine wichtige Rolle. Kahn *et al.* fanden heraus, dass Calmodulin mit der Endodomäne von L-Selektin interagiert und somit die Spaltung von L-Selektin hemmt. Calmodulin-Inhibitoren (W7) können diese CaM-Substratinteraktion blockieren. W7-behandelte Zellen zeigten eine stärkere Spaltung von L-Selektin durch ADAM17 (Kahn *et al.*, 1998). Calmodulin ist auch wichtig für die Kontrolle des *Sheddings* von Semaphorin4D durch ADAM17 (Mou *et al.*, 2013) sowie für die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins APP (Canobbio *et al.*, 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Inhibition von Calmodulin durch W7 die ADAM10-abhängige Spaltung von TIM-2 aktiviert wurde, ohne die Beteiligung anderer Stimulanzen. Demnach könnte Calmodulin ein eher genereller *Shedding*-Regulator sein. Die Wirkung der Hydroxamat-basierten Metalloproteasen-Inhibitoren war bei dieser W7-vermittelten *Shedding*-Regulation nicht beeinträchtigt, denn nach der Verwendung von GI oder GW wurde die Spaltung von TIM-2 verhindert. Daraus lässt sich schließen, dass ADAM10 die verantwortliche Protease für die Prozessierung von TIM-2 nach der CaM-Inhibition durch W7 ist.

Gardiner *et al.* zeigten, dass das Glykoprotein (GP) VI (aus der Familie der Immunglobulin-Immunezeptoren) nach der Stimulation mit W7 nicht durch ADAM17 sondern durch ADAM10 prozessiert wird. Dabei ist das Blutplättchenprotein GPVI ähnlich aufgebaut wie das TIM-2 Protein. Es besteht aus zwei extrazellulären Immunglobulinomänen, einer Mucin-ähnlichen Domäne, einer Transmembrandomäne, und einer zytoplasmatischen Region (Clemetson *et al.*, 1999). Anhand von *Shedding*-Analysen mit GPVI-basierten synthetischen Peptiden wurde die ADAM10-Schnittstelle im membranproximalen Bereich des GPVI Rezeptors zwischen Arg²⁴² und Gln²⁴³ identifiziert (Gardiner *et al.*, 2007; Bender *et al.*, 2010). Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die ADAM10-Schnittstelle im membranproximalen Bereich von TIM-2 zwischen Pro²²¹ und Gln²²² vermutet, da die Deletionsmutante AP-TIM-2_Δ1 nach Stimulation mit W7 (BzATP, IM) nicht durch ADAM10 prozessiert wurde.

Außerdem wurde die Interaktion zwischen Calmodulin und TIM-2 überprüft, weil für L-Selektin und Semaphorin4D bereits spekuliert wurde, dass nach der CaM-Bindung an die Endodomäne der Proteine sich die Konformation des extrazellulären Bereichs so verändert, dass die Protease nicht mehr in der Lage ist, ihr Substrat zu erkennen bzw. die Schnittstelle verdeckt wird (Gifford *et al.*, 2012; Mou *et al.*, 2013). Wie hier anhand von Immunpräzipitationsanalysen mit CaM-gekoppelter Sepharose gezeigt wurde, interagiert CaM mit TIM-2. Überraschenderweise war auch eine CaM-Interaktion mit der TIM-2-Mutante ohne intrazellulären Abschnitt (AP-TIM-2_ΔICD) detektierbar. Da aber bereits für L-Selektin beschrieben wurde, dass CaM mit der Transmembranregion interagieren kann (Gifford *et al.*, 2012), wurde innerhalb der TIM-2-Sequenz nach potentiellen CaM-Bindungsstellen gesucht. Wie in Abb. 42 dargestellt ist, ragt das berechnete putative

CaM-Bindungsmotiv etwas in den transmembranen Bereich von TIM-2, was ein Indiz für die CaM-Bindung an die Transmembrandomäne ist. Ferner existiert innerhalb der Transmembrandomäne ein zweites potentielles CaM-Bindungsmotiv mit einer sehr niedrigen Bindungserwartung (Score von 2).

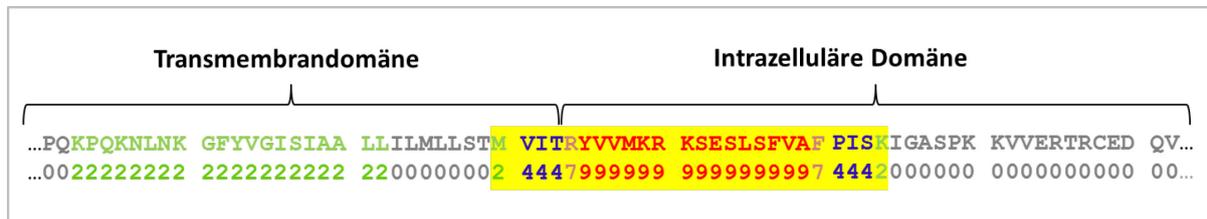


Abb. 42 Potentielle CaM-Bindungsstellen im transmembranen-intrazellulären Bereich von TIM-2. Dargestellt ist ein Ausschnitt der Aminosäuresequenz der Transmembran- und intrazellulären Domäne von TIM-2 sowie die putative Calmodulin (CaM)-Bindungsstelle (gelb hinterlegt). Eine zweite potentielle Bindungsregion für CaM mit einer niedrigen Bindungserwartung von 2 (grün) liegt in der Transmembrandomäne. Das spekulierte CaM-Bindungsmotiv wurde unter Berücksichtigung bestimmter Kriterien mit einer Datenbank im Internet (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/sequence.html>) berechnet. Die Zahlen 0-9 geben an, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass CaM an die jeweilige Position im TIM-2 Protein binden kann. Dabei entspricht 0 keine und 9 die höchste Bindungserwartung.

Die Gruppe von Diaz-Rodriguez postulierte, dass eine Rezeptor-Tyrosinkinase (TrkA)-Mutante, ohne zytosolische Region, nach Stimulation mit dem CaM-Inhibitor TFP gespalten wird. Überdies vertreten sie die Ansicht, dass die durch Calmodulin-Inhibitoren induzierte Spaltung von Transmembranproteinen nicht durch den extrazellulären Influx von Ca^{2+} -Ionen ausgelöst wird (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2000). Für L-Selektin hingegen wurde bereits eine intrazelluläre Ca^{2+} -Abhängigkeit bei der CaM-vermittelten Spaltung beschrieben (Gifford *et al.*, 2012). Auf Grund einer möglichen Rolle von Calcium bei der regulierten Substratfreisetzung durch CaM-Inhibitoren, müssen noch weitere Experimente durchgeführt werden, um den Einfluss von CaM beim W7-stimulierten TIM-2-*Shedding* besser verstehen zu können.

4.5 Physiologische Relevanz des TIM-2-*Sheddings*

Die biologischen Folgen der hier erstmals beschriebenen ADAM10-vermittelten Ektodomänen-Spaltung von TIM-2 sind noch größtenteils unklar. Bei diesem Mechanismus wird TIM-2 von der Zelloberfläche abgeschnitten und liegt als lösliche Form vor, was entscheidende Konsequenzen haben kann. Kawamoto *et al.* zeigten, dass durch die Antikörper-vermittelte Blockade von TIM-2 der Verlauf einer Collagen-induzierten Arthritis (CIA) in der Maus verschlechtert wird. Dabei aktivierten vermutlich TIM-2-Signale die B Zellproliferation und die Antikörperproduktion während der frühen Phase der CIA, aber beeinträchtigten nicht die Induktion der Th1 oder Th17 Zellen. Außerdem deuteten *in vitro* Experimente an, dass H-Ferritin, der natürliche Ligand von TIM-2, die Proliferation von TIM-2-exprimierenden B Zellen verstärkt (Kawamoto *et al.*, 2011). Induziertes *Shedding* von TIM-2 auf der Oberfläche von B Zellen könnte die Interaktion von TIM-2 mit seinem Liganden

H-Ferritin verhindern. Dementsprechend würde es zu keiner Signalinduktion kommen und zur Reduktion der B Zellproliferation sowie zur verminderten Antikörperproduktion, wodurch der Verlauf der CIA positiv beeinträchtigt werden könnte.

Einige Studien deuten an, dass TIM-2 wahrscheinlich inhibitorische Funktionen in der Th2-abhängigen Immunantwort hat. Die Injektion von löslichem TIM-2Fc in die Maus während der Induktionsphase führte zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufs der *experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis* (EAE). EAE ist eine Th1-vermittelte Autoimmunkrankheit, die im Menschen der Multiplen Sklerose Erkrankung ähnlich ist. Das lösliche TIM-2Fc scheint die Hyperproliferation von Th2 Zellen und die Th2-Cytokinproduktion *in vivo* zu aktivieren, wodurch die EAE gelindert wurde (Chakravarti *et al.*, 2005). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, wird TIM-2 im juxtamembranen Bereich durch ADAM10 gespalten und enthält wie das in der Studie verwendete lösliche TIM-2Fc die Immunglobulin- und Mucindomäne. Daher könnte das *Shedding* von TIM-2 auch zu einer Aktivierung von Th2 Zellen und Verbesserung der EAE führen.

Eine weitere Studie zeigte, dass lösliches TIM-2Fc zu einer Verschlimmerung der Lungenentzündung im Ovalbumin-induzierten Asthma-Modell führt. Die Entwicklung von Asthma und anderen atopischen Krankheiten wird durch Th2 Zellen und deren Cytokinproduktin vermittelt. TIM-2-defiziente Mäuse zeigten ebenfalls einen negativen Verlauf der Lungenentzündung in diesem Asthmodell. (Rennert *et al.*, 2006). Diese Daten deuten an, dass TIM-2 ein Schlüsselkontrollpunkt für die Effektor-T-Zellaktivität darstellt und möglicherweise als negativer Th2-Regulator wirkt. *Shedding* von TIM-2 auf der Oberfläche von Th2 Zellen könnte deshalb auch den Verlauf der Lungenentzündung negativ beeinträchtigen. Andererseits könnte durch die Spaltung von TIM-2 auf Th2 Zellen eine intrazelluläre Signalkaskade angeschaltet werden, die wiederum eine verstärkte Inhibition der Th2 Zellproliferation auslöst und damit die Lungenentzündung positiv beeinträchtigen würde.

Außerdem ist für einige Proteine bekannt, dass ihre löslichen Varianten nach der Prozessierung vollkommen neue Funktionen aufweisen. So ist für TNF α (*tumor nekrosis factor α*) beschrieben, dass membranständiges TNF α anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt wohingegen das lösliche TNF α nach der Spaltung durch ADAM17 eines der stärksten proinflammatorischen Cytokine ist (Alexopoulou *et al.*, 2006). Auch die Aufgaben des membranständigen IL-6R unterscheiden sich stark vom löslichen Rezeptor, der Zellen für IL-6 empfänglich macht, die von sich aus nicht auf dieses Cytokin reagieren können (Scheller *et al.*, 2011b).

In diesem Zusammenhang ist es äußerst interessant, dass nicht nur das lösliche TIM-2Fc Protein an H-Ferritin binden konnte, sondern auch die durch ADAM10 prozessierte TIM-2 Variante nach Ionomycin-Stimulation. Demzufolge ist einerseits weniger TIM-2 auf der Zelloberfläche, das mit H-Ferritin interagieren kann und andererseits kann durch die prozessierte TIM-2 Variante die Bindung von H-Ferritin an das membranständige TIM-2 auf Zellen verhindert werden, sodass es wahrscheinlich bei einer hohen *Shedding*-Rate zu Veränderungen in der Eisenhomöostase kommt, da TIM-2 in den H-Ferritin-vermittelten Eisentransport involviert ist. Beispielsweise zeigten Han *et al.*, dass der Eisentransport über die H-Ferritin Bindung an TIM-2 auf Nierenzellen sowie B Zellen erfolgt (Han *et al.*, 2011). Endogenes TIM-2 wird von der Oberfläche auf

B Zellen durch ADAM10 prozessiert. Dies könnte den Transport von Eisen hemmen, sodass dadurch die Entwicklung oder Aktivierung der B Zellen beeinträchtigt wird. Ähnliche Auswirkungen könnten auch für die Nierenzellen vermutet werden.

Ein weiteres wichtiges Beispiel für den Einfluss des TIM-2 *Sheddings* bei der Eisenhomöostasis ist der H-Ferritin-abhängige Eisentransport in Oligodendrozyten, der über die Interaktion an TIM-2 vermittelt wird. Oligodendrozyten exprimieren keinen Transferrin-Rezeptor und können somit nicht über Transferrin Eisen aufnehmen. Dennoch enthalten Oligodendrozyten mehr Eisen als andere Zellen im zentralen Nervensystem, da sie Eisen für die Produktion von Myelin benötigen (Todorich *et al.*, 2008). Dementsprechend könnte die Spaltung von TIM-2 auf Oligodendrozyten dazu führen, dass kein Eisen in die Zellen transportiert wird und die Myelinisierung beeinträchtigt wird, was wiederum entscheidende Auswirkungen im zentralen Nervensystem haben könnte.

Ferner ist H-Ferritin nicht nur für den Eisentransport verantwortlich, sondern ist vielmehr ein multifunktionales Protein, welches proinflammatorisch (Ruddell *et al.*, 2009) wirken kann aber auch die Proliferation von B Zellen (Kawamoto *et al.*, 2011) sowie die Tumorentwicklung (Alkhateeb & Connor, 2013) beeinträchtigen kann. Studien zeigten, dass Ferritin-reiche Makrophagen die Entwicklung von Brustkrebs durch die Produktion und Sekretion von Ferritin beeinflussen. Ferritin konnte dabei als Antioxidanz wirken und die Reaktion von Chemotherapeutika, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) für eine Aktivierung benötigen, hemmen (Alkhateeb & Connor, 2013; Alkhateeb *et al.*, 2013). In Hinblick auf diese Daten und die Tatsache, dass H-Ferritin die Eisenoxidation innerhalb des Ferritin Proteinkomplexes vermittelt, ist die Balance zwischen membranständigen und löslichen TIM-2 von großer Bedeutung. Zusammenfassend deuten die Daten zur proteolytischen Freisetzung von TIM-2 auf eine sehr komplexe und wichtige Rolle dieses Proteins im Immunsystem hin.

4.6 Ausblicke

Die vorliegende Arbeit beschreibt, dass TIM-2 sowohl konstitutiv als auch nach Stimulation mit BzATP und Ionomycin durch ADAM10 *geshededet* wird. Dies ist somit ein weiteres Gegenbeispiel für die oft publizierte *Shedding*-Einteilung in konstitutive ADAM10-vermittelte und induzierte ADAM17-vermittelte Prozessierung. Ob noch andere Proteasen am TIM-2-*Shedding* beteiligt sind, müsste in der Zukunft noch näher untersucht werden. Da hier jedoch nach Calmodulin-Inhibition mithilfe von W7 auch ADAM10 als TIM-2-spaltene Protease identifiziert wurde, scheint TIM-2 hauptsächlich von ADAM10 prozessiert zu werden.

Die Untersuchungen zum CaM-vermittelten W7-induzierten *Shedding* befinden sich erst am Anfang. Dabei scheint Calmodulin an den transmembranen-intrazellulären Bereich von TIM-2 zu binden. Inwiefern diese Bindung wirklich das *Shedding* durch ADAM10 verhindert, muss in weiteren Experimenten verifiziert werden.

Ferner ist es nötig, die Beteiligung von Calcium bei der CaM-TIM-2-Bindung sowie beim TIM-2-*Shedding*-Mechanismus zu analysieren, da für L-Selektin bereits gezeigt wurde, dass eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration aus intrazellulären Speichern zur CaM-Dissoziation vom Substrat führt und folglich die Spaltung von L-Selektin resultiert.

Die durchgeführten *Shedding*-Experimente mit den drei generierten TIM-2 Deletionsmutanten (AP-TIM-2_Δ1, Δ2, Δ3) zur Lokalisierung einer potentiellen ADAM10-Spaltstelle im membranproximalen Bereich von TIM-2, brachten den Hinweis, dass die ADAM10-Schnittstelle innerhalb der Region zwischen Prolin²²¹ und Lysin²³⁰ liegen müsste, da die erzeugte AP-TIM-2_Δ1-Mutante nach Stimulation mit BzATP oder Ionomycin nicht gespalten wurde. Mithilfe dieser *Shedding*-resistenten Variante AP-TIM-2_Δ1 könnte eine nicht-spaltbare TIM-2 *knock-in* Maus erzeugt werden, um die Relevanz der TIM-2-Spaltung *in vivo* zu untersuchen.

Eine erste Massenspektroskopie vom präzipitierten, löslichen AP-TIM-2 Konstrukt lieferte keine genauen Daten (nicht gezeigte Daten). Deshalb sollte diese Analyse als nächstes wiederholt werden, um die genaue ADAM10-Schnittstelle zu identifizieren. Falls erneut keine eindeutigen Ergebnisse zustande kommen, müsste eventuell das viel kleinere, vermutlich nicht-glykosylierte C-terminale TIM-2-Fragment für die Spektroskopie verwendet werden oder andere Proteinsequenzierungsmethoden in Betracht gezogen werden.

Die intrazelluläre Domäne (ICD) vom Substrat oder der Protease kann auch eine entscheidende Rolle beim Ektodomänen-*Shedding* spielen. Im Fall von TIM-2, konnte hier allerdings gezeigt werden, dass die ICD des Proteins keinen Einfluss auf die Spaltung durch ADAM10 hat. Allerdings enthält die intrazelluläre Sequenz von TIM-2 ein Phosphorylierungsmotiv für die PI3-Kinase (YXXM) (Chen *et al.*, 2005) und TIM-2 kann nach T Zellaktivierung phosphoryliert werden (Kumanogoh *et al.*, 2002). Der genaue Aktivierungsprozess, z.B. durch TIM-2-Dimerisierung, ist allerdings noch unklar und müsste in weiteren Arbeiten erforscht werden. Außerdem sollte die Signaltransduktion nach dem *Shedding*-Ereignis näher betrachtet werden. Ferner wurde hier auch noch nicht untersucht, ob die ADAM10-Spaltung eine weitere intramembrane Proteolyse (RIPping) auslöst, sodass ein lösliches C-terminales TIM-2-Fragment entsteht, welches ins Zellinnere oder sogar in den Zellkern transloziert wird.

Nicht nur der intrazelluläre Teil von TIM-2 nach der Spaltung kann große Bedeutung und Auswirkungen haben, sondern auch der extrazelluläre Abschnitt. So wurde in dieser Arbeit erstmalig die Interaktion des prozessierten, löslichen TIM-2 mit H-Ferritin nachgewiesen. Ob die Bindung von H-Ferritin an ungeschnittenes TIM-2 einen Einfluss auf das *Shedding* von TIM-2 hat, müsste in weiteren Studien analysiert werden. Es besteht noch viel Forschungsbedarf, um wirklich verstehen zu können, welche Rolle das *gesheddete* TIM-2 im Immunsystem z.B. bei der H-Ferritin-regulierten Eisenhomöostasis hat. Sehr interessant ist allerdings das hier gezeigte Resultat, dass endogenes TIM-2 auf der Oberfläche von aktivierten B Zellen durch ADAM10 geschnitten wird. Dies stellt eine entscheidende Grundlage für weitere *ex vivo* und *in vivo* *Shedding*-Experimente in der Maus dar. Es wäre beispielsweise denkbar, die Spaltung von TIM-2 in einer konditionellen ADAM10-*knock-out* Maus näher zu untersuchen. Ferner sollte ein TIM-2-ELISA etabliert werden, um auch die Serumkonzentration von löslichem TIM-2 unter normalen und pathophysiologischen Zuständen messen zu

können. Außerdem stellt sich die Frage, unter welchen Umständen wird *in vivo* mehr TIM-2 und ADAM10 produziert und ob es Gemeinsamkeiten in der Expressionsinduktion von Substrat und Protease gibt. Dies könnte ein weiterer Ansatzpunkt für *in vivo* Studien sein.

5 Zusammenfassung

Die genomischen Regionen der TIM (T Zell Immunglobulin- und Mucindomänen) Proteine stehen in Verbindung mit zahlreichen Krankheiten, einschließlich allergischen Reaktionen, Transplantationstoleranz, Autoimmunreaktionen und Krebs (Freeman *et al.*, 2010). Es existieren acht murine TIM-Gene (mTIM-1 - mTIM-8), sowie drei humane (hTIM1, hTIM-3, hTIM-4). Das murine TIM-2 Protein hat kein Ortholog im Menschen, weist aber eine große Sequenzhomologie mit mTIM-1 auf, welches nach erfolgter Proteolyse auch als lösliche Variante beschrieben wurde. Zahlreiche Transmembranproteine werden von der Zelloberfläche durch Proteasen abgespalten, wodurch lösliche Ektodomänen entstehen, die es ermöglichen, immunologische Prozesse einzuleiten, die Stärke der Immunantwort zu regulieren und diese auch zu beenden. TIM-2 ist, wie alle TIM Rezeptoren, ein Typ I Transmembranprotein und wird hauptsächlich auf differenzierten Th (T-Helfer)2 Zellen sowie aktivierten B Zellen exprimiert. Der Aufbau der TIM Proteine ist ähnlich strukturiert wie der, des membranständigen CX3CL1 Chemokins (Fraktalkin), von dem bereits bekannt ist, dass es durch ADAM10 und ADAM17 prozessiert wird. Darauf aufbauend wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob das murine TIM-2 Protein ein Substrat von ADAM10 oder 17 ist. Für die Aktivierung von ADAM17 wurde der Phorbol-ester PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) als Stimulus verwendet und zur ADAM10-Induktion das Ionophor Ionomycin sowie BzATP (2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat). Mit Hilfe von spezifischen ADAM10/17-Inhibitoren und der ADAM10 Prodomäne konnte ADAM10, aber nicht ADAM17, als Hauptprotease für TIM-2 identifiziert werden. Weitere Experimente zum *Shedding* von TIM-2 in Wildtyp-, ADAM10-, 17- oder doppelt (ADAM10 und 17)-defizienten MEFs (murinen embryonalen Fibroblasten) bestätigten, dass TIM-2 durch ADAM10 gespalten wird. Interessanterweise führte eine Deletion im extrazellulären Bereich von TIM-2 nahe der Transmembrandomäne zu einer stark verminderten TIM-2-Spaltung nach BzATP- oder Ionomycin-Stimulation. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die ADAM10-Schnittstelle im TIM-2 Protein innerhalb der Region zwischen Prolin²²¹ und Lysin²³⁰ liegt oder, dass dieser Bereich essentiell für die Substraterkennung durch ADAM10 ist. Weitere Untersuchungen mit TIM-2 Mutanten ohne die Immunglobulindomäne oder der intrazellulären Region zeigten keinen Einfluss auf das TIM-2 *Shedding*. Studien an L-Selektin, APP (Amyloid Precursor Protein) oder Semaphorin4D deuten an, dass das Calcium-bindende Protein Calmodulin (CaM) ein negativer *Shedding*-Regulator ist. Dieses konnte auch hier für das Substrat TIM-2 gezeigt werden, da die Interaktion von TIM-2 mit Calmodulin das *Shedding* von TIM-2 negativ beeinflusst. CaM interagiert vermutlich mit dem transmembranen-intrazellulären Bereich von TIM-2 und verhindert somit die Prozessierung durch ADAM10. Schließlich konnte die BzATP- und Ionomycin-vermittelte Spaltung von endogenem TIM-2 auf primären murinen B Zellen nach der Aktivierung mit anti-IgM und anti-CD40 monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden. Außerdem war H-Ferritin, der natürliche Ligand von TIM-2, nicht nur in der Lage an das membranständige TIM-2 zu binden, sondern auch an die natürlich, lösliche TIM-2 Variante. H-Ferritin vermittelt den Eisentransport im Organismus und kann die Proliferation von B Zellen steigern. Ob dementsprechend das hier erstmalig beschriebene ADAM10-abhängige *Shedding* von TIM-2 in der B Zellbiologie oder bei der Regulation der Eisenhomöostasis eine Rolle spielt, müsste in weiteren Studien untersucht werden.

6 Summary

TIM (T cell immunoglobulin and mucin domain) genomic regions are linked to multiple disease states including allergy, asthma, transplant tolerance, autoimmunity and cancer (Freeman *et al.*, 2010). There are eight TIM genes in mice (mTIM-1 - mTIM-8), and three in humans (hTIM-1, hTIM-3, hTIM-4). The murine TIM-2 protein has no ortholog in humans but is highly homologous to the murine TIM-1, which is known to be proteolytically cleaved. Many transmembrane proteins are cleaved from the cell surface by proteases, resulting in the generation of soluble ectodomains, which can regulate different immune processes. TIM-2 is a type I transmembrane glycoprotein and is expressed on late differentiated Th (T helper)2 cells or activated B cells. The structure of the TIM proteins resembles that of fractalkine, which is a membrane bound CX3CL1 chemokine and is cleaved by ADAM10 and ADAM17. Here, ectodomain-shedding of TIM-2 by ADAM10 or 17 was analyzed. The phorbol-ester PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) was used for the activation of ADAM17 and the ionophor ionomycin or BzATP (2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosin-5'-Triphosphat) were used to induce ADAM10. With the help of ADAM10/17-specific inhibitors and the ADAM10 prodomain, ADAM10 but not ADAM17 was identified as major sheddase of TIM-2. Further shedding experiments with ADAM10-, ADAM17- or double (ADAM10 and 17)-deficient MEFs (murine embryonic fibroblasts) confirmed the cleavage of TIM-2 by ADAM10. Interestingly, ionomycin- or BzATP-induced shedding of TIM-2 was abrogated by deletion of 10 juxtamembrane amino acids from the stalk region but not by deletion of two further N-terminally located blocks of 10 amino acids, indicating a membrane proximal cleavage site within the region between proline²²¹ and lysine²³⁰. TIM-2 lacking the immunoglobulin domain or the intracellular tail was cleaved after ionomycin- or BzATP-treatment, indicating that these domains were not involved in the regulation of ectodomain shedding. Studies with L-selectin, APP (Amyloid Precursor Protein) or semaphorin4D defined the basic calcium-binding protein calmodulin (CaM) as a negative shedding-regulator of these substrates. In this study, the same was shown for TIM-2, because TIM-2 cleavage by ADAM10 was enhanced after stimulation with the CaM-inhibitor W7 (N-(6-Aminohexyl)-5-chlor-1-naphthalinsulfonamid). Therefore, it is possible, that the interaction of CaM with the transmembrane-intracellular region of TIM-2 inhibits the ADAM10-mediated shedding of TIM-2. Moreover, BzATP- and Ionomycin-mediated shedding of endogenous TIM-2 was verified in primary murine B cells activated with anti-IgM and anti-CD40 monoclonal antibodies. Furthermore, it was demonstrated, that H-ferritin the natural ligand of TIM-2, interacts with recombinant soluble TIM-2 as well as with shed TIM-2 protein. H-ferritin is involved in the cellular iron-transport and can stimulate the proliferation of B cells. Therefore, further analyses will have to show if the ADAM10-dependent TIM-2 shedding is involved in B cell-biology or iron-homeostasis.

7 Literaturverzeichnis

- Abel, S., Hundhausen, C., Mentlein, R., Schulte, A., Berkhout, T.A., Broadway, N., Hartmann, D., Sedlacek, R., Dietrich, S., Muetze, B., Schuster, B., Kallen, K.J., Saftig, P., Rose-John, S. & Ludwig, A. (2004) The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J Immunol*, **172**, 6362-6372.
- Alexopoulou, L., Kranidioti, K., Xanthoulea, S., Denis, M., Kotanidou, A., Douni, E., Blackshear, P.J., Kontoyiannis, D.L. & Kollias, G. (2006) Transmembrane TNF protects mutant mice against intracellular bacterial infections, chronic inflammation and autoimmunity. *Eur J Immunol.*, **36**, 2768-2780.
- Alkhateeb, A.A. & Connor, J.R. (2013) The significance of ferritin in cancer: Anti-oxidation, inflammation and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. **1836**, 245-254.
- Alkhateeb, A.A., Han, B. & Connor, J.R. (2013) Ferritin stimulates breast cancer cells through an iron-independent mechanism and is localized within tumor-associated macrophages. *Breast Cancer Res Treat*, **137**, 733-744.
- Amour, A., Knight, C.G., Webster, A., Slocombe, P.M., Stephens, P.E., Knauper, V., Docherty, A.J. & Murphy, G. (2000) The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett*, **473**, 275-279.
- Amour, A., Slocombe, P.M., Webster, A., Butler, M., Knight, C.G., Smith, B.J., Stephens, P.E., Shelley, C., Hutton, M., Knauper, V., Docherty, A.J. & Murphy, G. (1998) TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett*, **435**, 39-44.
- Anderson, A.C., Anderson, D.E., Bregoli, L., Hastings, W.D., Kassam, N., Lei, C., Chandwaskar, R., Karman, J., Su, E.W., Hirashima, M., Bruce, J.N., Kane, L.P., Kuchroo, V.K. & Hafler, D.A. (2007) Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science*, **318**, 1141-1143.
- Andrews, R.K., Suzuki-Inoue, K., Shen, Y., Tulasne, D., Watson, S.P. & Berndt, M.C. (2002) Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of platelet glycoprotein VI. *Blood*, **99**, 4219-4221.
- Arad, I., Konijn, A.M., Linder, N., Goldstein, M. & Kaufmann, N.A. (1988) Serum ferritin levels in preterm infants after multiple blood transfusions. *Am J Perinatol*, **5**, 40-43.
- Arduise, C., Abache, T., Li, L., Billard, M., Chabanon, A., Ludwig, A., Mauduit, P., Boucheix, C., Rubinstein, E. & Le Naour, F. (2008) Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor. *J Immunol*, **181**, 7002-7013.
- Arosio, P., Ingrassia, R. & Cavadini, P. (2009) Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta*, **1790**, 589-599.
- Bailly, V., Zhang, Z., Meier, W., Cate, R., Sanicola, M. & Bonventre, J.V. (2002) Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem*, **277**, 39739-39748.

- Baran, P., Nitz, R., Grötzinger, J., Scheller, J. & Garbers, C. (2013) Minimal interleukin (IL)-6 receptor stalk composition for IL-6R shedding and IL-6 classic signaling. *J Biol Chem*, **288**, 14756-68.
- Becherer, J.D. & Blobel, C.P. (2003) Biochemical properties and functions of membrane-anchored metalloprotease-disintegrin proteins (ADAMs). *Curr Top Dev Biol*, **54**, 101-123.
- Bender, M., Hofmann, S., Stegner, D., Chalaris, A., Bosl, M., Braun, A., Scheller, J., Rose-John, S. & Nieswandt, B. (2010) Differentially regulated GPVI ectodomain shedding by multiple platelet-expressed proteinases. *Blood*, **116**, 3347-3355.
- Black, R.A., Doedens, J.R., Mahimkar, R., Johnson, R., Guo, L., Wallace, A., Virca, D., Eisenman, J., Slack, J., Castner, B., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Cowling, R., Jin, G., Charrier, K., Peschon, J.J. & Paxton, R. (2003) Substrate specificity and inducibility of TACE (tumour necrosis factor alpha-converting enzyme) revisited: the Ala-Val preference, and induced intrinsic activity. *Biochem Soc Symp*, 39-52.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J. & Cerretti, D.P. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, **385**, 729-733.
- Blobel, C.P. (1997) Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell*, **90**, 589-592.
- Blobel, C.P. (2005) ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 32-43.
- Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turck, C.W., Myles, D.G., Primakoff, P. & White, J.M. (1992) A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*, **356**, 248-252.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F.X. & Stockler, W. (1993) Astacins, serralsins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett*, **331**, 134-140.
- Boldt, H.B., Overgaard, M.T., Laursen, L.S., Weyer, K., Sottrup-Jensen, L. & Oxvig, C. (2001) Mutational analysis of the proteolytic domain of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): classification as a metzincin. *Biochem J*, **358**, 359-367.
- Bonventre, J.V. & Yang, L. (2010) Kidney injury molecule-1. *Curr Opin Crit Care*, **16**, 556-561.
- Buxbaum, J.D., Liu, K.N., Luo, Y., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peschon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P. & Black, R.A. (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.
- Caescu, C.I., Jeschke, G.R. & Turk, B.E. (2009) Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem J*, **424**, 79-88.

- Canobbio, I., Catricala, S., Balduini, C. & Torti, M. (2011) Calmodulin regulates the non-amyloidogenic metabolism of amyloid precursor protein in platelets. *Biochim Biophys Acta*, **1813**, 500-506.
- Cawston, T.E. & Wilson, A.J. (2006) Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, **20**, 983-1002.
- Chakravarti, S., Sabatos, C.A., Xiao, S., Illes, Z., Cha, E.K., Sobel, R.A., Zheng, X.X., Strom, T.B. & Kuchroo, V.K. (2005) Tim-2 regulates T helper type 2 responses and autoimmunity. *J Exp Med*, **202**, 437-444.
- Chalaris, A., Adam, N., Sina, C., Rosenstiel, P., Lehmann-Koch, J., Schirmacher, P., Hartmann, D., Cichy, J., Gavrilova, O., Schreiber, S., Jostock, T., Matthews, V., Hasler, R., Becker, C., Neurath, M.F., Reiss, K., Saftig, P., Scheller, J. & Rose-John, S. (2010) Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med*, **207**, 1617-1624.
- Chalaris, A., Garbers, C., Rabe, B., Rose-John, S. & Scheller, J. (2011) The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol*, **90**, 484-494.
- Chalaris, A., Rabe, B., Paliga, K., Lange, H., Laskay, T., Fielding, C.A., Jones, S.A., Rose-John, S. & Scheller, J. (2007) Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood*, **110**, 1748-1755.
- Chan, A., Seguin, R., Magnus, T., Papadimitriou, C., Toyka, K.V., Antel, J.P. & Gold, R. (2003) Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and its therapeutic implications: termination of CNS autoimmune inflammation and modulation by interferon-beta. *Glia*, **43**, 231-242.
- Chantry, A., Gregson, N.A. & Glynn, P. (1989) A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J Biol Chem*, **264**, 21603-21607.
- Chen, T.T., Li, L., Chung, D.H., Allen, C.D., Torti, S.V., Torti, F.M., Cyster, J.G., Chen, C.Y., Brodsky, F.M., Niemi, E.C., Nakamura, M.C., Seaman, W.E. & Daws, M.R. (2005) TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. *J Exp Med*, **202**, 955-965.
- Clegg, G.A., Fitton, J.E., Harrison, P.M. & Treffry, A. (1980) Ferritin: molecular structure and iron-storage mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol*, **36**, 56-86.
- Coffman, L.G., Parsonage, D., D'Agostino, R., Jr., Torti, F.M. & Torti, S.V. (2009) Regulatory effects of ferritin on angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 570-575.
- Collo, G., Neidhart, S., Kawashima, E., Kosco-Vilbois, M., North, R.A. & Buell, G. (1997) Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology*, **36**, 1277-1283.
- Contin, C., Pitard, V., Itai, T., Nagata, S., Moreau, J.F. & Dechanet-Merville, J. (2003) Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J Biol Chem*, **278**, 32801-32809.

- Cuadros, T., Trilla, E., Vilà, M.R., de Torres, I., Vilardell, J., Messaoud, N.B., Salcedo, M., Sarró, E., López-Hellin, J., Blanco, A., Mir, C., Ramón, Y., Cajal, S., Itarte, E., Morote, J. & Meseguer, A. (2013) Hepatitis A virus cellular receptor 1/kidney injury molecule-1 is a susceptibility gene for clear cell renal cell carcinoma and hepatitis A virus cellular receptor/kidney injury molecule-1 ectodomain shedding a predictive biomarker of tumour progression. *Eur J Cancer*, **49**, 2034-2047.
- Degauque, N., Mariat, C., Kenny, J., Zhang, D., Gao, W., Vu, M.D., Alexopoulos, S., Oukka, M., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H., Kuchroo, V., Zheng, X.X. & Strom, T.B. (2008) Immunostimulatory Tim-1-specific antibody deprograms Tregs and prevents transplant tolerance in mice. *J Clin Invest*, **118**, 735-741.
- DeKruyff, R.H., Bu, X., Ballesteros, A., Santiago, C., Chim, Y.L., Lee, H.H., Karisola, P., Pichavant, M., Kaplan, G.G., Umetsu, D.T., Freeman, G.J. & Casanovas, J.M. (2010) T cell/transmembrane, Ig, and mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol*, **184**, 1918-1930.
- Delarasse, C., Auger, R., Gonnord, P., Fontaine, B. & Kanellopoulos, J.M. (2011) The purinergic receptor P2X7 triggers alpha-secretase-dependent processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, **286**, 2596-2606.
- Dello Sbarba, P. & Rovida, E. (2002) Transmodulation of cell surface regulatory molecules via ectodomain shedding. *Biol Chem*, **383**, 69-83.
- Dewitz C., Möller-Hackbarth K., Schweigert O., Reiss K., Chalaris A., Scheller J., Rose-John S. (2013) T cell immunoglobulin and mucin domain 2 (TIM-2) is a target of A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) 10-mediated ectodomain shedding. *FEBS Journal*, doi: 10.1111/febs.12583.
- Diaz-Rodriguez, E., Cabrera, N., Esparis-Ogando, A., Montero, J.C. & Pandiella, A. (1999) Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms. *Eur J Neurosci*, **11**, 1421-1430.
- Diaz-Rodriguez, E., Esparis-Ogando, A., Montero, J.C., Yuste, L. & Pandiella, A. (2000) Stimulation of cleavage of membrane proteins by calmodulin inhibitors. *Biochem J*, **346**, 359-367.
- Diaz-Rodriguez, E., Montero, J.C., Esparis-Ogando, A., Yuste, L. & Pandiella, A. (2002) Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol Biol Cell*, **13**, 2031-2044.
- Dubyak, G.R. & el-Moatassim, C. (1993) Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol*, **265**, C577-606.
- Edwards, D.R., Handsley, M.M. & Pennington, C.J. (2008) The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*, **29**, 258-289.
- Endres, K., Anders, A., Kojro, E., Gilbert, S., Fahrenholz, F. & Postina, R. (2003) Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem*, **270**, 2386-2393.

- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. & Henson, P.M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, **148**, 2207-2216.
- Fan, H. & Derynck, R. (1999) Ectodomain shedding of TGF- α and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades. *Embo J*, **18**, 6962-6972.
- Farrell, A.W., Gadeock, S., Pupovac, A., Wang, B., Jalilian, I., Ranson, M. & Sluyter, R. (2010) P2X7 receptor activation induces cell death and CD23 shedding in human RPMI 8226 multiple myeloma cells. *Biochim Biophys Acta*, **1800**, 1173-1182.
- Feigelstock, D., Thompson, P., Mattoo, P., Zhang, Y. & Kaplan, G.G. (1998) The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol*, **72**, 6621-6628.
- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Dal Susino, M., Melchiorri, L., Baricordi, O.R. & Di Virgilio, F. (1997a) Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol*, **159**, 1451-1458.
- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Hanau, S. & Di Virgilio, F. (1997b) Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med*, **185**, 579-582.
- Ferrari, D., Villalba, M., Chiozzi, P., Falzoni, S., Ricciardi-Castagnoli, P. & Di Virgilio, F. (1996) Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. *J Immunol*, **156**, 1531-1539.
- Filippini, A., Taffs, R.E., Agui, T. & Sitkovsky, M.V. (1990) Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. *J Biol Chem*, **265**, 334-340.
- Fong, K.P., Barry, C., Tran, A.N., Traxler, E.A., Wannemacher, K.M., Tang, H.Y., Speicher, K.D., Blair, I.A., Speicher, D.W., Grosser, T. & Brass, L.F. (2011) Deciphering the human platelet sheddome. *Blood*, **117**, e15-26.
- Freeman, G.J., Casasnovas, J.M., Umetsu, D.T. & DeKruyff, R.H. (2010) TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*, **235**, 172-189.
- Fukushima, A., Sumi, T., Fukuda, K., Kumagai, N., Nishida, T., Okumura, K., Akiba, H., Yagita, H. & Ueno, H. (2007) T-cell Ig and mucin domain-containing protein (Tim)-2 regulates murine allergic conjunctivitis during the effector phase. *Immunol Lett*, **110**, 133-138.
- Garbers, C., Jänner, N., Chalaris, A., Moss, M.L., Floss, D.M., Meyer, D., Koch-Nolte, F., Rose-John, S. & Scheller, J. (2011) Species specificity of ADAM10 and ADAM7 in IL-6 transsignaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6R shedding. *J Biol Chem*, **286**, 14804-14811.
- Gardiner, E.E., Arthur, J.F., Berndt, M.C. & Andrews, R.K. (2005) Role of calmodulin in platelet receptor function. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*, **3**, 283-287.

- Gardiner, E.E., Karunakaran, D., Shen, Y., Arthur, J.F., Andrews, R.K. & Berndt, M.C. (2007) Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases. *J Thromb Haemost*, **5**, 1530-1537.
- Garton, K.J., Gough, P.J., Blobel, C.P., Murphy, G., Greaves, D.R., Dempsey, P.J. & Raines, E.W. (2001) Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem*, **276**, 37993-38001.
- Gavert, N., Sheffer, M., Raveh, S., Spaderna, S., Shtutman, M., Brabletz, T., Barany, F., Paty, P., Notterman, D., Domany, E. & Ben-Ze'ev, A. (2007) Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Res*, **67**, 7703-7712.
- Gechtman, Z., Alonso, J.L., Raab, G., Ingber, D.E. & Klagsbrun, M. (1999) The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *J Biol Chem*, **274**, 28828-28835.
- Gifford, J.L., Ishida, H. & Vogel, H.J. (2012) Structural insights into calmodulin-regulated L-selectin ectodomain shedding. *J Biol Chem*, **287**, 26513-26527.
- Gonzales, P.E., Galli, J.D. & Milla, M.E. (2008) Identification of key sequence determinants for the inhibitory function of the prodomain of TACE. *Biochemistry*, **47**, 9911-9919.
- Gough, P.J., Garton, K.J., Wille, P.T., Rychlewski, M., Dempsey, P.J. & Raines, E.W. (2004) A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16. *J Immunol*, **172**, 3678-3685.
- Gould, R.J., Polokoff, M.A., Friedman, P.A., Huang, T.F., Holt, J.C., Cook, J.J. & Niewiarowski, S. (1990) Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc Soc Exp Biol Med*, **195**, 168-171.
- Gray, C.P., Franco, A.V., Arosio, P. & Hersey, P. (2001) Immunosuppressive effects of melanoma-derived heavy-chain ferritin are dependent on stimulation of IL-10 production. *Int J Cancer*, **92**, 843-850.
- Gu, B., Bendall, L.J. & Wiley, J.S. (1998) Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood*, **92**, 946-951.
- Guo, L., Takino, T., Endo, Y., Domoto, T. & Sato, H. (2012) Shedding of kidney injury molecule-1 by membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *J Biochem*, **152**, 425-432.
- Hamaoka, M., Chinen, I., Murata, T., Takashima, S., Iwamoto, R. & Mekada, E. (2010) Anti-human HB-EGF monoclonal antibodies inhibiting ectodomain shedding of HB-EGF and diphtheria toxin binding. *J Biochem*, **148**, 55-69.
- Han, J., Seaman, W.E., Di, X., Wang, W., Willingham, M., Torti, F.M. & Torti, S.V. (2011) Iron uptake mediated by binding of H-ferritin to the TIM-2 receptor in mouse cells. *PLoS One*, **6**, e23800.

- Hansen, H.P., Recke, A., Reineke, U., Von Tresckow, B., Borchmann, P., Von Strandmann, E.P., Lange, H., Lemke, H. & Engert, A. (2004) The ectodomain shedding of CD30 is specifically regulated by peptide motifs in its cysteine-rich domains 2 and 5. *FASEB J*, **18**, 893-895.
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., von Figura, K. & Saftig, P. (2002) The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet*, **11**, 2615-2624.
- Hastings, W.D., Anderson, D.E., Kassam, N., Koguchi, K., Greenfield, E.A., Kent, S.C., Zheng, X.X., Strom, T.B., Hafler, D.A. & Kuchroo, V.K. (2009) TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur J Immunol*, **39**, 2492-2501.
- Hinkle, C.L., Sunnarborg, S.W., Loiselle, D., Parker, C.E., Stevenson, M., Russell, W.E. & Lee, D.C. (2004) Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency. *J Biol Chem*, **279**, 24179-24188.
- Hooper, N.M., Karran, E.H. & Turner, A.J. (1997) Membrane protein secretases. *Biochem J*, **321**, 265-279.
- Horiuchi, K., Kimura, T., Miyamoto, T., Takaishi, H., Okada, Y., Toyama, Y. & Blobel, C.P. (2007) Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J Immunol*, **179**, 2686-2689.
- Howard, L., Lu, X., Mitchell, S., Griffiths, S. & Glynn, P. (1996) Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem J*, **317**, 45-50.
- Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T.A., Broadway, N., Saftig, P., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., Kallen, K.-J., Rose-John, S. & Ludwig, A. (2003) The disintegrin-like metalloproteinase ADAM 10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*, **102**, 1186-1195.
- Hundhausen, C., Schulte, A., Schulz, B., Andrzejewski, M.G., Schwarz, N., von Hundelshausen, P., Winter, U., Paliga, K., Reiss, K., Saftig, P., Weber, C. & Ludwig, A. (2007) Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. *J Immunol*, **178**, 8064-8072.
- Huxley-Jones, J., Clarke, T.K., Beck, C., Toubaris, G., Robertson, D.L. & Boot-Handford, R.P. (2007) The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC Evol Biol*, **7**, 63.
- Ichimura, T., Asseldonk, E.J., Humphreys, B.D., Gunaratnam, L., Duffield, J.S. & Bonventre, J.V. (2008) Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest*, **118**, 1657-1668.
- Ichimura, T., Bonventre, J.V., Bailly, V., Wei, H., Hession, C.A., Cate, R.L. & Sanicola, M. (1998) Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem*, **273**, 4135-4142.

- Ivetic, A., Florey, O., Deka, J., Haskard, D.O., Ager, A. & Ridley, A.J. (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.
- James, P., Vorherr, T. & Carafoli, E. (1995) Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? *Trends Biochem Sci*, **20**, 38-42.
- Jostock, T., Müllberg, J., Özbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M.F. & Rose-John, S. (2001) Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble IL-6R transsignaling responses. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 160-167.
- Kahn, J., Walcheck, B., Migaki, G.I., Jutila, M.A. & Kishimoto, T.K. (1998) Calmodulin regulates L-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism. *Cell*, **92**, 809-818.
- Kaplan, G., Totsuka, A., Thompson, P., Akatsuka, T., Moritsugu, Y. & Feinstone, S.M. (1996) Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *Embo J*, **15**, 4282-4296.
- Kawamoto, T., Abe, Y., Ito, J., Makino, F., Kojima, Y., Usui, Y., Ma, J., Morimoto, S., Yagita, H., Okumura, K., Takasaki, Y. & Akiba, H. (2011) Anti-T cell immunoglobulin and mucin domain-2 monoclonal antibody exacerbates collagen-induced arthritis by stimulating B cells. *Arthritis Res Ther*, **13**, R47.
- Knickelbein, J.E., de Souza, A.J., Tosti, R., Narayan, P. & Kane, L.P. (2006) Cutting edge: inhibition of T cell activation by TIM-2. *J Immunol*, **177**, 4966-4970.
- Ko, S.Y., Lin, S.C., Wong, Y.K., Liu, C.J., Chang, K.W. & Liu, T.Y. (2007) Increase of disintegrin metalloprotease 10 (ADAM10) expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*, **245**, 33-43.
- Kobayashi, N., Karisola, P., Peña-Cruz, V., Dorfman, D.M., Jinushi, M., Umetsu, S.E., Butte, M.J., Nagumo, H., Chernova, I., Zhu, B., Sharpe, A.H., Ito, S., Dranoff, G., Kaplan, G.G., Casasnovas, J.M., Umetsu, D.T., Dekruyff, R.H. & Freeman, G.J. (2007) TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity*, **27**, 927-940.
- Koguchi, K., Anderson, D.E., Yang, L., O'Connor, K.C., Kuchroo, V.K. & Hafler, D.A. (2006) Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis. *J Exp Med*, **203**, 1413-1418.
- Konijn, A.M., Carmel, N., Levy, R. & Herskho, C. (1981) Ferritin synthesis in inflammation. II. Mechanism of increased ferritin synthesis. *Br J Haematol*, **49**, 361-370.
- Kottirsch, G., Koch, G., Feifel, R. & Neumann, U. (2002) Beta-aryl-succinic acid hydroxamates as dual inhibitors of matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor alpha converting enzyme. *J Med Chem*, **45**, 2289-2293.
- Kraft, A.S. & Anderson, W.B. (1983) Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature*, **301**, 621-623.

- Kuchroo, V.K., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H. & Freeman, G.J. (2003) The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*, **3**, 454-462.
- Kuehn, E.W., Park, K.M., Somlo, S. & Bonventre, J.V. (2002) Kidney injury molecule-1 expression in murine polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, **283**, F1326-1336.
- Kumanogoh, A. & Kikutani, H. (2003) Immune semaphorins: a new area of semaphorin research. *J Cell Sci*, **116**, 3463-3470.
- Kumanogoh, A., Marukawa, S., Suzuki, K., Takegahara, N., Watanabe, C., Ch'ng, E., Ishida, I., Fujimura, H., Sakoda, S., Yoshida, K. & Kikutani, H. (2002) Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature*, **419**, 629-633.
- Lazarowski, E.R., Boucher, R.C. & Harden, T.K. (2000) Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J Biol Chem*, **275**, 31061-31068.
- Le Gall, S.M., Bobé, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X.D., Lundell, D., Gibb, D.R., Conrad, D., Saftig, P. & Blobel, C.P. (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.
- Le Gall, S.M., Maretzky, T., Issuree, P.D., Niu, X.D., Reiss, K., Saftig, P., Khokha, R., Lundell, D. & Blobel, C.P. (2010) ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J Cell Sci*, **123**, 3913-3922.
- Lee, D.C., Sunnarborg, S.W., Hinkle, C.L., Myers, T.J., Stevenson, M.Y., Russell, W.E., Castner, B.J., Gerhart, M.J., Paxton, R.J., Black, R.A., Chang, A. & Jackson, L.F. (2003) TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase. *Ann N Y Acad Sci*, **995**, 22-38.
- Lewandrowski, U., Wortelkamp, S., Lohrig, K., Zahedi, R.P., Wolters, D.A., Walter, U. & Sickmann, A. (2009) Platelet membrane proteomics: a novel repository for functional research. *Blood*, **114**, e10-19.
- Li, R., Luo, C., Mines, M., Zhang, J. & Fan, G.H. (2006) Chemokine CXCL12 induces binding of ferritin heavy chain to the chemokine receptor CXCR4, alters CXCR4 signaling, and induces phosphorylation and nuclear translocation of ferritin heavy chain. *J Biol Chem*, **281**, 37616-37627.
- Lichtenthaler, S.F. (2006) Ectodomain shedding of the amyloid precursor protein: cellular control mechanisms and novel modifiers. *Neurodegener Dis*, **3**, 262-269.
- Lim, A.I., Chan, L.Y., Lai, K.N., Tang, S.C., Chow, C.W., Lam, M.F. & Leung, J.C. (2012) 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.
- Lingwood, D. & Simons, K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, **327**, 46-50.

- Lorenzen, I., Lokau, J., Dusterhoft, S., Trad, A., Garbers, C., Scheller, J., Rose-John, S. & Grotzinger, J. (2012) The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Lett*, **586**, 1093-1100.
- Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M.H., Broadway, N., Andrews, R.C., Bickett, D.M., Leesnitzer, M.A. & Becherer, J.D. (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., Gardoni, F., Di Luca, M. & Perez-Otano, I. (2010) An arginine stretch limits ADAM10 exit from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **285**, 10376-10384.
- Marcello, E., Gardoni, F., Mauceri, D., Romorini, S., Jeromin, A., Epis, R., Borroni, B., Cattabeni, F., Sala, C., Padovani, A. & Di Luca, M. (2007) Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity. *J Neurosci*, **27**, 1682-1691.
- Marcello, E., Saraceno, C., Musardo, S., Vara, H., de la Fuente, A.G., Pelucchi, S., Di Marino, D., Borroni, B., Tramontano, A., Perez-Otano, I., Padovani, A., Giustetto, M., Gardoni, F. & Di Luca, M. (2013) Endocytosis of synaptic ADAM10 in neuronal plasticity and Alzheimer's disease. *J Clin Invest*, **123**, 2523-2538.
- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D. & Saftig, P. (2005a) ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9182-9187.
- Maretzky, T., Schulte, M., Ludwig, A., Rose-John, S., Blobel, C., Hartmann, D., Altevogt, P., Saftig, P. & Reiss, K. (2005b) L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Mol Cell Biol*, **25**, 9040-9053.
- Matala, E., Alexander, S.R., Kishimoto, T.K. & Walcheck, B. (2001) The cytoplasmic domain of L-selectin participates in regulating L-selectin endoproteolysis. *J Immunol*, **167**, 1617-1623.
- Matthews, V., Schuster, B., Schütze, S., Bußmeyer, I., Ludwig, A., Hundhausen, C., Sadowski, T., Saftig, P., Hartmann, D., Kallen, K.-J. & Rose-John, S. (2003a) Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J. Biol. Chem.*, **278**, 38829-38839.
- Matthews, V., Schuster, B., Schütze, S., Bussmeyer, I., Ludwig, A., Hundhausen, C., Sadowski, T., Saftig, P., Hartmann, D., Kallen, K.J. & Rose-John, S. (2003b) Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem*, **278**, 38829-38839.
- Matzner, Y., Hershko, C., Polliack, A., Konijn, A.M. & Izak, G. (1979) Suppressive effect of ferritin on in vitro lymphocyte function. *Br J Haematol*, **42**, 345-353.

- McCulloch, D.R., Akl, P., Samaratunga, H., Herington, A.C. & Odorico, D.M. (2004) Expression of the disintegrin metalloprotease, ADAM-10, in prostate cancer and its regulation by dihydrotestosterone, insulin-like growth factor I, and epidermal growth factor in the prostate cancer cell model LNCaP. *Clin Cancer Res*, **10**, 314-323.
- McIntire, J.J., Umetsu, D.T. & DeKruyff, R.H. (2004) TIM-1, a novel allergy and asthma susceptibility gene. *Springer Semin Immunopathol*, **25**, 335-348.
- McIntire, J.J., Umetsu, S.E., Akbari, O., Potter, M., Kuchroo, V.K., Barsh, G.S., Freeman, G.J., Umetsu, D.T. & DeKruyff, R.H. (2001) Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol*, **2**, 1109-1116.
- McIntire, J.J., Umetsu, S.E., Macaubas, C., Hoyte, E.G., Cinnioglu, C., Cavalli-Sforza, L.L., Barsh, G.S., Hallmayer, J.F., Underhill, P.A., Risch, N.J., Freeman, G.J., DeKruyff, R.H. & Umetsu, D.T. (2003) Immunology: hepatitis A virus link to atopic disease. *Nature*, **425**, 576.
- Meyers, J.H., Chakravarti, S., Schlesinger, D., Illes, Z., Waldner, H., Umetsu, S.E., Kenny, J., Zheng, X.X., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H., Strom, T.B. & Kuchroo, V.K. (2005a) TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nat Immunol*, **6**, 455-464.
- Meyers, J.H., Sabatos, C.A., Chakravarti, S. & Kuchroo, V.K. (2005b) The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. *Trends Mol Med*, **11**, 362-369.
- Minagar, A., Shapshak, P., Fujimura, R., Ownby, R., Heyes, M. & Eisdorfer, C. (2002) The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, **202**, 13-23.
- Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T. & Nagata, S. (2007) Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*, **450**, 435-439.
- Möller-Hackbarth, K., Dewitz, C., Schweigert, O., Trad, A., Garbers, C., Rose-John, S. & Scheller, J. (2013) ADAM10 and ADAM17 are major sheddases of T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (TIM-3). *J Biol Chem*, **288**, 34529-345244.
- Monney, L., Sabatos, C.A., Gaglia, J.L., Ryu, A., Waldner, H., Chernova, T., Manning, S., Greenfield, E.A., Coyle, A.J., Sobel, R.A., Freeman, G.J. & Kuchroo, V.K. (2002) Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*, **415**, 536-541.
- Moon, H., Na, H.Y., Chong, K.H. & Kim, T.J. (2006) P2X7 receptor-dependent ATP-induced shedding of CD27 in mouse lymphocytes. *Immunol Lett*, **102**, 98-105.
- Morrison, V.L., Barr, T.A., Brown, S. & Gray, D. (2010) TLR-mediated loss of CD62L focuses B cell traffic to the spleen during Salmonella typhimurium infection. *J Immunol*, **185**, 2737-2746.
- Moss, D., Powell, L.W., Arosio, P. & Halliday, J.W. (1992) Effect of cell proliferation on H-ferritin receptor expression in human T lymphoid (MOLT-4) cells. *J Lab Clin Med*, **120**, 239-243.

- Moss, M.L., Bomar, M., Liu, Q., Sage, H., Dempsey, P., Lenhart, P.M., Gillispie, P.A., Stoeck, A., Wildeboer, D., Bartsch, J.W., Palmisano, R. & Zhou, P. (2007) The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J Biol Chem*, **282**, 35712-35721.
- Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., Hoffman, C.R., Kost, T.A., Lambert, M.H., Leesnitzer, M.A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L.K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J.L., Becherer, J.D. & et al. (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature*, **385**, 733-736.
- Mou, P., Zeng, Z., Li, Q., Liu, X., Xin, X., Wannemacher, K.M., Ruan, C., Li, R., Brass, L.F. & Zhu, L. (2013) Identification of a calmodulin-binding domain in Sema4D that regulates its exodomain shedding in platelets. *Blood*, **121**, 4221-4230.
- Müllberg, J., Oberthur, W., Lottspeich, F., Mehl, E., Dittrich, E., Graeve, L., Heinrich, P.C. & Rose-John, S. (1994) The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J Immunol*, **152**, 4958-4968.
- Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Gunther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, A., Heinrich, P.C. & Rose-John, S. (1993) The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol.*, **23**, 473-480.
- Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Heinrich, P.C. & Rose-John, S. (1992) Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **189**, 794-800.
- Nakae, S., Iwakura, Y., Suto, H. & Galli, S.J. (2007) Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *J Leukoc Biol*, **81**, 1258-1268.
- Nakayama, M., Akiba, H., Takeda, K., Kojima, Y., Hashiguchi, M., Azuma, M., Yagita, H. & Okumura, K. (2009) Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood*, **113**, 3821-3830.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. & Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, **9**, 255-262.
- North, R.A. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, **82**, 1013-1067.
- Ohler, B., Graf, K., Bragg, R., Lemons, T., Coe, R., Genain, C., Israelachvili, J. & Husted, C. (2004) Role of lipid interactions in autoimmune demyelination. *Biochim Biophys Acta*, **1688**, 10-17.
- Osawa, M., Swindells, M.B., Tanikawa, J., Tanaka, T., Mase, T., Furuya, T. & Ikura, M. (1998) Solution structure of calmodulin-W-7 complex: the basis of diversity in molecular recognition. *J Mol Biol*, **276**, 165-176.
- Oswald, F., Tauber, B., Dobner, T., Bourteele, S., Kostezka, U., Adler, G., Liptay, S. & Schmid, R.M. (2001) p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. *Mol Cell Biol*, **21**, 7761-7774.

- Pandiella, A. & Massague, J. (1991) Multiple signals activate cleavage of the membrane transforming growth factor-alpha precursor. *J Biol Chem*, **266**, 5769-5773.
- Persechini, A., Moncrief, N.D. & Kretsinger, R.H. (1989) The EF-hand family of calcium-modulated proteins. *Trends Neurosci*, **12**, 462-467.
- Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., Boyce, R.W., Nelson, N., Kozlosky, C.J., Wolfson, M.F., Rauch, C.T., Cerretti, D.P., Paxton, R.J., March, C.J. & Black, R.A. (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, **282**, 1281-1284.
- Primakoff, P., Hyatt, H. & Tredick-Kline, J. (1987) Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J Cell Biol*, **104**, 141-149.
- Pruessmeyer, J. & Ludwig, A. (2009) The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Semin Cell Dev Biol*, **20**, 164-174.
- Recalcati, S., Invernizzi, P., Arosio, P. & Cairo, G. (2008) New functions for an iron storage protein: the role of ferritin in immunity and autoimmunity. *J Autoimmun*, **30**, 84-89.
- Reddy, P., Slack, J.L., Davis, R., Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Blanton, R.A., Shows, D., Peschon, J.J. & Black, R.A. (2000) Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem*, **275**, 14608-14614.
- Reiss, K., Maretzky, T., Haas, I.G., Schulte, M., Ludwig, A., Frank, M. & Saftig, P. (2006) Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gamma-protocadherin C3 modulates cell-cell adhesion. *J Biol Chem*, **281**, 21735-21744.
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D. & Saftig, P. (2005) ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *Embo J*, **24**, 742-752.
- Reiss, K. & Saftig, P. (2009) The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol*, **20**, 126-137.
- Rennert, P.D., Ichimura, T., Sizing, I.D., Bailly, V., Li, Z., Rennard, R., McCoon, P., Pablo, L., Miklasz, S., Tarilonte, L. & Bonventre, J.V. (2006) T cell, Ig domain, mucin domain-2 gene-deficient mice reveal a novel mechanism for the regulation of Th2 immune responses and airway inflammation. *J Immunol*, **177**, 4311-4321.
- Rhoads, A.R. & Friedberg, F. (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J*, **11**, 331-340.
- Rodriguez-Manzanet, R., DeKruyff, R., Kuchroo, V.K. & Umetsu, D.T. (2009) The costimulatory role of TIM molecules. *Immunol Rev*, **229**, 259-270.

- Roghani, M., Becherer, J.D., Moss, M.L., Atherton, R.E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R.K., Weskamp, G., Tempst, P. & Blobel, C.P. (1999) Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem*, **274**, 3531-3540.
- Rooke, J., Pan, D., Xu, T. & Rubin, G.M. (1996) KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science*, **273**, 1227-1231.
- Rose-John, S. (2012) IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci*, **8**, 1237-1247.
- Ruddell, R.G., Hoang-Le, D., Barwood, J.M., Rutherford, P.S., Piva, T.J., Watters, D.J., Santambrogio, P., Arosio, P. & Ramm, G.A. (2009) Ferritin functions as a proinflammatory cytokine via iron-independent protein kinase C zeta/nuclear factor kappaB-regulated signaling in rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, **49**, 887-900.
- Sabatos, C.A., Chakravarti, S., Cha, E., Schubart, A., Sanchez-Fueyo, A., Zheng, X.X., Coyle, A.J., Strom, T.B., Freeman, G.J. & Kuchroo, V.K. (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. & Reiss, K. (2011) The "A Disintegrin And Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol*, **90**, 527-535.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P. & Blobel, C.P. (2004) Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol*, **164**, 769-779.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sanchez-Fueyo, A., Tian, J., Picarella, D., Domenig, C., Zheng, X.X., Sabatos, C.A., Manlongat, N., Bender, O., Kamradt, T., Kuchroo, V.K., Gutierrez-Ramos, J.C., Coyle, A.J. & Strom, T.B. (2003) Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat Immunol*, **4**, 1093-1101.
- Santiago, C., Ballesteros, A., Martinez-Munoz, L., Mellado, M., Kaplan, G.G., Freeman, G.J. & Casasnovas, J.M. (2007a) Structures of T cell immunoglobulin mucin protein 4 show a metal-ion-dependent ligand binding site where phosphatidylserine binds. *Immunity*, **27**, 941-951.
- Santiago, C., Ballesteros, A., Tami, C., Martinez-Munoz, L., Kaplan, G.G. & Casasnovas, J.M. (2007b) Structures of T Cell immunoglobulin mucin receptors 1 and 2 reveal mechanisms for regulation of immune responses by the TIM receptor family. *Immunity*, **26**, 299-310.
- Sawa, M., Kiyoi, T., Kurokawa, K., Kumihara, H., Yamamoto, M., Miyasaka, T., Ito, Y., Hirayama, R., Inoue, T., Kirii, Y., Nishiwaki, E., Ohmoto, H., Maeda, Y., Ishibushi, E., Inoue, Y., Yoshino, K. & Kondo, H. (2002) New type of metalloproteinase inhibitor: design and synthesis of new phosphoramidate-based hydroxamic acids. *J Med Chem*, **45**, 919-929.

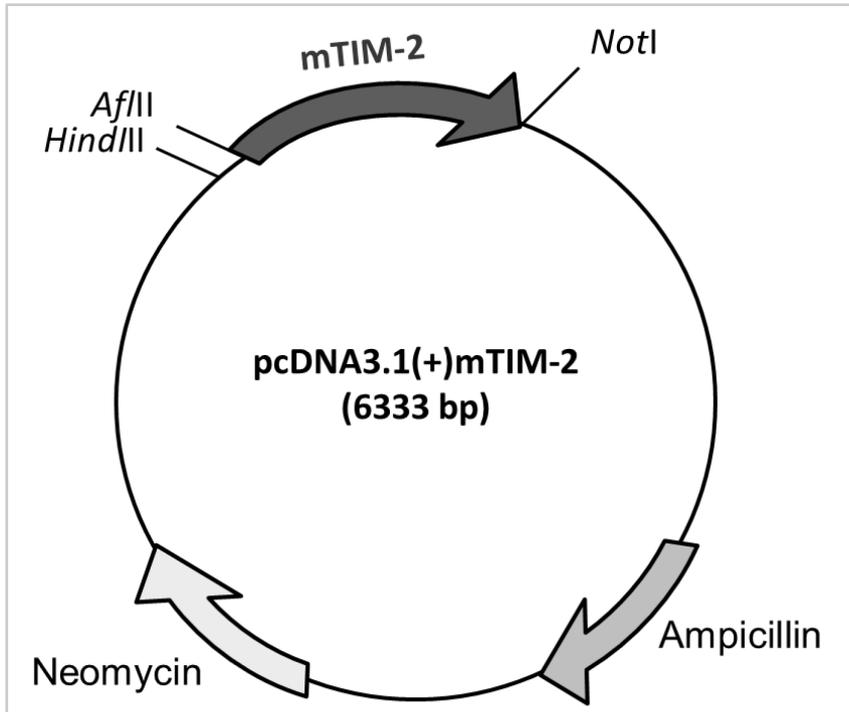
- Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C. & Rose-John, S. (2011a) ADAM17: a molecular switch controlling inflammatory and regenerative responses. *Trends Immunol*, **32**, 380-387.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S. (2011b) The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, **1813**, 878-888.
- Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Krebs, C., Bannas, P., Rissiek, B., Seman, M., Haag, F. & Koch-Nolte, F. (2009) NAD⁺ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *J Immunol*, **182**, 2898-2908.
- Schlondorff, J. & Blobel, C.P. (1999) Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci*, **112**, 3603-3617.
- Schweigert, O., Dewitz C., Möller-Hackbarth K., Trad A., Garbers C., Rose-John S. & Scheller J. (2013) 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. *Biochim Biophys Acta*, **doi**: 10.1016/j.bbamcr.2013.11.014.
- Seals, D.F. & Courtneidge, S.A. (2003) The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*, **17**, 7-30.
- Sengstake, S., Boneberg, E.M. & Illges, H. (2006) CD21 and CD62L shedding are both inducible via P2X7Rs. *Int Immunol*, **18**, 1171-1178.
- Sikora, A., Liu, J., Brosnan, C., Buell, G., Chessel, I. & Bloom, B.R. (1999) Cutting edge: purinergic signaling regulates radical-mediated bacterial killing mechanisms in macrophages through a P2X7-independent mechanism. *J Immunol*, **163**, 558-561.
- Sim, J.A., Young, M.T., Sung, H.Y., North, R.A. & Surprenant, A. (2004) Reanalysis of P2X7 receptor expression in rodent brain. *J Neurosci*, **24**, 6307-6314.
- Skaper, S.D., Debetto, P. & Giusti, P. (2010) The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J*, **24**, 337-345.
- Sluyter, R. & Wiley, J.S. (2002) Extracellular adenosine 5'-triphosphate induces a loss of CD23 from human dendritic cells via activation of P2X7 receptors. *Int Immunol*, **14**, 1415-1421.
- Soond, S.M., Everson, B., Riches, D.W. & Murphy, G. (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.
- Stefanini, S., Cavallo, S., Wang, C.Q., Tataseo, P., Vecchini, P., Giartosio, A. & Chiancone, E. (1996) Thermal stability of horse spleen apoferritin and human recombinant H apoferritin. *Arch Biochem Biophys*, **325**, 58-64.
- Steiner, H. & Haass, C. (2000) Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 217-224.

- Stocker, W. & Bode, W. (1995) Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr Opin Struct Biol*, **5**, 383-390.
- Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F.X., McKay, D.B. & Bode, W. (1995) The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci*, **4**, 823-840.
- Tanaka, M., Nanba, D., Mori, S., Shiba, F., Ishiguro, H., Yoshino, K., Matsuura, N. & Higashiyama, S. (2004) ADAM binding protein Eve-1 is required for ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands. *J Biol Chem*, **279**, 41950-41959.
- Tellier, E., Canault, M., Rebsomen, L., Bonardo, B., Juhan-Vague, I., Nalbone, G. & Peiretti, F. (2006) The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp Cell Res*, **312**, 3969-3980.
- Theil, E.C. (2003) Ferritin: at the crossroads of iron and oxygen metabolism. *J Nutr*, **133**, 1549S-1553S.
- Thompson, P., Lu, J. & Kaplan, G.G. (1998) The Cys-rich region of hepatitis A virus cellular receptor 1 is required for binding of hepatitis A virus and protective monoclonal antibody 190/4. *J Virol*, **72**, 3751-3761.
- Todorich, B., Zhang, X., Slagle-Webb, B., Seaman, W.E. & Connor, J.R. (2008) Tim-2 is the receptor for H-ferritin on oligodendrocytes. *J Neurochem*, **107**, 1495-1505.
- Torti, F.M. & Torti, S.V. (2002) Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, **99**, 3505-3516.
- Torti, S.V. & Torti, F.M. (1994) Iron and ferritin in inflammation and cancer. *Adv Inorg Biochem*, **10**, 119-137.
- Tousseyn, T., Thathiah, A., Jorissen, E., Raemaekers, T., Konietzko, U., Reiss, K., Maes, E., Snellinx, A., Serneels, L., Nyabi, O., Annaert, W., Saftig, P., Hartmann, D. & De Strooper, B. (2009) ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem*, **284**, 11738-11747.
- Umetsu, S.E., Lee, W.L., McIntire, J.J., Downey, L., Sanjanwala, B., Akbari, O., Berry, G.J., Nagumo, H., Freeman, G.J., Umetsu, D.T. & DeKruyff, R.H. (2005) TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat Immunol*, **6**, 447-454.
- Vila, M.R., Kaplan, G.G., Feigelstock, D., Nadal, M., Morote, J., Porta, R., Bellmunt, J. & Meseguer, A. (2004) Hepatitis A virus receptor blocks cell differentiation and is overexpressed in clear cell renal cell carcinoma. *Kidney Int*, **65**, 1761-1773.
- Vincent, B., Paitel, E., Saftig, P., Frobert, Y., Hartmann, D., De Strooper, B., Grassi, J., Lopez-Perez, E. & Checler, F. (2001) The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J Biol Chem*, **276**, 37743-37746.

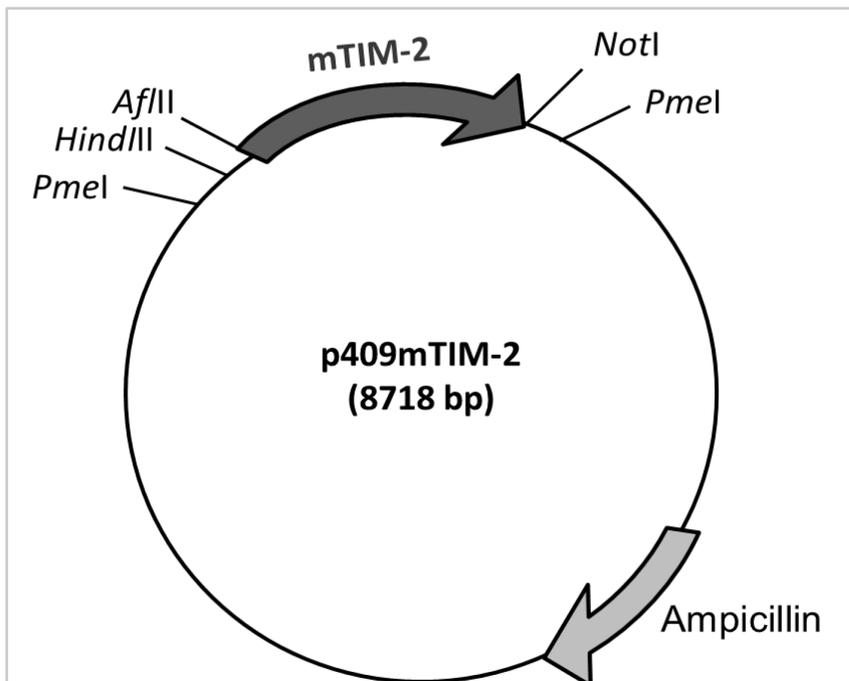
- Wang, Y., Zhang, A.C., Ni, Z., Herrera, A. & Walcheck, B. (2010) ADAM17 activity and other mechanisms of soluble L-selectin production during death receptor-induced leukocyte apoptosis. *J Immunol*, **184**, 4447-4454.
- Weskamp, G., Ford, J.W., Sturgill, J., Martin, S., Docherty, A.J., Swendeman, S., Broadway, N., Hartmann, D., Saftig, P., Umland, S., Sehara-Fujisawa, A., Black, R.A., Ludwig, A., Becherer, J.D., Conrad, D.H. & Blobel, C.P. (2006) ADAM10 is a principal 'shedase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. *Nat Immunol*, **7**, 1293-1298.
- White, J.M. (2003) ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 598-606.
- Wild-Bode, C., Fellerer, K., Kugler, J., Haass, C. & Capell, A. (2006) A basolateral sorting signal directs ADAM10 to adherens junctions and is required for its function in cell migration. *J Biol Chem*, **281**, 23824-23829.
- Willems, S.H., Tape, C.J., Stanley, P.L., Taylor, N.A., Mills, I.G., Neal, D.E., McCafferty, J. & Murphy, G. (2010) Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *Biochem J*, **428**, 439-450.
- Wong, M.X., Harbour, S.N., Wee, J.L., Lau, L.M., Andrews, R.K. & Jackson, D.E. (2004) Proteolytic cleavage of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) is regulated by a calmodulin-binding motif. *FEBS Lett*, **568**, 70-78.
- Xu, P. & Derynck, R. (2010) Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Mol Cell*, **37**, 551-566.
- Yan, Y., Shirakabe, K. & Werb, Z. (2002) The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J Cell Biol*, **158**, 221-226.
- Yu, M., Lam, J., Rada, B., Leto, T.L. & Levine, S.J. (2011) Double-stranded RNA induces shedding of the 34-kDa soluble TNFR1 from human airway epithelial cells via TLR3-TRIF-RIP1-dependent signaling: roles for dual oxidase 2- and caspase-dependent pathways. *J Immunol*, **186**, 1180-1188.
- Yuan, X., Ansari, M.J., D'Addio, F., Paez-Cortez, J., Schmitt, I., Donnarumma, M., Boenisch, O., Zhao, X., Popoola, J., Clarkson, M.R., Yagita, H., Akiba, H., Freeman, G.J., Iacomini, J., Turka, L.A., Glimcher, L.H. & Sayegh, M.H. (2009) Targeting Tim-1 to overcome resistance to transplantation tolerance mediated by CD8 T17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 10734-10739.
- Zhang, Z., Humphreys, B.D. & Bonventre, J.V. (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.
- Zheng, Y., Schlondorff, J. & Blobel, C.P. (2002) Evidence for regulation of the tumor necrosis factor alpha-convertase (TACE) by protein-tyrosine phosphatase PTPH1. *J Biol Chem*, **277**, 42463-42470.
- Zhu, C., Anderson, A.C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S.J., Zheng, X.X., Strom, T.B. & Kuchroo, V.K. (2005) The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol*, **6**, 1245-1252.

8 Anhang

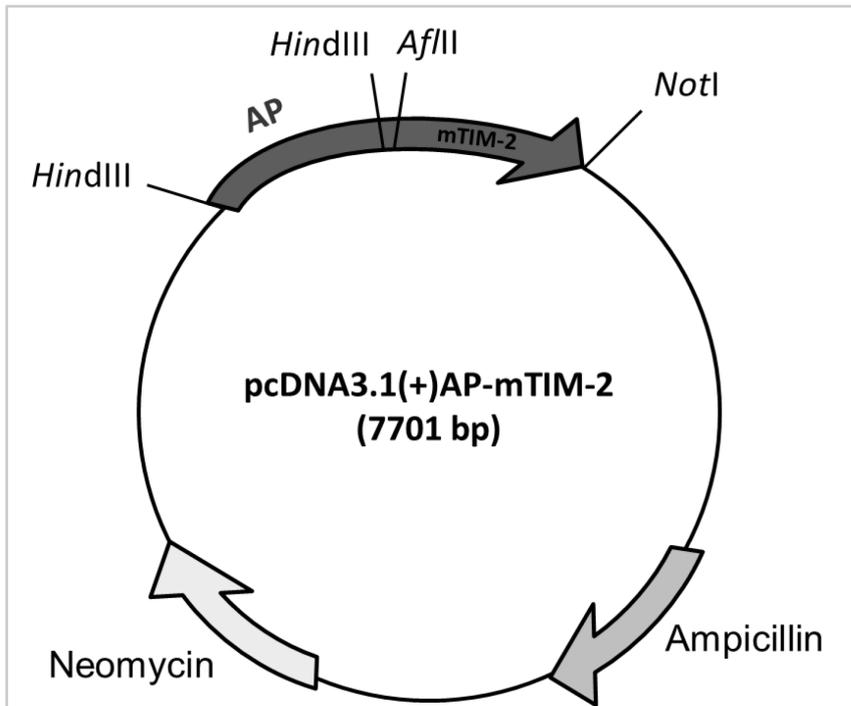
8.1 Plasmidkarten



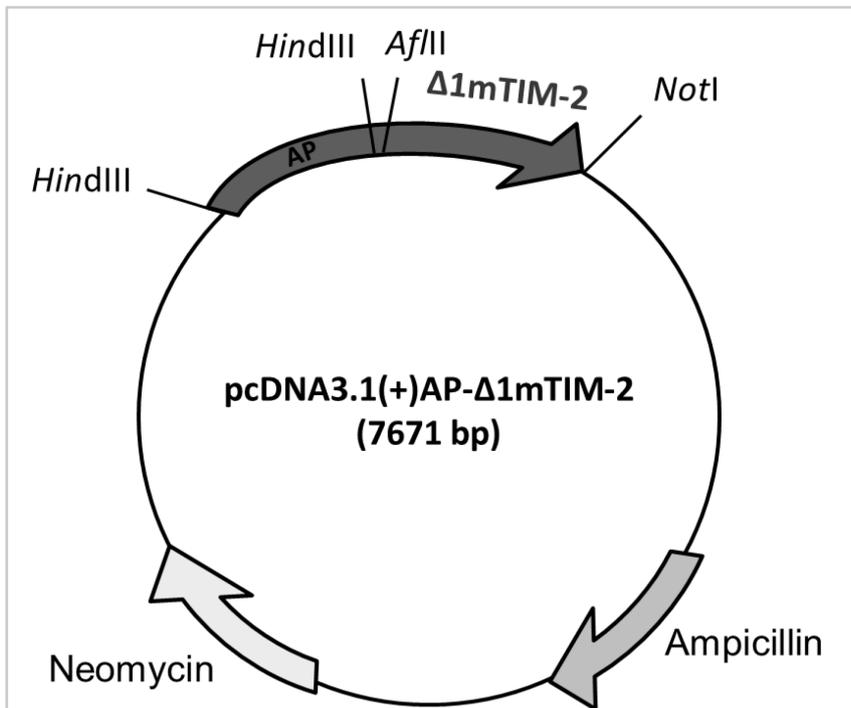
A: pcDNA3.1(+)-mTIM-2



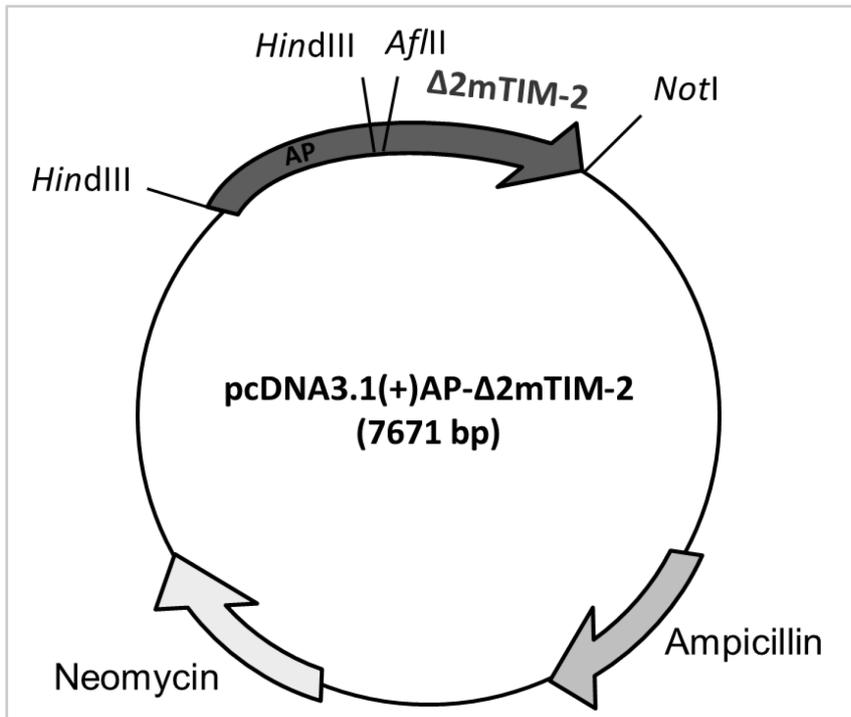
B: p409mTIM-2



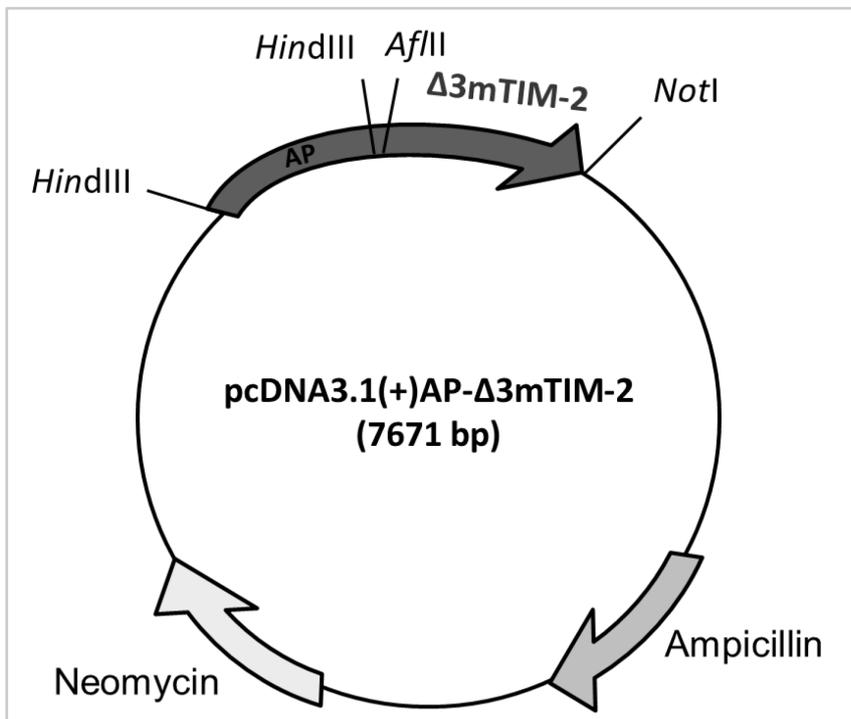
C: pcDNA3.1(+)-AP-mTIM-2



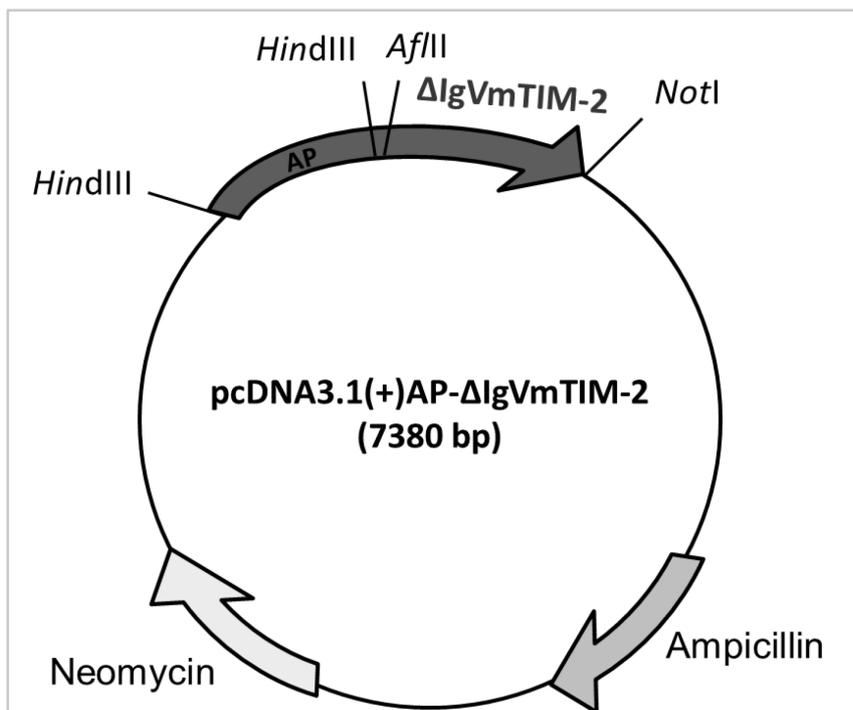
D: pcDNA3.1(+)-AP-Δ1mTIM-2



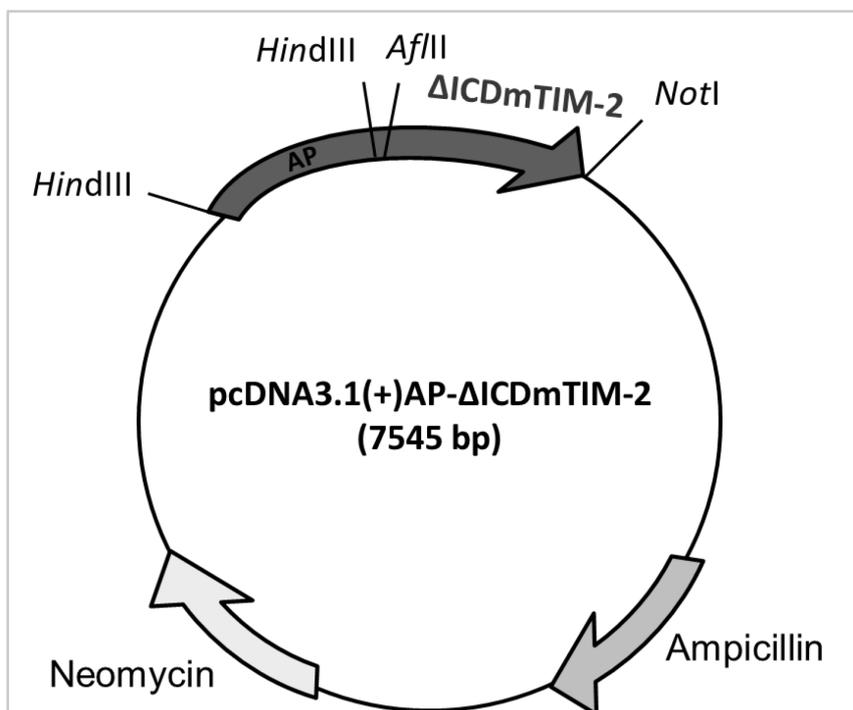
E: pcDNA3.1(+)-AP-Δ2mTIM-2



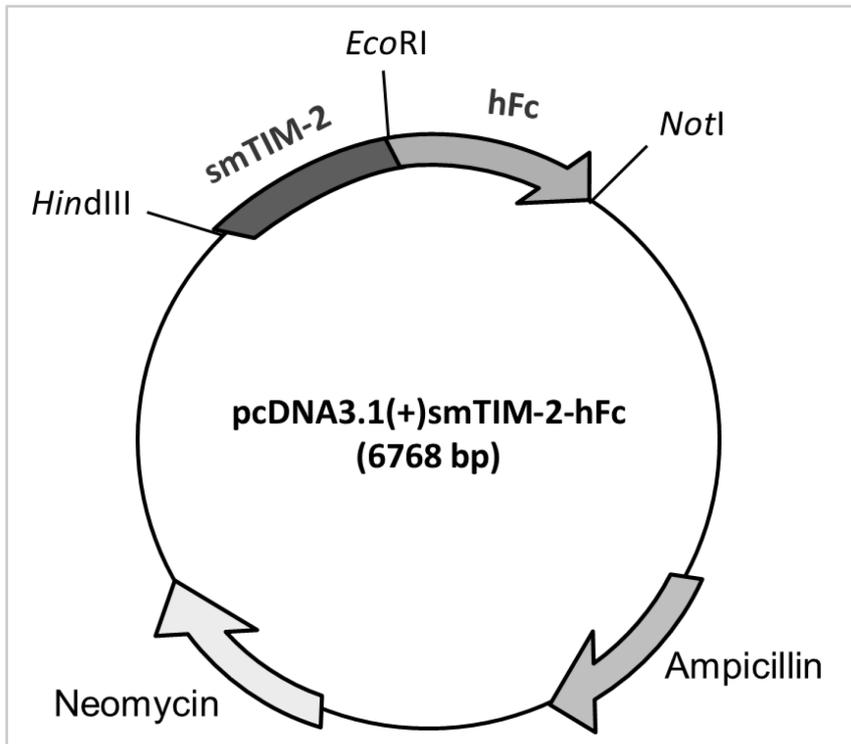
F: pcDNA3.1(+)-AP-Δ3mTIM-2



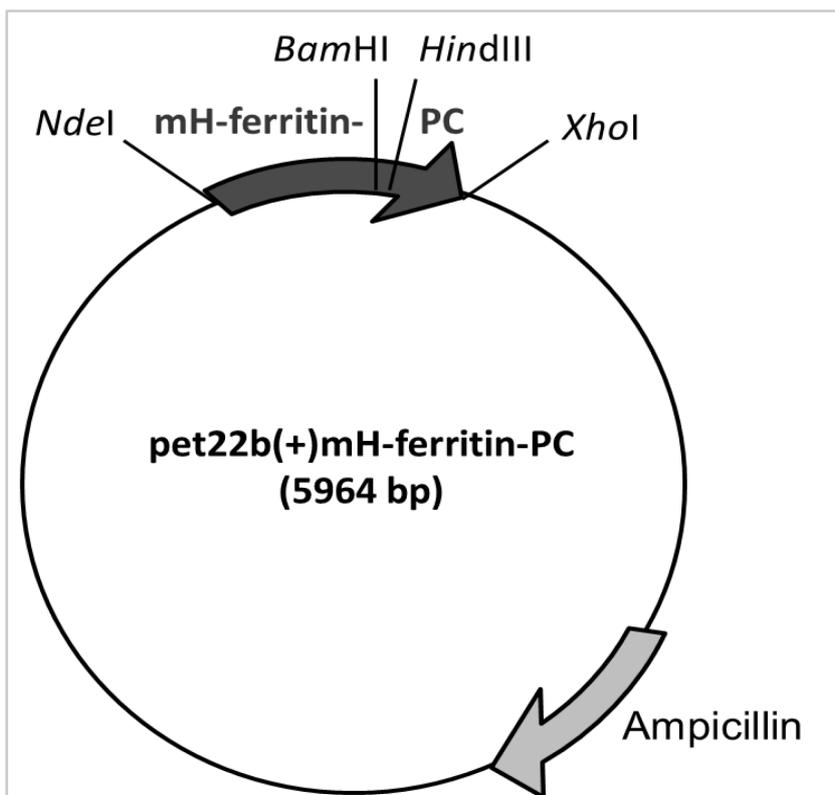
G: pcDNA3.1(+)-AP-ΔIgVmTIM-2



H: pcDNA3.1(+)-AP-ΔICDmTIM-2



I: pcDNA3.1(+)-smTIM-2-hFc



J: pet22b(+)-mH-Ferritin-PC

8.2 Publikationen

Originalbeiträge:

Dewitz C., Braun, O., Möller-Hackbarth K., Scheller J., Schiffelholz T., Baier P. C., Rose-John S. (2013): *Effects of blockade of peripheral interleukin-6 trans-signaling on hippocampus-dependent and independent memory in mice.* J Interferon Cytokine Res, 33, 254-60.

Dewitz C., Möller-Hackbarth K., Schweigert O., Reiss K., Chalaris A., Scheller J., Rose-John S. (2013): *T cell immunoglobulin and mucin domain 2 (TIM-2) is a target of A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) 10-mediated ectodomain shedding.* FEBS Journal. doi: 10.1111/febs.12583.

Möller-Hackbarth K., **Dewitz C.**, Schweigert O., Trad A, Garbers C, Rose-John S, Scheller J. (2013): *ADAM10 and ADAM17 are major sheddases of T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (Tim-3).* J Biol Chem. doi: 10.1074/jbc.M113.488478.

Schweigert, O., **Dewitz C.**, Möller-Hackbarth K., Trad A., Garbers C., Rose-John S. & Scheller J. (2013): *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.* BBA - Molecular Cell Research. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.11.014.

Poster Präsentationen:

Dewitz C., Braun O., Baier P.C., Schiffelholz T., Scheller J., Rose-John S. (2010): *Interleukin-6 Classic- and Trans-Signaling in Neuronal Plasticity.* Winter School „Plasticity Across Systems – Linking Neuronal, Immune and Metabolic Memory (SFB 654), Lübeck

Dewitz C., Reiss K., Rose-John S., Scheller J. (2012): *Ectodomain shedding of cell surface protein T cell Immunoglobulin and Mucin domain 2 (TIM-2) is mediated by ADAM10.* 1st International Symposium: Protease World in Health and Disease (SFB 877), Kiel

Dewitz C., Reiss K., Rose-John S., Scheller J. (2012): *ADAM10 is the major sheddase of cell surface protein T cell immunoglobulin and mucin domain 2 (TIM-2).* 35th Symposium of the North German Immunologists: Frontiers in Immunology, Borstel

8.3 Lebenslauf

Name: Christin Dewitz

Geburtsdatum: 16. September 1983

Geburtsort: Stendal, Deutschland

Familienstand: ledig

Bildungsweg

06/2009 – 06/2013	Anfertigung der Dissertation am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bei Prof. Dr. Rose-John mit dem Titel: <i>Die proteolytische Freisetzung des T Zell Immunglobulin- und Mucindomänen Proteins 2 (TIM-2) ist ADAM10-abhängig und wird durch Calmodulin beeinflusst</i>
3/2008 - 01/2009	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Virologie der Universität Leipzig bei Prof. Dr. C. Jassoy mit dem Titel: <i>Gewinnung von Herpesvirus-Proteinen zum Nachweis der spezifischen Gedächtnis-B-Lymphozyten-Antwort</i>
seit 10/2003	Studium der Biologie an der Universität Leipzig mit den Hauptfächern: Immunbiologie, Molekulare Medizin, Genetik und Biochemie (Abschluss: 01/2009, Note: 1,5)
07/2003	Allgemeine Hochschulreife (Winckelmann-Gymnasium, Stendal)

Praktika

02/2007 – 06/2007	Projektstudentin in der Immunbiologie an der Universität Leipzig bei Frau Prof. Dr. H. Hauschild mit dem Thema: <i>Bestimmung des oxidativen Burst und der Phagozytose humaner Monozyten</i>
11/2006 – 12/2006	Praktikantin am Max-Bürger-Zentrum Leipzig mit dem Thema: <i>Einführung einer Restriktionsschnittstelle im HIV-1 env-Gen zwischen den Leserastern für gp120 und gp41 durch gerichtete Mutation, Nachweis der Mutation und Analyse der Glykoprotein-Funktion</i>

8.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstütz haben.

Prof. Dr. Stefan Rose-John danke ich für die engagierte Betreuung und die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Promotion in seiner Arbeitsgruppe.

Prof. Dr. Jürgen Scheller danke ich für die fortwährende Unterstützung und Betreuung der Arbeit.

Ich möchte dem Zweitgutachter danken für sein Interesse an meiner Arbeit und seiner Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.

Prof. Dr. Karina Reiss danke ich für die Zusammenarbeit und Hilfe bei der Transfektion von MEFs.

Dr. Ahmad Trad danke ich für die Unterstützung bei der Produktion von Antikörpern.

Auch bei allen anderen Arbeitskollegen – namentlich Katja Möller-Hackbart, Olga Schweigert, Eva Wagener und Timo Effenberger – möchte ich mich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft sowie Unterstützung im Arbeitsalltag bedanken.

Ein weiteres Dankeschön ist an meinen Partner Emanuel, meine Eltern, Verwandte und Freunde gerichtet, die mir stets Geborgenheit und liebevollen Rückhalt vermitteln.

8.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Christin Dewitz, 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. Die Arbeit erfolgte unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Diese Dissertation wurde bisher an keiner anderen Fakultät vorgelegt.

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

Für die mündliche Prüfung wähle ich die Form der Disputation.

Kiel, 08. Januar 2014

Christin Dewitz