

**Molekulare Grundlagen der proteolytischen  
Spaltung von Tim-1 und Tim-4  
durch ADAM-Proteasen**

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

vorgelegt von

**Olga Schweigert, geb. Braun**

Kiel, 2014

Erster Gutachter: Prof. Dr. Stefan Rose-John

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2014

Zum Druck genehmigt: Kiel, 07.07.2014

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

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Familie der <i>T cell Immunoglobulin and Mucin domain</i> (Tim) Proteine .....	1
1.2 Liganden von Tim-1 und Tim-4.....	3
1.3 Die Rolle von Tim-1 im Immunsystem.....	6
1.4 Die Bedeutung von Tim-1 bei Nierenerkrankungen.....	8
1.5 Die Rolle von Tim-4 im Immunsystem.....	10
1.6 Lösliche Tim-Proteine .....	13
1.7 Proteolytische Prozessierung von membranständigen Proteinen ( <i>Ectodomain Shedding</i> ) .....	14
1.7.1 ADAM10 .....	17
1.7.2 ADAM17 .....	18
1.8 Ziel dieser Arbeit.....	19
<b>2 Material .....</b>	<b>20</b>
2.1 Geräte .....	20
2.2 Verbrauchsmaterial.....	21
2.3 Chemikalien.....	21
2.4 Medien und Lösungen .....	22
2.5 Medien und Lösungen für Zellkultur .....	25
2.6 Kits .....	26
2.7 Plasmide, Primer und siRNA .....	26
2.8 Größenmarker .....	27
2.9 Antikörper, Enzyme und Proteine.....	28
2.10 Inhibitoren.....	29
2.11 Bakterienstämme, Zelllinien und Mausstämme .....	29
<b>3 Methoden .....</b>	<b>30</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	30
3.1.1 Synthese der cDNA.....	30
3.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	31
3.1.3 SOE-PCR (Splicing by overlap extension PCR) .....	32
3.1.4 Präparation von Vektor und Insert durch Restriktion.....	32
3.1.5 Agarose Gelelektrophorese .....	33
3.1.6 Ligation der DNA-Fragmente .....	33
3.1.7 Transformation der Bakterien .....	33
3.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten <i>E.coli</i> Bakterien.....	34
3.2 Zellbiologische Methoden.....	35
3.2.1 Subkultivierung von Zelllinien .....	35
3.2.2 Kryokonservierung von Zellen .....	35

3.2.3 Transfektion .....	35
3.2.4 Transfektion mit siRNA.....	36
3.2.5 Experimente zur Induktion der proteolytischen Spaltung .....	36
3.2.6 Isolierung humaner PBMCs aus peripherem Blut.....	37
3.2.7 Isolierung humaner CD14+ Zellen.....	37
3.2.8 Generierung humaner Makrophagen aus den Monozyten .....	38
3.2.9 Invasionsassay .....	38
3.3 Herstellung der Antikörper .....	40
3.3.1 cDNA-Klonierung, bakterielle Expression und Reinigung der Tim-4-IgV-Domäne .....	40
3.3.2 Immunisierung und Generierung von Hybridomzellen .....	41
3.3.3 Reinigung der anti-Tim-4 Antikörper.....	42
3.3.4 Antikörper-Biotinylierung .....	43
3.4 Biochemische Methoden .....	43
3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	43
3.4.2 Western Blot.....	43
3.4.3 Alkalische Phosphatase Assay .....	44
3.4.4 Durchflusszytometrie.....	44
3.4.5 Immunfluoreszenzfärbung.....	45
3.4.6 Antikörper-Screen ELISA .....	45
3.4.7 Phospholipid-ELISA .....	46
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
4.1 Generierung der Expressionsplasmide für Tim-1 und Tim-4.....	47
4.2 Herstellung der gegen Tim-4 gerichteten monoklonalen Antikörper.....	49
4.3 Induzierte proteolytische Freisetzung von löslichem Tim-1 und Tim-4 durch ADAM-Proteasen .....	51
4.4 Induzierte Generierung löslicher AP-Tim-1 und AP-Tim-4 Proteine durch ADAM-Proteasen .....	53
4.5 Die intrazellulären Domänen von Tim-1 und Tim-4 haben keinen Einfluss auf ADAM-vermitteltes <i>Shedding</i> .....	58
4.6 Untersuchungen zur ADAM-Spaltregion von Tim-1 und Tim-4 .....	59
4.7 Proteolytische Spaltung der Ektodomäne von endogenem Tim-1 in 769-P Zellen ..	64
4.8 Matrix Metalloproteinase 3 ist nicht in das Ionomycin- und PMA-induzierte <i>Shedding</i> von Tim-1 involviert .....	66
4.9 Expression und Analyse der proteolytischen Spaltung der Tim-4 Ektodomäne in humanen Makrophagen .....	67
4.10 Lokalisation von Tim-4 in humanen Makrophagen .....	70
4.11 Lösliche Tim-1 und Tim-4 Proteine binden an Phosphatidylserin .....	73
4.12 Induktion des ADAM-vermittelten Tim-1 <i>Shedding</i> korreliert mit einem erhöhten Invasionsverhalten von 769-P Zellen .....	75

<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>77</b>
5.1	ADAM10 und ADAM17 sind die Tim-1 und Tim-4 spaltende Proteasen .....	77
5.2	ADAM-Spaltregion von Tim-1 und Tim-4 und der Einfluss der ICD auf das <i>Shedding</i> von Tim-1 und Tim-4 .....	79
5.3	<i>Shedding</i> von endogenem Tim-4 auf Makrophagen wird durch ADAM17 vermittelt .....	80
5.4	Lösliche Tim-1 und Tim-4 Proteine binden an Phosphatidylserin .....	81
5.5	Der Invasionsprozess einer Nierenkrebszelllinie korreliert mit Tim-1 <i>Shedding</i> .....	83
5.6	Physiologische Relevanz des ADAM-vermittelten Tim-1 und Tim-4 <i>Sheddings</i> .....	84
5.7	Ausblick.....	86
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>102</b>
9.1	Plasmidkarten und schematische Darstellungen der Klonierung.....	102
9.2	Abbildungsverzeichnis .....	108
9.3	Tabellenverzeichnis.....	108
9.4	Abkürzungsverzeichnis .....	109
9.5	Publikationen .....	112
9.6	Lebenslauf .....	113
9.7	Danksagung .....	114
9.8	Eidesstattliche Erklärung .....	115

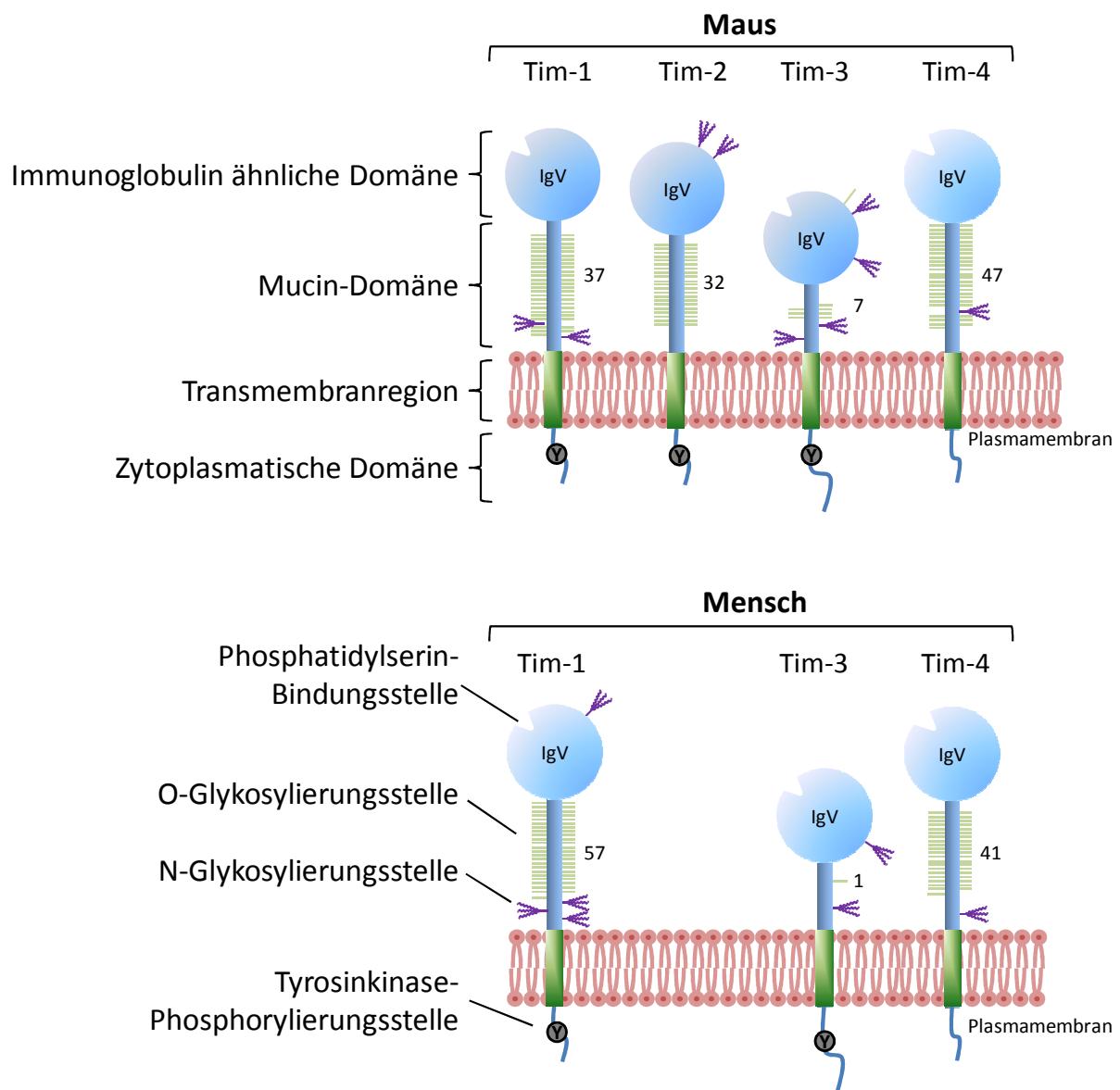
## 1 Einleitung

### 1.1 Die Familie der *T cell Immunoglobulin and Mucin domain (Tim) Proteine*

Das erste entdeckte Mitglied der Tim (*T cell Immunoglobulin and Mucin domain*) Protein-Familie war Tim-1. Es wurde zunächst als Hepatitis A Virus Zellulärer Rezeptor 1 (HAVCR-1) in Nierenzellen der Grünmeerkatzen, AGMK-Zellen (*African Green Monkey Kidney cells*) [1], und später auch beim Menschen entdeckt [2].

Weitere Mitglieder der Tim-Familie wurden bei der Suche nach Asthma-Suszeptibilitätsgenen entdeckt. In dieser Studie wurden kongene Mäuse, durch Kreuzung von DBA/2-Mäusen (resistent gegen Induktion allergischer Atemwegserkrankungen) mit BALB/c-Mäusen (sensitiv für die Induktion allergischer Atemwegserkrankungen) generiert [3]. Ein Lokus des Chromosoms 11 von DBA/2 Mäusen verlieh den BALB/c Mäusen die Resistenz gegen allergische Atemwegserkrankungen. Diese Region wurde als Tapr (*T-cell and Airway Phenotype Regulator*) bezeichnet und enthielt vier konservierte Gene der Tim-Familie (*Tim-1* bis *-4*). Beim Menschen wurden drei orthologe Gene der Tim-Familie (*Tim-1*, *Tim-3* und *Tim-4*) in einer mit der Asthma-Sensitivität assoziierten Region innerhalb des Chromosoms 5 (5q23-5q35) identifiziert [3].

Tim-Proteine sind Typ-I-Transmembranproteine mit einer N-terminalen Immunglobulin V Domäne (IgV) gefolgt von einer stark glykosylierten Mucin-Domäne, einer einfachen Transmembranregion und einem intrazellulären Teil. Die zytoplasmatischen Domänen der humanen und murinen Tim-Proteine sind stark konserviert und enthalten, mit der Ausnahme von Tim-4, Tyrosinkinasephosphorylierungsstellen [4, 5] (Abb.1.1.1). Für Tim-1 wurden zwei Spleißvarianten der zytoplasmatischen Domäne beschrieben: Tim-1a ohne Phosphorylierungsmotiv wird hauptsächlich in der Leber, Tim-1b mit einem Phosphorylierungsmotiv wird dagegen hauptsächlich in der Niere exprimiert [6].



**Abb. 1.1.1 Schematische Darstellung der Struktur der Tim-Proteine**

T-Zell Immunglobulin und Mucin-Domäne (Tim) Proteine sind Typ-I-Transmembranproteine. Bei der Maus sind vier Mitglieder der Tim-Familie (Tim-1 bis -4) vorhanden und beim Menschen dagegen nur drei, Tim-2 fehlt. Am N-terminalen Ende der Tim-Proteine befindet sich die Immunglobulin-ähnliche Domäne (IgV), gefolgt von der Mucin-Domäne, einer Transmembranregion und einer zytoplasmatischen Domäne. Die IgV-Domäne enthält eine Phosphatidylserin-Bindungsstelle und die Mucin-Domäne ist unterschiedlich stark glykosyliert. Am stärksten glykosyliert sind Tim-1 und Tim-4, Tim-3 besitzt dagegen nur wenige Glykosylierungsstellen. In der zytoplasmatischen Domäne befindet sich bei Tim-1 und Tim-3 eine Tyrosinkinase-Phosphorylierungsstelle, welche dem Tim-4 Protein fehlt (nach Kuchroo 2003 [4]).

## 1.2 Liganden von Tim-1 und Tim-4

Für Tim-1 und Tim-4 wurde eine Reihe von Liganden beschrieben. Darunter sind Viren, Rezeptoren, Phospholipide und Kernproteine. Diese Vielfältigkeit erlaubt mehrere Liganden-abhängige Funktionen der Tim-Proteine. Trotz der erstaunlichen Diversität und der Vielfältigkeit der bereits bekannten Liganden wird vermutet, dass für Tim-1 und Tim-4 weitere noch unbekannte Liganden existieren. Im Weiteren werden die bis jetzt entdeckten Liganden von Tim-1 und Tim-4 beschrieben.

### Hepatitis A Virus

Der erste entdeckte Ligand von Tim-1 war das Hepatitis A-Virus (HAV) [1]. Interessanterweise stellte sich heraus, dass eine polymorphe Variante von Tim-1, mit einer Insertion von sechs Aminosäuren in der Mucin-Domäne (157insMTTVVP), das HAV sehr viel effizienter bindet als die kürzere Tim-1 Variante. Die Expression der 157insMTTVVP Tim-1-Variante in humanen NKT (*Natural Killer T cells*) Zellen erhöhte ihre Aktivität gegen HAV-infizierte Leberzellen im Vergleich zu der kürzeren Variante. Unter dem natürlichen selektiven Druck der HAV-Infektionen ist vermutlich die kürzere Tim-1 Variante entstanden, welche eine geringere Affinität zu HAV besitzt und dadurch eine gewisse Immunität gegen HAV-Infektionen verleiht [7]. Erstaunlicherweise entwickelt dieser Schutz gegen HAV-Infektionen eine Prädisposition für allergische Erkrankungen wie z.B. Asthma [7, 8]. Auch weitere Studien zeigten, dass der Polymorphismus im extrazellulären Teil von Tim-1 (hauptsächlich in der Mucin-Domäne) mit allergischen Erkrankungen und Störungen im Immunsystem assoziiert ist [8-11].

### Phosphatidylserin (PS)

PS ist ein Phospholipid, das normalerweise auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert ist und bei Induktion der Apoptose (programmierter Zelltod) auf die Außenseite der Zellmembran verlagert wird. PS auf apoptotischen Zellen ist ein Signal für die Aufnahme dieser Zellen durch Phagozyten [12, 13]. Als Rezeptoren von PS vermitteln Tim-1 und Tim-4 die Phagozytose apoptotischer Zellen [14-18]. Mit Tim-1 oder Tim-4 transfizierte murine Fibroblasten, erlangten die Fähigkeit, apoptotische Zellen zu phagozytieren, was durch Tim-1 oder Tim-4 Antikörper gehemmt werden konnte [14, 19]. Bei der Aufklärung der Struktur der

Tim-IgV-Domäne wurde bei Tim-1, Tim-3 und Tim-4 eine Phosphatidylserin-Bindungsstelle entdeckt und als MILIBS-Sequenz (*Metal Ion-dependent Ligand Binding Site*) bezeichnet. In der MILIBS-Sequenz wird eine kleine Vertiefung durch zwei  $\beta$ -Faltblätter (CC'- und FG-Schleifen) gebildet, in welcher der hydrophobe, negativ geladene Kopf von Phosphatidylserin (PS) mit Hilfe eines Metallions koordiniert wird [17, 20]. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um ein  $\text{Ca}^{2+}$  Ion, denn es konnte gezeigt werden, dass das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende EGTA (*Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*) die Bindung von Tim-3 an PS inhibiert. Zusätzlich interagieren die aromatischen Aminosäurereste der CC'- und FG-Schleifen mit den PS-Fettsäuren und inserieren dadurch in die Lipiddoppelschicht [21]. Tim-1 und Tim-4 besitzen im Gegensatz zu Tim-3 eine höhere Affinität für PS. Die strukturelle Grundlage dieser Affinitäts-Unterschiede liegt in der MILIBS-Sequenz. Tim-1 und Tim-4 haben ein identisches Aminosäuren-Motiv (WFND) innerhalb der FG-Schleife, während bei Tim-3 die Aminosäuren WF durch LM substituiert sind (LMND-Motiv). Diese Substitution resultiert in einer reduzierten Bindung von Tim-3 mit PS. Dem murinen Tim-2 fehlt die Aminosäuresequenz WFND in der FG-Schleife. Dies erklärt, warum Tim-2 nicht fähig ist, an PS zu binden [21].

### Tim-1, Tim-3 und Tim-4

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass neben dem Phosphatidylserin, oxidiertes LDL (*Low Density Lipoprotein*) [22], die schwere Kette von Immunglobulin-a [23], Tim-1 selbst [17, 24] sowie Tim-3 [24] und auch Tim-4 [25] fähig sind, mit Tim-1 zu interagieren. Bei den Interaktionsstudien von Tim-1 und Tim-4 wurden die löslichen Fusionsproteine Tim-1-Fc und Tim-4-Fc (Tim-1 und Tim-4 fusioniert mit der Fc-Region eines humanen IgG<sub>1</sub>) eingesetzt und die Bindung mittels Durchfluszytometrie analysiert. Tim-4-Fc assoziierte mit CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary cells*), die Tim-1, aber nicht Tim-3 oder Tim-2 exprimierten. Auch umgekehrt konnte gezeigt werden, dass Tim-1-Fc lediglich an Zellen bindet, die Tim-4, nicht aber Tim-3 oder Tim-2 exprimieren [25]. Eine direkte Interaktion von Tim-1 und Tim-4 konnte bis jetzt nicht nachgewiesen werden [26, 27]. Später wurde gezeigt, dass diese homophilen und heterophilen Interaktionen zwischen den Tim-Proteinen indirekt über eine Bindung an zwei verschiedene PS auf Exosomen erfolgen [28]. Exosomen sind 50-100 nm große, PS-tragende Mikrovesikel, die von verschiedenen Zelltypen durch Einschnüren der Zellmembran gebildet und in den extrazellulären Raum sezerniert werden [29]. Mittels Elektronenmikroskopie wurde festgestellt, dass Exosomen an Zellen, die Tim-1 oder Tim-4

exprimieren, binden. Tim-4-Fc oder Tim-1-Fc assoziierten mit Tim-1 oder Tim-4 exprimierenden Ba/F3 B-Zellen, und diese Bindung wurde durch die Zugabe von Annexin V (ein PS-bindendes Protein) kompetitiv gehemmt [28]. Da Tim-3 eine geringere Affinität zu PS aufweist als Tim-1 oder Tim-4 [21], könnte dies erklären, warum Tim-1-Fc und Tim-4-Fc nicht an Tim-3 exprimierende Zellen gebunden haben [25].

### Filoviren

Weitere Studien haben gezeigt, dass Tim-1 auch ein Rezeptor für die Filoviren, wie das Ebolavirus (EBOV) und das Marburgvirus (MARV), ist [30]. Tim-1 bindet direkt an ein virales Glycoprotein (GP-1), welches die Fusion zwischen der viralen und der Wirtsmembran vermittelt. Eine Blockade von Tim-1 mittels antagonistischer Antikörper hemmte dosisabhängig die Transduktion von Zellen mit EBOV und MARV [30]. Eine weitere Studie zeigte, dass eine Transduktion mit Filoviren über die Bindung von Tim-1 an PS der Virenhülle erfolgt. Dabei wird das Viruspartikel, ähnlich wie bei der Phagozytose apoptotischer Zellen, in die Zelle aufgenommen [31].

### LMIR5

Ferner wurde LMIR5 (*Leukocyte Mono-Ig-like Receptor 5*) als ein Ligand von Tim-1 und Tim-4 beschrieben [32]. LMIR5 ist ein Rezeptor, welcher auf Immunzellen (Mastzellen, Makrophagen, Neutrophilen, Dendritische Zellen (DCs)) exprimiert wird und an ihrer Aktivierung zur Zytokinproduktion, Zellüberleben sowie Adhäsion an der extrazellulären Matrix beteiligt ist. Eine Stimulation von LMIR5<sup>+</sup> Mastzellen mit Tim-1-Fc oder Tim-4-Fc führte zur Aktivierung von Mastzellen, was sich in erhöhter Phosphorylierung von ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) und der Induktion der IL-6 (Interleukin-6)-Produktion äußerte [32].

### Kernprotein NUR77

Mittels eines *Yeast-two-Hybrid*-Systems, mit welchem Tim-1 IgV-Interaktionspartner gesucht wurden, wurde ein weiterer Tim-1-Ligand entdeckt. Dabei handelte es sich um NUR77 (*NUR response element transcription factor 77*), einem Nuklearrezeptor, welcher T-Zellproliferation, Differenzierung, Überleben sowie den Tod von Zellen reguliert [33, 34]. Mittels Immunpräzipitation wurde gezeigt, dass alle drei humanen Tim-Proteine an NUR77

binden. Außerdem wurde nachgewiesen, dass NUR77 mit der extrazellulären Immunglobulindomäne von Tim-1 interagiert [37]. Eine Bindung zwischen einem Kernprotein und Oberflächenrezeptoren ist sehr ungewöhnlich und war überraschend. Die Studie zeigte, dass die Interaktion zwischen den Proteinen im Zytosol stattfindet [37]. Obwohl NUR77 ein Kernprotein ist, haben mehrere Studien gezeigt, dass NUR77 hauptsächlich im Zytosol vorliegt [34-36]. Erst nach einer Hyperphosphorylierung wird NUR77 in den Nukleus transportiert [36]. Interessanterweise wurde festgestellt, dass Tim-1 einer dynamischen Translokation durch Endozytose und anschließender Exozytose zurück zur Zelloberfläche unterliegt. Dabei findet die Interaktion zwischen NUR77 und TIM-Proteinen in den intrazellulären Vesikeln statt, was zu einer lysosomalen Degradierung des NUR77 Proteins führt, wobei die Tim-Proteine selbst nicht abgebaut werden [37]. Eine Translokation des zytosolischen NUR77 in die Mitochondrien induziert normalerweise Apoptose [38]. Die Interaktion von Tim-1 und NUR77 führt zum Abbau von zytosolischem NUR77, wodurch der programmierte Zelltod verhindert werden konnte [37].

## 1.3 Die Rolle von Tim-1 im Immunsystem

Tim-1 wird hauptsächlich auf Immunzellen, wie aktivierten T-Zellen [39], regulatorischen B-Zellen ( $B_{reg}$ ) [40, 41], Mastzellen [42], NKT (*Natural Killer T cells*) [43] und Dendritischen Zellen [44] exprimiert. Nach T-Zell-Differenzierung wird Tim-1 vorzugsweise auf den Typ-2-T-Helferzellen (Th2) und nicht auf Typ-1-T-Helferzellen (Th1) exprimiert [39]. Diese Vielfalt von Tim-1<sup>+</sup> Immunzellen deutet auf eine bedeutende Rolle des Proteins bei der Regulation des Immunsystems hin. In der Tat wurde Tim-1 mit vielen Autoimmunerkrankungen wie atopischer Dermatitis [45], Allergie [46], rheumatoider Arthritis [47], Asthma [48] und systemischem Lupus Erythematoses [49] in Verbindung gebracht.

Eine der meist untersuchten Funktionen von Tim-1 ist seine kostimulatorische Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen [25, 39, 50]. Eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung, welche zur Expansion und Differenzierung der T-Zellen führt, erfordert zwei unabhängige Signale: Bindung des T-Zellrezeptors an Antigene welche durch APCs (*Antigen Presenting Cells*) auf dem MHC-Komplex (*Major Histocompatibility Complex*) präsentiert werden und die Interaktion von kostimulatorischen Rezeptoren der T-Zellen mit ihren Liganden auf den

APCs. Bei Abwesenheit von kostimulatorischen Signalen wird die Immunantwort gegen die präsentierten Antigene nicht ausgelöst. Außerdem wird eine Unempfindlichkeit (Immuntoleranz) gegenüber dieser Antigene hervorgerufen [51-53].

Experimentell können naive T-Zellen Antigen-unspezifisch mittels anti-CD3/CD28 Antikörper (gerichtet gegen die *Cluster of Differentiation (CD) 3/28*) aktiviert werden. Eine zusätzliche Stimulation von Tim-1 mittels agonistischen Antikörper führte zu einer signifikant erhöhten T-Zellproliferation und Zytokinproduktion der T-Zellen. *In vivo* verstärkte die Tim-1 Aktivierung mit dem agonistischen Antikörper die Immunisierung von Mäusen mit einem Antigen, wobei antigenspezifische T-Zellen expandierten und die Zytokinproduktion anstieg [39]. Eine Hochregulation der Tim-1-Expression in primären T-Zellen oder Jurkat T-Zellen führte zu einer erhöhten IL-4 Produktion und zu einer Aktivierung von NFAT/AP-1 (*Nuclear Factor for Activation of T-cells / Activator Protein 1*) Elementen, was Merkmale einer T-Zell-Aktivierung sind [27, 50]. Dabei zeigte sich, dass Tim-1 auf der Zelloberfläche von Jurkat T-Zellen mit dem CD3 (*Cluster of Differentiation 3*) Komplex, einer Komponente des T-Zellrezeptors, welcher für die Signalweiterleitung verantwortlich ist, assoziiert [27].

In Tim-1-defizienten oder transgenen Mäusen, bei welchen Tim-1 überexprimiert ist, wurden keine Defekte im zellulären Phänotyp festgestellt. Die B-Zell- sowie T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion bei einer Th2-Antwort wurden ebenfalls nicht durch Defizienz oder Überexpression von Tim-1 beeinflusst [54, 55]. Interessanterweise entwickelten transgene Mäuse mit einer Tim-1 Variante, welcher die Mucindomäne fehlt (Tim-1<sup>ΔMucin</sup>), im Alter von ungefähr zehn Monaten Autoimmunerkrankungen. Diese äußerten sich in hyperaktivierten T-Zellen, erhöhter Th1-Immunantwort, aktivierten Dendritischen Zellen und erhöhten Mengen an Immunglobulinen im Serum, sowie vermehrter Entwicklung von Autoantikörpern und anti-dsDNA (Doppelstrang-DNA) Antikörpern [40]. Diese Wirkung erfolgte durch die Beeinträchtigung der regulatorischen B-Zellen ( $B_{regs}$ ) in ihrer Funktion IL-10 zu produzieren.  $B_{regs}$  sind essentiell für die Induktion der Immuntoleranz durch negative Regulation von Immunantworten mittels IL-10-Produktion. Sie agieren als positive Regulatoren von Immunantworten durch die Antigenpräsentation für die optimale T-Zell Aktivierung [56]. Tim-1 wird auch auf regulatorischen B-Zellen ( $B_{regs}$ ) exprimiert und wird als Marker für diese Zellen diskutiert [40, 41].

Die Rolle von Tim-1 bei der Regulation der peripheren Immuntoleranz wurde durch Transplantationsstudien in Mäusen untersucht. Es zeigte sich, dass ein agonistischer Tim-1 Antikörper zu einer Abstoßung von allogenen Transplantaten führte, indem die periphere Toleranz unterdrückt wurde. Dabei wurde eine Expansion von Th1- und Th17-Zellen und gleichzeitig eine Hemmung der Entwicklung regulatorischer T-Zellen ( $T_{regs}$ ) induziert [57].  $T_{regs}$  regulieren die Immuntoleranz indem sie die Expansion von antigenspezifischen T-Zellen supprimieren. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass eine Blockade von Tim-1 durch einen antagonistischen Antikörper das Überleben von Mäusen nach einer allogenen Herztransplantation verlängerte. Dabei wurde  $T_{regs}$ -abhängige periphere Toleranz induziert und die alloreaktive Th1-Immunantwort supprimiert [58]. Interessanterweise führte eine Behandlung mit löslichem Tim-1-Fc ebenfalls zum verlängerten Überleben von Mäusen nach einer allogenen Herztransplantation. Dies war assoziiert mit supprimierter Th1-Antwort und erhöhten Th2-Antwort, sowie erhöhter Anzahl von  $T_{regs}$  in der Milz. Später wurde festgestellt, dass das lösliche Tim-1-Fc Fusionsprotein hemmend auf die T-Zell-Aktivierung und Proliferation wirkt [59].

Tim-1 scheint demnach eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Immunantworten und der peripheren Immuntoleranz zu spielen. Die genauen Wirkmechanismen sind bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt. Möglicherweise sind weitere Tim-1 Liganden auf den Immunzellen vorhanden, deren Identifizierung zum besseren Verständnis der Tim-1 Funktion im Immunsystem beitragen würde.

### 1.4 Die Bedeutung von Tim-1 bei Nierenerkrankungen

Tim-1 wird auf vielen Nierenkarzinomzelllinien exprimiert [30, 60, 61], auch auf der Nierenzelllinie AGMK (*African Green Monkey Kidney*) [1] aber nicht in der humanen, embryonalen Nierenzelllinie HEK293 [6]. Normalerweise ist Tim-1 in der Niere nicht detektierbar. Erst nach einem akuten Nierenschaden kommt es zu einer Hochregulation der Tim-1 Expression auf renalen, proximalen Tubulusepithelzellen, PTECs (*Proximal Tubular Epithelial Cells*), in Ratte, Maus und Mensch. Tim-1 wurde deswegen zunächst als KIM-1 (*Kidney Injury Molecule-1*) beschrieben [62, 63]. Auch bei Nierenzellkrebs [64, 65] und bei

der polyzystischen Nierenerkrankung [63] dient die Hochregulation der Tim-1-Expression als Indikator der Erkrankung. Interessanterweise wurde nach einem akuten Nierenschaden eine erhöhte Konzentration von löslichem Tim-1 im ausgeschiedenen Urin nachgewiesen. Diese Freisetzung wird durch proteolytische Spaltung der Tim-1 Ektodomäne durch Metalloproteasen vermittelt [6, 66]. Die lösliche Tim-1 Variante wird in den Urin abgesondert und ist mittlerweile ein klinischer Biomarker für akute Nierenerkrankungen sowie für den Nierenzellkrebs [60, 64, 67, 68].

Das Epithel des renalen proximalen Tubulus wird bei vielen Nierenerkrankungen beeinträchtigt [69]. Ein häufig eingesetztes Modell zur Untersuchung von ischämischem oder toxischem Schaden im proximalen Tubulusepithelien ist das Ischämie-/Reperfusionsmodell, IRI (*Ischemia Reperfusion Injury*). In diesem Modell wird die Blutzufuhr zur Niere oder einem anderen Organ (z.B. Leber) durch Abklemmen der Nierenvene unterbrochen und nach ungefähr 30-45 min. wird das Organ wieder mit dem Blut reperfundiert. Diese Prozedur führt zu einem verminderten Blutfluss und zur Beeinträchtigung des Nierenepithels durch Nekrose und Apoptose von proximalen Tubulusepithelzellen (PTECs). Anschließend erfolgt eine Regeneration des Nierenepithels. Das Nierenepithel wird regeneriert, indem die intakten PTECs sich in Makrophagen-ähnliche Zellen differenzieren, zu den Stellen der apoptotischen und nekrotischen PTECs migrieren und diese phagozytieren. Diese Fähigkeit der PTECs wird hauptsächlich durch die Überexpression von Tim-1 vermittelt [70]. Anschließend dedifferenzieren die Phagozyten-PTECs in neue PTECs, setzen sich an der geschädigten Stelle fest und proliferieren. Dadurch wird ein neues funktionstüchtiges proximales Tubulusepithelium gebildet [71, 72]. Studien mit einer Nierenepithelzelllinie LLC-PK1 (*Pig Kidney Epithelial Cell Line*) zeigten eindeutig, dass die phagozytierende Fähigkeit dieser Zellen von der Tim-1 Expression abhängig ist [70]. Eine andere Studie zeigte, dass die TIM-1 Expression in LLC-PK1 Zellen zur erhöhten Expression von HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), einem Nieren-Reparaturfaktor, führt [73]. Tim-1 ist also nicht nur in die Beseitigung von toten Zellen involviert, sondern vermittelt auch Regenerations-Mechanismen [74].

## 1.5 Die Rolle von Tim-4 im Immunsystem

Im Gegensatz zu anderen Tim Proteinen wird Tim-4 ausschließlich auf antigenpräsentierenden Zellen, APCs (*Antigen Presenting Cells*), exprimiert [14, 25]. Tim-4 Expression wurde auf residenten peritonealen Makrophagen (rPMs), marginalen metallophilen Makrophagen, Sternhimmelmakrophagen [75, 76], auf aktivierten DCs (*Dendritic Cells*) sowie auf peritonealen B-1-Zellen [16, 77] nachgewiesen.

Einige Studien haben gezeigt, dass Tim-4, ähnlich wie Tim-1, kostimulierend auf die Aktivierung von T-Zellen wirkt. Diese Untersuchungen haben jedoch widersprüchliche Ergebnisse geliefert. Es ist nicht ganz eindeutig ob Tim-4 stimulierend oder hemmend auf die T-Zell-Aktivierung wirkt. Die mit anti-CD3/CD28 aktivierten T-Zellen expandierten, wenn sie zusammen mit Tim-4<sup>+</sup> CHO-Zellen kultiviert wurden. Außerdem wurde eine erhöhte Produktion von IFN- $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ) und TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) in den T-Zellen induziert. Zusätzlich wurde beobachtet, dass eine Behandlung mit löslichem Tim-4-Fc Fusionsprotein zusammen mit CD3/CD28 Antikörpern ebenfalls zur T-Zellproliferation und einer erhöhten Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  führte [25, 77]. Dabei äußerte sich die intrazelluläre Signalübertragung der Tim-4-Fc Stimulation in der Aktivierung von Faktoren, welche das Überleben der Zelle fördern und Apoptose verhindern, wie Proteinkinase B, Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) und ERK. Zusätzlich wurde eine Phosphorylierung von endogenem Tim-1 festgestellt [77]. Weiterhin wurde gezeigt, dass Tim-4-Fc, in hohen Konzentrationen, zusammen mit CD3/CD28 Antikörpern die Expansion von T-Zellen *in vitro* fördert. Geringere Konzentrationen von Tim-4-Fc führten dagegen zu einer Hemmung der mittels CD3/CD28 Antikörpern induzierten T-Zellproliferation. *In vivo* induzierte das Tim-4-Fc Fusionsprotein T-Zell-Hyperproliferation und Zytokinproduktion in immunisierten Mäusen [25]. In beiden Studien wurde der kostimulatorische Effekt von Tim-4-Fc in Zusammenhang mit der Bindung von Tim-4 an Tim-1 gebracht. Eine direkte Bindung der Proteine konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die kostimulatorische Wirkung von Tim-4 könnte über einen anderen Liganden als Tim-1 erfolgen. Es wurde beschrieben, dass Tim-4-Fc hemmend auf die T-Zell-Proliferation wirkt und dies nicht über die Bindung an Tim-1 erfolgt, da der Tim-1 Antikörper die hemmende Wirkung von Tim-4 nicht beeinflusste [78]. Eine weitere Studie bestätigte, dass Tim-4 an

naive T-Zellen bindet, welche kein Tim-1 exprimierten. In dieser Studie stellte man fest, dass das Tim-4-Fc Fusionsprotein die Proliferation naiver T-Zellen inhibierte und keine Wirkung auf die Proliferation aktiver T-Zellen hatte [75]. Diese widersprüchlichen Ergebnisse können dadurch zustande kommen, dass eine natürliche Funktion von Tim-4 nicht nachgeahmt werden konnte. Tim-4 bindet an PS auf apoptotischen Zellen und vermittelt normalerweise Phagozytose. Eine *in vivo* Behandlung mit Tim-4-Fc könnte zu einer Opsonierung apoptotischer Zellen durch Tim-4-Fc führen. Infolgedessen würde eine verstärkte Immunreaktion mit Hyperproliferation von T-Zellen erfolgen [79].

Tim-4 defiziente Mäuse weisen keine Unterschiede in der Entwicklung, Zelldichte und dem Aktivierungsstatus der T- und B-Zellen sowie von DCs im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen auf [76, 77]. Interessanterweise war der homeostatische Zustand von rPMs bei den Tim-4<sup>-/-</sup> Mäusen verändert, charakterisiert durch eine erhöhte Zellzahl, gesteigerte basale TNF- $\alpha$  Produktion und einer gedämpften Antwort auf eine LPS (Lipopolysaccharid)-Stimulation [76, 77]. Als Rezeptor für Phosphatidylserin vermittelt Tim-4 die Phagozytose apoptotischer Zellen und spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz (Selbst-Toleranz und Antigen-Toleranz) sowie bei der Regulation der T-Zell-Immunantworten [19, 80]. Phagozytose apoptotischer Zellen ist ein wichtiger Mechanismus zur wirkungsvollen Beseitigung toter Zellen aus dem Organismus, und ist kritisch für die Aufrechterhaltung der Integrität und Funktion der umliegenden Gewebe. Apoptotische Zellen, die nicht beseitigt werden, können eine sekundäre Nekrose entwickeln, während welcher Auto- und Neu-Antigene (z.B. dsDNA) freigesetzt werden. Diese Antigene können eine Autoimmunantwort (z.B. Bildung von anti-dsDNA-Antikörpern) auslösen [81, 82]. In Tim-4 defizienten Mäusen oder durch eine Blockade von Tim-4 mittels eines antagonistischen Antikörpers wurde eine stark reduzierte Aufnahme apoptotischer Zellen durch Makrophagen und B-1 Zellen festgestellt. Zudem wurden erhöhte Werte an anti-dsDNA-Antikörpern und Immunglobulinen (IgA, IgG2a, IgG2b) beobachtet, die ersten Anzeichen für eine Autoimmunreaktion [16, 28]. Die Rolle von Tim-4 bei der Beseitigung apoptotischer Zellen ist Zelltyp- und Gewebsspezifisch. In Tim-4 defizienten Mäusen war die Phagozytose apoptotischer Zellen im Peritonealraum (Bauchfellhöhle), aber nicht in der Milz verringert [16]. Auch im Keimzentrum der Lymphfollikel scheint Tim-4 keine Rolle für die Aufnahme apoptotischer Zellen zu spielen [76].

Ferner ist Tim-4 mit allergischen Erkrankungen assoziiert. Sechs polymorphe Sequenzen in humanem Tim-4 korrelierten mit einer Immunität gegen atopische Dermatitis [45]. In asthmatischen Mäusen war die Tim-4-Expression in den DCs der Darmschleimhaut hochreguliert. Durch eine Vorbehandlung dieser Mäuse mit einem antagonistischen Tim-4 Antikörper konnte die allergische Reaktion deutlich reduziert werden [83].

Allergien werden meistens durch Fremd-Antigene ausgelöst. Bei den Atemwegserkrankungen, wie Asthma, werden harmlose Fremd-Antigene durch Inhalation aufgenommen. Diese Antigene werden durch die Alveolarmakrophagen in der Lunge aufgenommen und prozessiert. Dann migrieren die Makrophagen zu den Lymphknoten und präsentieren dort die Antigene den T-Zellen, welche daraufhin zu klonaler Expansion angeregt werden. Anschließend erfolgt die negative Selektion des größten Teils dieser antigenspezifischen T-Zellen, um eine Immuntoleranz gegen harmlose Antigene aufrecht zu erhalten [84-86]. Dabei gibt es drei Möglichkeiten: Apoptose und sofortige Beseitigung durch Makrophagen, Anergie oder die Suppression durch regulatorische T-Zellen. Es wurde gezeigt, dass Tim-4 in den Prozess der klonalen Eliminierung antigenspezifischer T-Zellen involviert ist [19, 87]. Eine Hemmung von Tim-4 durch einen antagonistischen Antikörper während der Immunisierung der Mäuse mit einem Antigen oder einer Infektion mit Influenza A Viren führte zur Hyperproliferation antigenspezifischer T-Zellen. In Tim-4 transgenen Mäusen ( $\text{Tim-4}^+ \text{-APCs}$ ) war die sekundäre T-Zellantwort bei asthmatischen Mäusen dagegen deutlich reduziert. Dies erfolgte durch die erhöhte Phagozytose antigenspezifischer T-Zellen durch  $\text{Tim-4}^+$  Makrophagen. Es wurde festgestellt, dass die Anzahl antigenspezifischer T-Zellen deutlich reduziert war. Die Suppression der T-Zellproliferation durch  $\text{T}_{\text{regs}}$  konnte ausgeschlossen werden, da ihre Anzahl nicht erhöht war [19]. In einer weiteren Studie konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass  $\text{Tim-4}^+$ -Makrophagen antigenspezifische T-Zellen phagozytieren und so die Depletion antigenspezifischer T-Zellen regulieren [19, 87].

## 1.6 Lösliche Tim-Proteine

Eine lösliche Tim-1 Variante wird in den Urin abgesondert und ist ein klinischer Biomarker für akute Nierenerkrankungen sowie für Nierenzellkrebs [60, 64, 67, 68]. Die Expression und Freisetzung des löslichen Tim-1 durch proteolytische Spaltung (*Shedding*) wurde in der Nierenkarzinomzelllinie 769-P und einer immortalisierten PTEC Zelllinie HK-2 untersucht. Das *Shedding* des Tim-1 Proteins wurde mittels Phorbolester PMA (*Phorbol-12-Myristate-13-Acetate*) induziert und durch Metalloproteasebreitbandinhibitoren (BB-94, GM6001) gehemmt [6]. Aufgrund der hemmenden Wirkung der Metalloproteasebreitbandinhibitoren wurde vermutet, dass Tim-1 durch Metalloproteasen gespalten wird, die vermutlich zur Familie der ADAM (*A Desintegrin And Metalloproteinases*) oder der MMP (*Matrix Metalloproteinases*) gehörten [6, 66]. Die Spaltung der Tim-1 Ektodomäne konnte durch einen Antikörper gehemmt werden, welcher an einer Sequenz in der Mucin-Domäne nahe der Transmembran-Domäne bindet [6]. Durch eine Deletion dieser Aminosäuresequenz ( $\Delta 278-283$  FLEHSLL) konnte eine unspaltbare Tim-1 Variante erstellt werden [66]. Bei der Analyse der biochemischen Mechanismen, die zur proteolytischen Spaltung der Tim-1 Ektodomäne führen, wurde entdeckt, dass ein Inhibitor von Tyrosinphosphatasen (Pervanadat) das *Shedding* von Tim-1 verstärkt induziert. Die Spaltung von Tim-1 wird durch Metalloproteasen vermittelt und durch MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) reguliert [66]. Eine weitere Studie an primären humanen PTECs zeigte *in vitro*, dass lösliches Tim-1 nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  und humanem Serumalbumin freigesetzt wird. Es konnte nachgewiesen werden, dass die proteolytische Freisetzung der Tim-1 Ektodomäne durch die Matrixmetalloprotease 3 (MMP-3) vermittelt wird [88].

Es ist wenig über die physiologischen Konsequenzen des Tim-1 *Sheddings* bekannt. In Nierenzellkarzinomen wurde festgestellt, dass erhöhtes *Shedding* von Tim-1 ein Zeichen für aggressivere Tumore darstellt, die zu Metastasen führen (Freeman Grade III und IV). *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die Invasionsfähigkeit einer Nierenkarzinomzelllinie (786-O) durch erhöhtes *Shedding* von Tim-1 um ein vielfaches steigert [64].

Zu löslichem Tim-4 gibt es bislang keine Studien. Untersuchungen mit einem Tim-4-Fc Fusionsprotein deuten darauf hin, dass auch lösliches Tim-4 eine biologische Aktivität haben könnte. Interessanterweise ist die Oberflächenexpression von Tim-4 auf peritonealen Makrophagen nach einer Behandlung der Mäuse mit Thioglycolat dramatisch reduziert (von 70% auf 10%) [76]. Bei diesen Makrophagen wurde eine vermehrte Hochregulation der MFG-E8 (*Milk Fat Globule-EGF factor 8*) Expression festgestellt, welches durch Opsonierung apoptotischer Zellen ihre Phagozytose vermittelt [76, 89]. Diese drastische Reduktion von Tim-4 könnte ein Indiz für die proteolytische Spaltung von Tim-4 infolge einer Immunantwort auf Thioglycolat sein.

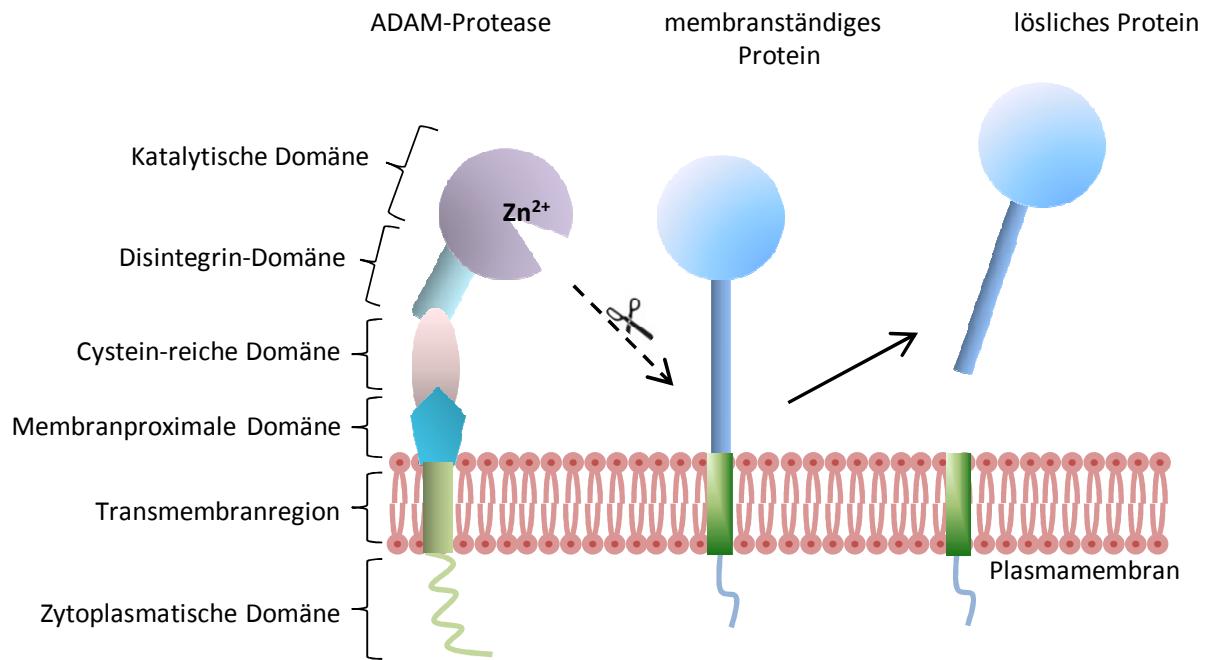
### **1.7 Proteolytische Prozessierung von membranständigen Proteinen (*Ectodomain Shedding*)**

Membranständige Oberflächenproteine können an der Juxtamembranregion durch Proteasen gespalten und dadurch freigesetzt werden. Neben den posttranskriptionalen Modifikationen von Proteinen wie beispielsweise Phosphorylierung und Glykosylierung spielt die proteolytische Spaltung eine wichtige physiologische Rolle und trägt beträchtlich zur Diversität der Proteinfunktionen bei. Proteolytische Prozessierung ist ein irreversibler Prozess, bei welchem Proteasen (auch *Sheddases* genannt) die extrazelluläre Region (Ektodomäne) membranständiger Proteine abspalten. Dabei entstehen lösliche Proteine, die in den extrazellulären Raum freigesetzt werden und zusätzliche Funktionen übernehmen können (Abb.1.7.1). Dieser Prozess wird als *Ectodomain Shedding* bezeichnet [90, 91] und ist ein wichtiger Mechanismus bei der Regulierung von zellulären Prozessen durch die Modifizierung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren. Zahlreiche Zytokine, wie zum Beispiel TNF- $\alpha$  [92] sowie Wachstumsfaktoren, wie TGF- $\alpha$  (*Transforming Growth Factor  $\alpha$* ) [93] werden zunächst als ein membranständiges Vorläuferprotein generiert und erst nach der proteolytischen Spaltung freigesetzt. Adhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel L-Selektin [94] und ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) [95] werden ebenfalls durch *Shedding* prozessiert, wodurch die Zellinteraktionen reguliert werden können. Des Weiteren kann durch die proteolytische Spaltung ein Protein inaktiviert werden. Nicht mehr benötigte Rezeptoren können schnell und effizient von der Zelloberfläche entfernt werden, wodurch die Responsivität der Zelle auf bestimmte Liganden

drastisch reduziert werden kann [90]. *Shedding* kann aber auch zur Aktivierung eines Proteins beitragen, wie im Falle des IL-6R (*Interleukin-6 Receptor*). Der lösliche IL-6-Rezeptor ist weiterhin fähig, seinen Liganden IL-6 zu binden und kann so andere Zellen aktivieren, die keinen IL-6R exprimieren [96, 97].

Die proteolytische Ektodomänenspaltung von membranständigen Proteinen wird in der Regel durch Metalloproteasen vermittelt. Metalloproteasen sind proteolytische Enzyme, welche die Hydrolyse einer Peptidkette katalysieren. Die Metalloproteasen enthalten in ihrem aktiven Zentrum ein Metallion, meistens Zink<sup>2+</sup> [98], und werden auch als Zink-abhängige Metalloproteasen bezeichnet. Die am besten charakterisierten Metalloproteasen sind ADAM (*A Desintegrin and Metalloproteinases*) und Matrix-Metalloproteasen (MMPs), welche neben den Astacinen und Serralysinen zu der Familie der Metzinkine gehören und in die Untergruppe Adamlysine eingeteilt sind [99].

ADAM-Proteasen sind Typ I Transmembranproteine und bestehen aus einer Prodomäne, Metalloproteinasedomäne (auch katalytische Domäne genannt), einer Disintegrindomäne, einer cysteinreichen Domäne, einer membranproximalen Domäne (MPD), einer Transmembranregion und einer zytoplasmatische Domäne (Abb. 1.7.1) [100, 101]. Beim Menschen wurden 22 und im murinen Genom 37 Gene, die für ADAM-Proteasen kodieren, gefunden. Nur etwa die Hälfte der menschlichen ADAM-Proteasen enthalten eine konservierte Sequenz (HEXXHXXGXXH) in der katalytischen Domäne, welche für die proteolytische Aktivität der Proteasen verantwortlich ist [99]. Die ADAM-Proteasen werden als inaktive Pro-Form generiert. Dabei sorgt die Prodomäne für den inaktiven Zustand, sowie für eine ordnungsgemäße Faltung des Proteins [102, 103]. Während des Transits durch den Golgi-Apparat erfolgt eine Aktivierung der Protease, indem die Prodomäne durch Furin-Proteasen abgespalten wird [101, 104, 105]. Die isolierte Prodomäne kann als ein sehr potenter und selektiver Inhibitor der Protease-Aktivität eingesetzt werden [106].



**Abb. 1.7.1 ADAM-vermitteltes *Ectodomain Shedding* eines transmembranen Proteins resultierend in der Freisetzung einer löslichen Variante**

Aktive ADAM-Proteasen bestehen, nach der Abspaltung ihrer Prodomäne, aus der katalytischen Domäne, Disintegrin-domäne, Cysteinreichen Domäne, membranproximalen Domäne, einer Transmembranregion und der zytoplasmatischen Domäne. Nach einer Aktivierung spaltet die Protease ihr Substrat an der Juxtamembranregion. Es entsteht anschließend lösliches Protein, welches in den extrazellulären Raum freigesetzt wird (nach Blobel 2005 [90]).

Die Aktivierung der Metalloproteasen kann experimentell durch Phorbolester (PMA) oder Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration durch den Einsatz des Kalziumionophors Ionomycin induziert werden [91, 107, 108]. Substrat- und zelltypspezifisch können auch andere physiologische Stimuli, wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und LPS (*Lipopolysaccharid*) die Aktivität der proteolytischen Spaltung erhöhen [109-111]. Neben natürlich vorkommenden Inhibitoren, wie TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) [112, 113] kann die proteolytische Aktivität der ADAM-Proteasen durch synthetische Hydroxamat-basierte Verbindungen gehemmt werden [114]. Es wurden zwei selektive Hydroxamat-basierte Inhibitoren hergestellt. GI254023X (GI) ist ein spezifischer ADAM10 Inhibitor während GW280264X (GW) die Aktivität von ADAM10 und ADAM17 inhibiert [114, 115].

## 1.7.1 ADAM10

ADAM10 wurde erstmals aus Rinderhirn, als eine Protease welche das MBP (*Myelin Basic Protein*) spaltet, isoliert [116]. Später wurde herausgefunden, dass die beobachtete Spaltung von MBP ein Artefakt gewesen ist [117]. Die prominentesten Substrate von ADAM10 sind APP (*Amyloid Precursor Protein*) [118-120], Notch und dessen Ligand Delta [121, 122]. Zahlreiche ADAM10 Substrate sind mittlerweile bekannt, dazu gehören unter anderem Pro-EGF [123], Fas-Ligand [124], E-Cadherin [125] und Collagen Typ XVII [126]. Einige ADAM10-Substrate spielen eine wichtige Rolle in Autoimmunreaktionen und Inflammation. Ein Beispiel hierfür ist CD23 (Immunglobulin E, IgE Rezeptor), welches auf B-Zellen exprimiert wird und IgE-vermittelte Hypersensitivitätsreaktionen Typ I vermittelt [127-129]. Weitere bekannte Substrate von ADAM10 sind membranständige Chemokine, welche die Entzündungsreaktionen regulieren, wie zum Beispiel Fraktaline (CX3CL1) [115].

Wie essentiell die ADAM10-Protease für einen Organismus ist, zeigte sich bei den ADAM10-defizienten Mäusen, welche am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung in Folge von Defekten im Notch-Signalweg sterben. Dabei wurden viele Entwicklungsdefekte im zentralen Nerven- und kardiovaskulärem System festgestellt [130]. Eine Hochregulation der ADAM10-Expression führt zur Freisetzung von zahlreichen wachstumsfördernden Faktoren und Zytokinen und spielt dadurch eine große Rolle in pathophysiologischen Prozessen wie Entzündung und Krebs [131-133].

Die proteolytische Aktivität von ADAM10 kann durch Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration nach einer Stimulation mit dem Kalzium-Ionophor Ionomycin [134, 135], durch Cholesterol-Depletion [136] oder durch Stimulation des P2X7 Rezeptors mittels ATP (Adenosintriphosphat) [137, 138] stimuliert werden. Natürlich vorkommende Inhibitoren von ADAM10 sind TIMP-1 und TIMP-3 [113].

### 1.7.2 ADAM17

Die Protease ADAM17 wurde zunächst als TACE (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme*) entdeckt, welche das membranständige Vorläuferprotein von TNF- $\alpha$  in eine lösliche Form überführt [92]. Lösliches TNF- $\alpha$  spielt eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Immunzellen im Falle einer Infektion. Übermäßige Freisetzung von TNF- $\alpha$  kann zu entzündlichen Überreaktionen führen, wie zum Beispiel bei der Sepsis [139]. Weitere Substrate von ADAM17 sind Adhäsionsmoleküle, wie das L-Selektin [93, 140], welches für das Rollen von Leukozyten am Endothel bei der Infiltration eines Gewebes verantwortlich ist. Das *Shedding* von L-Selektin kann die Infiltration und Leukozytenrekrutierung beeinflussen [141]. Es sind mittlerweile mehr als 75 ADAM17-Substrate bekannt, darunter sind Wachstumsfaktoren wie Vorläuferproteine von HB-EGF (*Heparin-Binding EGF-like growth factor*) [123], TGF- $\alpha$  [93], und Amphiregulin [123], Rezeptoren wie TNF Rezeptor I und II [93] und der IL-6 Rezeptor [142, 143] sowie weitere Substrate [144].

ADAM17 ist essentiell für die embryonale Entwicklung. Eine Deletion des ADAM17 Gens in Mäusen führt zur embryonalen Letalität am Tag E17.5 [93]. Untersuchungen an konditionellen *knock-out*-Mäusen [139] und hypomorphen ADAM17<sup>ex/ex</sup> [145] Mäusen, in denen in allen Zellen nur etwa 5% der normalen ADAM17 Expression zu finden ist, zeigten, dass ADAM17 eine wichtige Rolle bei Immunantworten und Regenerationsprozessen [144, 145] sowie bei Tumorentwicklung und Metastasierung spielt [146, 147].

Die ADAM-17 Aktivierung kann unter anderem mit nicht-physiologischen Stimuli wie PMA, Ionomycin oder mit physiologischen Stimuli wie Zytokinen, Lipopolysaccharid (LPS) und Apoptose aktiviert werden [109, 110, 142]. Die genauen Mechanismen der ADAM-Aktivierung sind bis jetzt nicht eindeutig aufgeklärt. Es wurde gezeigt, dass die Proteinkinase C (PKC) an der Aktivierung von ADAM17 durch PMA beteiligt ist [110, 148]. Weitere Studien haben gezeigt, dass MAPK wie p38 und ERK, ADAM17 phosphorylieren und dadurch ihre proteolytische Aktivität stimulieren [149-151]. Kürzlich wurde berichtet, dass bei der Inaktivierung von ADAM17 die Protein-Disulfidisomerasen (PDIs) involviert sind. Es wurde gezeigt, dass PDI mit ADAM17 assoziiert und deren Aktivität reduziert. Die Interaktion von PDI mit ADAM17 führt zu einer Konformationsänderung von ADAM17 von der aktiven Form (offene) in eine inaktive (geschlossene) Form [152, 153]. Ein Natürlicher vorkommender Inhibitor von ADAM17 ist TIMP-3 [112].

## 1.8 Ziel dieser Arbeit

Lösliches Tim-1 dient als ein effektiver Biomarker bei akuten Nierenerkrankungen sowie bei Nierenzellkrebs. Es wurde bereits gezeigt, dass die Freisetzung des löslichen Tim-1 durch *Ectodomain Shedding* erfolgt. Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Metalloprotease die Generierung des löslichen Tim-1-Proteins vermittelt. Des Weiteren soll analysiert werden, ob Tim-4 ebenfalls einer proteolytischen Spaltung unterliegt und welche Proteasen diesen Prozess katalysieren. Im Rahmen dieser Untersuchungen sollen monoklonale Tim-4 Antikörper generiert werden. Auf Basis vorheriger Studien, in welchen Tim-1 *Shedding* mit Hilfe von PMA und Pervanadat induziert wurde, wurden insbesondere die Proteasen ADAM10 und ADAM17 als mögliche Tim-1-Proteasen untersucht. Um die physiologische Relevanz des *Sheddings* von Tim-1 und Tim-4 festzustellen, sollte die proteolytische Spaltung von endogen exprimierten Tim-1 und Tim-4 untersucht werden. Darüber hinaus soll überprüft werden, ob die löslichen Tim-Proteine ihre Fähigkeit beibehalten an Phosphatidylserin zu binden.

Die Folgen der Freisetzung von löslichen Tim-Proteinen sind noch weitgehend unbekannt. Es wurde gezeigt, dass lösliches Tim-1 bei Nierenzellkrebs bei der Metastasierung und dem Invasionsverhalten der Zellen eine Rolle spielt. Hierfür soll untersucht werden, inwieweit die induzierte proteolytische Spaltung von Tim-1 zu einem erhöhtem invasiven Verhalten der Nierenkrebszelllinien führt.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Agarosegeldokumentationsanlage (Gel Doc 2000)	Bio-Rad, München
Chromatographieanlagen:	
ÄKTA explorer 100	GE Healthcare, München
ÄKTA FPLC	GE Healthcare, München
Detektionsgerät FluorChem® Q ( <i>Western Blot</i> )	Alphalnnotech, Kasendorf
Durchflusszytometrie BD FACS Canto	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophoresekammer (Agarosegele)	Bio-Rad, München
Inkubator ( <i>Zellkultur</i> )	Nuaire™, Plymouth, USA
Inkubator ( <i>Bakterien</i> ) WTB	Binder GmbH, Tuttlingen
Inkubator-Schüttler ( <i>Bakterien</i> ) Certomat® R+H	B.Braun Biotech., Melsungen
Inkubator-Schüttler ( <i>Bakterien</i> ) Innova 4000	New Brunswick Sci., Nürtingen
MACS-Separator (Midi)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Mikrotiterplattenleser (96-Well)	Rainbow, Tecan, Crailsheim
Nass-Blot-Apparatur ( <i>Wet Blot</i> )	BioRad, München
Peristaltikpumpe LKB-Pump P-1	Pharmacia, Uppsala, Schweden
PCR-Cycler peq Star	PeqLab Biotech., Erlangen
pH-Meter	Krick, Langenselbol
Photometer NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotech., Erlangen
Semy-Dry Blot-Apparatur	BioRad, München
SDS-PAGE Kammer Mini Protean	BioRad, München
Spannungsquelle Powerpack 200/300	BioRad, München
Sterilbank Class II Type A/B3	Nuaire™, Plymouth, USA
Superdex75 16/60 Säule	GE Healthcare, München
Thermoblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermoblock Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch TFP-10 M	Biometra, Göttingen
Ultrapure Wasser System Milli-Q Plus	Merck Millipore, Schwalbach
Fluoreszenzmikroskop CKX41	Olympus, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop IX81	Olympus, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop Telaval 31	Carl Zeiss, Oberkochen
Zellzähler Cellometer Auto T4	PeqLab Biotech., Erlangen
Cellometer Cell counting Chambers CD100	PeqLab Biotech., Erlangen
Tischkühlzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Laborfuge 400e	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge Jouan CR3	Thermo Scientific, Bonn
Ultrafiltrationsrührzelle (350 ml Volumen)	Millipore, Eschborn
Ultrafiltration Cellulose Membran	Millipore, Eschborn
Ultrazentrifuge Sorvall RC 5B Plus ( <i>Rotor GSA 3</i> )	Thermo Scientific, Bonn
Kryokonservierungsboxen (500 ml)	Nalgene, NY, USA

## 2.2 Verbrauchsmaterial

Zellkultur-Material	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Multiwell Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kunststoffverbrauchsmaterial	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter	Roth, Karlsruhe
PVDF-Membran	GE Healthcare, München
Whatmanpapier CHR (3 mm)	GE Healthcare, München
Zentrifugenröhren COREX	DuPont Instruments, Wilmington, USA
Konzentratoren Vivaspin 20	Sartorius, Göttingen

## 2.3 Chemikalien

Agar-Agar, hochreine Qualität	Roth, Karlsruhe
Agarose, Ultra-Qualität	Biozym, Oldendorf
Ampicillin (f. c. 100 µg/ml)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Bromphenolblau	Canalco, Bethesda, MD, USA
BzATP	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Calciumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Casein	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blau R-250	Roth, Karlsruhe
Desoxycholsäure	Roth, Karlsruhe
DMSO	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, 99,8%	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung,	Roth, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Gluthation (red. und ox.)	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt, pulv., f.d.	Bakteriologie Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
HCl	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Ionomycin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Kristallviolett	Sigma Aldrich, Deisenhofen
L-Arginin	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
MES, 2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe

---

Natriumazid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat, 100 x	Life Technologies, Darmstadt
Neomycin-Analogon G418	PAA-Laboratories, Cölbe
p-NNP (p-Nitrophenylphosphate)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
NP-40	Calbiochem, Darmstadt
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin, 100 x	PAA-Laboratories, Cölbe
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phosphatidylserin-Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phosphatidylcholin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protease-inhibitor COMPLETE Tabletten	Roche, Mannheim
Rotiphoresse Gel 30	Roth, Karlsruhe
Temed, 99% für SDS-PAGE	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Trypanblau, 0,4%	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypsin/EDTA	PAA-Laboratories, Cölbe
Trypton/Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Sigma Aldrich, Deisenhofen

## 2.4 Medien und Lösungen

Agarosegele (1%-2%-ig)	0,5-1 g Agarose 50 ml 0,5 x TBE-Puffer 0,001% Ethidiumbromid
<u>Antikörper-Reinigung:</u> <i>Bindungspuffer</i>	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 8,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,0)
<i>Elutionspuffer</i>	0,5 M Glycin (pH 3,0)
<i>Neutralisationspuffer</i>	1 M Tris-HCl (pH 9,0)
AP-Reaktionspuffer (AP: <i>Alkalische Phosphatase</i> )	0,1 M Glycine 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM ZnCl <sub>2</sub> 1 mg/ml pNNP
Blockingpuffer	5% Magermilchpulver in TBS
Coomassie-Färbelösung	40% Methanol 10% Essigsäure 0,01% Coomassie Brilliant Blau R-250

---

Coomassie Entfärberlösung	40% Methanol 10% Essigsäure
Denaturierungspuffer	25 mM MES (pH 6,5) 8 M Urea 10 mM EDTA 1 mM DTT
DNA-Probenpuffer (6 x)	10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 60% Glycerol 60 mM EDTA 0,03% Bromophenolblau
FACS-Puffer	0,5% BSA in 1xPBS
Kristallviolett-Färbelösung ( <i>Invasionsassay</i> )	0,5% Kristallviolett 25% Methanol a.d. H <sub>2</sub> O zu 100 ml
Lämmli-Puffer (5 x)	62,5 mM Tris (pH 6,8 ) 2% SDS 10% β-mercaptoethanol 5% Glycerin 0,01% Bromphenolblau
LB-Medium	10% Trypton/Pepton aus Casein 5% Hefeextrakt 10% NaCl (pH 7,0)
LB <sup>Amp</sup> -Medium	LB-Medium 100 ng/ml Ampicillin
MACS-Puffer	1% BSA in 1 x PBS 2 mM EDTA
PBS (1 x)	1,4 M NaCl 27 mM KCl 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,4)
PBS-T	1 x PBS 0,05% Tween-20
Renaturierungspuffer	0,1 M Tris-HCl (pH 8,5) 400 mM L-arginin 2 mM EDTA 4 mM red. Gluthation 0,4 mM ox. Gluthation

RIPA-Lysispuffer (5 ml RIPA-Lysispuffer ersetzt mit einer COMPLETE Proteaseinhibitor Tablette)	50 mM HEPES (pH 7,5) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% NP-40 0,5% Desoxycholsäure 0,1% SDS
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
SOC-Medium	20 mM Glucose 10% Trypton 5% Hefextrakt 10% NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> (pH 7,5)
TBE-Puffer (5 x) (Agarose- Gelelektrophorese)	0,11 M Tris 90 mM Borsäure 2,5 mM EDTA (pH 8,3)
TBS	50 mM Tris 1,5 M NaCl, (pH 7,4 mit HCl)
TBS-T	TBS 0,05% Tween 20
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol

Tabelle 2.1 Pufferzusammensetzung für Polyacrylamidgele (Western Blot)

	Sammelgel	Trenngele	
	4%	10%	12,5%
<b>30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1)</b>	666 µl	5000 µl	6250 µl
<b>1 M Tris-HCl pH 8,8</b>	-	5625 µl	5625 µl
<b>1 M Tris-HCl pH 6,8</b>	625 µl	-	-
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3629 µl	4093 µl	2843 µl
<b>10% SDS</b>	50 µl	150 µl	150 µl
<b>10% APS</b>	25 µl	120 µl	120 µl
<b>TEMED</b>	5 µl	12 µl	12 µl

## 2.5 Medien und Lösungen für Zellkultur

BD Matrigel (# 356230) Basement Membrane Matrix GFR ( <i>Growth Factor Reduced</i> )	BD Bioscience, Heidelberg
DAPI-Mounting-Medium (# 10422)	Dianova, Hamburg
DMEM mit Glukose (4,5 g/l), L-Glutamin und Natriumpyruvat	PAA Laboratories, Cölbe
DMEM <sup>+-</sup>	DMEM mit 10% FKS
Einfriermedium	DMEM <sup>+-</sup> /RPMI <sup>+-</sup> 20% FKS und 10% DMSO
Histopaque-1077 ( <i>PBMCs Isolierung</i> )	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Hybridoma-SFM Medium serumfrei	Life Technologies, Darmstadt
Hybridomazellmedium <i>für die Antikörper-Produktion</i>	Hybridoma-SFM Medium 50 nM $\beta$ -Mercaptoethanol 1 mM Natriumpyruvat
Hybridomzellen-Selektionsmedium	RPMI 1640 hybridoma express <sup>+</sup> 10% FKS 50 nM $\beta$ -Mercaptoethanol 1 mM Natriumpyruvat 1x HAT Media Supplement 1% Penicillin/Streptomycin
Makrophagen-Medium	RPMI <sup>+-</sup> Natriumpyruvat (1 x) Non-essential AS (1 x) 50 nM $\beta$ -Mercaptoethanol 1% Penicillin/Streptomycin L-Glutamin (1 x)
RPMI 1640 mit L-Glutamin	PAA Laboratories, Cölbe
RPMI 1640 mit stabilem Glutamin und NaHCO <sub>3</sub> (2 g/l)	Biochrom AG, Berlin
RPMI <sup>+-</sup>	RPMI 1460 mit 10% FKS
Transfektionsreagenz TurboFect	Thermo Scientific, Bonn
Transfektionsreagenz DharmaFECT 1	Thermo Scientific, Bonn

## 2.6 Kits

Antikörper-Biotinylierung EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation Kit (# 21425)	Thermo Scientific, Bonn
ECL-Lösungen (enhanced chemiluminescence) <i>Meerrettichperoxidase (HRP)-Substrate</i> <i>für die Entwicklung der Western Blots</i> SuperSignal West Pico Substrate (# 34077) SuperSignal West Femto Substrate (# 34095)	Thermo Scientific, Bonn
Isolierung der CD14+ Zellen CD14-Microbeads (# 130-050-201) LS-Säulen (# 130-042-401)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Isolierung von mRNA NucleoSpin RNA II (# 740955.250)	Machery und Nagel, Düren
Gelextraktion von DNA-Fragmenten NucleoSpin Extract II (# 740609.250)	Machery und Nagel, Düren
Midi-Prep (Plasmidisolation) NucleoBond Xtra Midi (# 740410.100)	Machery und Nagel, Düren
Mini-Prep (Plasmidisolation) GeneJET Plasmid Miniprep (# K0503)	Thermo Scientific, Bonn
BM Blue POD Substrate, <i>Meerrettichperoxidase Substrate für ELISA</i>	Roche, Mannheim
Tim-4 ELISA Kit (# ABIN423458)	Antikörper-Online, Aachen

## 2.7 Plasmide, Primer und siRNA

### Plasmide

pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Kalifornien, USA Expressionsvektor für Säugetierzellen
pUC57-Tim-4	synthetisiert bei GENEART, München Klonierungsvektor
pCRscript-AP-TGFα	Stratagene, Waldbronn Klonierungsvektor

## Primer

Die für diese Arbeit benötigten Primer wurden von Metabion (München) bezogen.

**Tabelle 2.2 Sequenzen der verwendeten Primer**

Name	Sequenz
<b>h1-full-CDS-EcoRI-for</b>	5' - GATCCTTAAGATGCATCCTCAAGTGGTCATC - 3'
<b>h1-full-CDS-Af/II-for</b>	5' - GACTCTTAAGTCTGAAAGGTTGGAGAGG - 3'
<b>h1-full-CDS-NotI-rev</b>	5' - GATCGGGCCGCTTAGCCGTGGCATAAAGAC - 3'
<b>Tim-1-Δ1for</b>	5' - ACAATCAAACCAACTGACGGCCAATACCACTAAAGGAATC - 3'
<b>Tim-1-Δ1rev</b>	5' - GGTATTGGCCGTCAGTTGAGTTGATTGTTATTCAAAGGCC - 3'
<b>Tim-4-Af/II-for</b>	5' - GACTCTTAAGGAGACTGTTGTGACGGAGGTTTG - 3'
<b>Tim-4-NotI-rev</b>	5' - GACTCGGGCCGCTTAGAGGGTAAAAGGCCGTCTTC - 3'
<b>AP-Tim-4-Δ1</b>	5' - CAGATGGAGCCATCTCCAACTACTG - 3'
<b>AP-Tim-4-Δ1rev</b>	5' - GAGATGGGCTCCATCTGTCCTGTTTG - 3'
<b>AP-Tim-4-Δ2for</b>	5' - CCTGAGCATGGAATACCCATGTCAATGAAG - 3'
<b>AP-Tim-4-Δ2rev</b>	5' - GGGTATTCCATGCTCAGGAACGTGTATC - 3'
<b>AP-Tim-4-Δ3for</b>	5' - CCTGGAGCATCTAACACAGGACAGATGGATGG - 3'
<b>AP-Tim-4-Δ3rev</b>	5' - CTGTCCTGTTTAGATGCTCCAGGCTGAGGAG - 3'
<b>AP-Tim-1 for</b>	5' - GACTCTTAAGTCTGAAAGGTTGGAGAGG - 3'
<b>AP-Tim-1-ΔICD rev</b>	5' - GATCGGGCCGCAATGATGACACCCAAAAGAGC - 3'
<b>AP-Tim-4 for</b>	5' - GACTCTTAAGGAGACTGTTGTGACGGAGGTTTG - 3'
<b>AP-Tim-4-ΔICD rev</b>	5' - GATCGGGCCGCTCTCAGGAGAAACGCCACAAAC - 3'
<b>IgV-Tim-4-Ndel-for</b>	5' - GCTCCATATGTCAGAGACTGTTGTGACGGAGG - 3'
<b>IgV-Tim-4-NotI-rev</b>	5' - GATCGGGCCGCTGAGGCTCTCTGTAGATTG - 3'

## siRNA

ON-TARGETplus Human ADAM17 (6868) siRNA SMARTpool (# L-003453-00-0005)	siRNA gerichtet gegen ADAM17 Thermo Scientific, Bonn
ON-TARGETplus Human ADAM10 (102) siRNA SMARTpool (# L-004503-00-0005)	siRNA gerichtet gegen ADAM10 Thermo Scientific, Bonn
ON-TARGETplus Non-targeting Pool (# D-001810-10-05)	Kontroll-siRNA Thermo Scientific, Bonn

## 2.8 Größenmarker

GeneRuler 1 kb DNA Ladder (250 bp – 10 kbp) Größenbestimmung von DNA-Fragmenten	Thermo Scientific, Bonn
Prestained Molecular Weight Marker Größenbestimmung von Proteinen (25 – 120 kDa)	Thermo Scientific, Bonn

## 2.9 Antikörper, Enzyme und Proteine

**Tabelle 2.3 Antikörper**

Antikörper/Konjugate	Klonalität/Wirt	Nummer	Firma
Tim-1, IgG <sub>1</sub>	Monoklonal/Maus	#sc-80359	Santa Cruz Biotech., Heidelberg
Tim-1-PE, IgG <sub>1</sub>	Monoklonal/Maus	#353904	Biolegend, London, UK
Tim-4-PE, IgG <sub>1</sub>	Monoklonal/Maus	#354004	Biolegend, London, UK
ADAM10-PE, IgG <sub>1</sub>	Monoklonal/Maus	#352704	Biolegend, London, UK
ADAM17-FITC, IgG <sub>1</sub>	Monoklonal/Maus	#FAB9301F	R&D, Abingdon, England
β-Aktin, IgG <sub>1</sub>	Monoklonal/Maus	# sc-4778 (C4)	Santa Cruz Biotech., Heidelberg
Tim-1, biotinyliert	Polyklonal/Ziege	# BAF1750	R&D, Abingdon, England
Tim-4 (T27-2, IgG <sub>2a</sub> & T27-3)	Monoklonal/Maus	-	aus eigener Herstellung
<b>Isotypkontrollen</b>			
IgG <sub>1</sub> -PE	Monoklonal/Maus	#400111	Biolegend, London, UK
IgG <sub>1</sub> -FITC	Monoklonal/Maus	#IC002F	R&D, Abingdon, England
gereinigtes IgG2a	Monoklonal/Maus	#401501	Biolegend, London, UK
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
anti-Maus-APC	Polyklonal/Ziege	#115-136-146	Dianova, Hamburg
anti-Maus-POD konjugiert mit Meerrettichperoxidase	Polyklonal/Ziege	#31432	Thermo Scientific, Bonn
anti-Maus-DyLight-649	Polyklonal/Ziege	# 35515	Thermo Scientific, Bonn

### Enzyme

Alle verwendeten Enzyme (Restriktionsendonukleasen, Polymerasen, Ligase und Reverse Transkriptase) wurden bei Thermo Scientific (Bonn) erworben.

### Proteine

Humanes rekombinantes M-CSF (Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen)

eBioscience, Frankfurt

WGA-FITC (Fluorescein Wheat Germ Agglutinin)

Vector Laboratories, Burlingame, CA

## 2.10 Inhibitoren

ADAM10 Pro-Domäne (proA10)		ADAM10 Inhibitor [106]
GI254023X (GI) <chem>C21H33N3O4</chem>	Synonym: (2R)-N-[(1S)-2,2-Dimethyl-1-[(methyl amino)carbonyl]-propyl]-2-[(1S)-1-[formyl (hydroxy)amino]ethyl]-5-phenylpentanamide	ADAM10 Inhibitor [114]
GW280264X (GW) <chem>C28H42N6O6S</chem>	Synonym: N6-[(benzyloxy) carbamoyl]-N2-[(2R,3S)-3-[formyl(hydroxy)amino]-2-methyl-2-propylhexanoyl]-N-1,3-thiazol-2-yl-L-lysinamide (2R,3S)-3-(formyl-hydroxyamino)-2-2-methyl-1-propyl hexanoic acid [(1S)-5-benzyloxycarbamoylamino-1-(1,3-thiazol-2-ylcarbamoyl)-1-pentyl]amide	ADAM10 und ADAM17 Inhibitor [114]
Marimastat (MA) <chem>C15H29N3O5</chem>	Synonym: (2S,3R)-N4-[(1S)-2,2-Dimethyl-1-[(methylamino)carbonyl]propyl]-N1,2-dihydroxy-3-(2-methylpropyl) butanediamide	Breitbandmetalloprotease inhibitor [142]
UK-356618 (MI) <chem>C34H43N3O4</chem>	Synonym: (2R)-N1-[(1S)-2,2-Dimethyl-1-({[(1R)-1-phenylethyl]amino}carbonyl)propyl]-2-{3-[(3-methyl-4-phenyl)-phenyl]propyl}-(N4-hydroxy) butanediamide	MMP-3 Inhibitor, Sigma Aldrichs, Duisenbach [154]

## 2.11 Bakterienstämme, Zelllinien und Mausstämme

### Bakterien

<i>E. coli</i> XL1-Blue ( <i>Klonierung</i> )	Stratagene, Waldbronn
<i>E. coli</i> BL21 ( <i>Proteinexpression</i> )	Stratagene, Waldbronn

### Zelllinien

HEK293 (# CRL-1573)	LGC Standards, Wesel Humane embryonale Nierenzelllinie
769-P (# CRL-1933)	LGC Standards, Wesel Humane Nierenkarzinomzelllinie

### MEF

MEF	Immortalisierte murine embryonale Fibroblastenzelllinien [137]
MEF WT	Wildtyp MEFs

MEF ADAM10 <sup>-/-</sup>	MEFs defizient für die Metalloprotease ADAM10
MEF ADAM17 <sup>-/-</sup>	MEFs defizient für die Metalloprotease ADAM17
MEF ADAM10 <sup>-/-</sup> , ADAM17 <sup>-/-</sup>	MEFs defizient für die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17

### Mausstamm

C57BL/6N	Charles River, Köln
----------	---------------------

### 3 Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 Synthese der cDNA

Für die Herstellung von cDNA wurde zunächst mRNA aus 769-P Zellen isoliert. Dafür wurden die Zellen einer konfluenten 10 cm Zellkulturschale mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und 10 min bei 1.000 rpm pelletiert. Die Isolation der mRNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin RNA II Kits entsprechend den Herstellerangaben (Machery & Nagel, Düren). Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte spektrometrisch mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 Photometers (Peqlab Biotech., Erlangen).

Für die cDNA-Synthese wurde folgender Ansatz angesetzt:

10 µl mRNA (100 ng - 2 µg)

1 µl OligodT Primer (100 pmol)

2 µl H<sub>2</sub>O

5 min bei 65°C inkubiert

+ 4 µl RT-Puffer (5 x)

+ 2 µl dNTPs (10 mmol)

+ 1 µl RevertAid Reverse Transkriptase (200 U)

1 h bei 42°C inkubiert

Anschließend wurde die cDNA für 10 min bei 70°C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase inkubiert und bei -20°C gelagert.

### 3.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der zu klonierenden DNA-Fragmente wurde in einem 50 µl Reaktionsansatz im PCR-Cycler Peq Star (Peqlab Biotech., Erlangen) durchgeführt. Folgender Rektionsansatz wurde hergestellt:

Template:	2-10 ng DNA (Plasmid/cDNA)
Primer-Mix:	jeweils 10 pmol
dNTPs:	jeweils 10 mM
PCR Puffer (10x/5x):	5 µl /10 µl
DreamTaq- bzw. Phusion-Polymerase:	1 U

Folgende Programme wurden benutzt:

	Phusion-Polymerase		DreamTaq-Polymerase	
	Zeit	Temperatur	Zeit	Temperatur
<b>1. Initiale Denaturierung</b>	30 s	98°C	5 min	95°C
<b>2. Denaturierung</b>	10 s	98°C	30 s	95°C
<b>3. Anlagerung der Primer</b>	20 s	55-70°C	30 s	55-70°C
<b>4. Elongation</b>	1 min	72°C	1 min	72°C
<b>5. Terminale Elongation</b>	10 min	72°C	10 min	72°C

} 34 x

Die Temperatur für die Anlagerung von Primern wurde für jeden PCR-Ansatz mit Hilfe dieser Formel berechnet:  $[(T_m\text{-For} + T_m\text{-Rev})/2] - 5^\circ\text{C}$  ( $T_m$  = Schmelztemperatur der Primer, Angabe des Herstellers der Primer, Metabion, München). Die Formel wurde entsprechend den Herstellerangaben für die DreamTaq-Polymerase (Thermo Scientific, Bonn) erstellt und für die Phusion-Polymerase übernommen.

### 3.1.3 SOE-PCR (Splicing by overlap extension PCR)

Die Herstellung von Tim-1 und Tim-4 Mutanten erfolgte mittels SOE (*Splicing by overlap extension*)-PCR-Mutagenese. Mit Hilfe der SOE-PCR ist es möglich zwei DNA-Fragmente mit überlappenden Sequenzen zu einem längeren DNA-Fragment zu kombinieren. Die überlappende Sequenz enthält dabei die gewünschte Mutation. Zur Herstellung der Mutanten wurden jeweils vier Primer benötigt. Zwei Primer (1 und 2) flankierten das gesamte DNA-Fragment. Die weiteren zwei Primer (3 und 4) trugen die gewünschte Mutation sowie jeweils einen 5'-Überhang, komplementär zu dem zweiten DNA-Fragment. Im ersten Schritt wurden zwei getrennte PCR-Reaktionen mit den Primerpaaren 1 und 3 sowie 2 und 4 durchgeführt.

Die beiden DNA-Fragmente wurden anschließend gereinigt (siehe 3.1.5). Im zweiten Schritt der SOE-PCR wurden die erzeugten DNA-Fragmente zusammen mit dem flankierenden Primerpaar (1 und 2) eingesetzt. Nach dem ersten Denaturierungsschritt hybridisierten die überlappenden Sequenzen beider DNA-Fragmente miteinander und dienten als Template für das längere DNA-Fragment mit der gewünschten Mutation.

### 3.1.4 Präparation von Vektor und Insert durch Restriktion

Für die Restriktion wurde die DNA mit der entsprechenden Menge der Restriktionsendonukleasen in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 2-3 h bei 37°C inkubiert (Thermo Scientific, Bonn). Die restriktierten Vektoren wurden mit Hilfe einer thermosensitiven Alkalischen Phosphatase (Fast-AP) entsprechend den Herstellerangaben (Thermo Scientific, Bonn) dephosphoryliert. Anschließend wurden die verdauten Fragmente in einem Agarosegel der Größe nach voneinander getrennt und mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kits isoliert (Machery & Nagel, Düren).

### 3.1.5 Agarose Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Größentrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1-2%igen Agarosegelen in einem Agarose Gel Elektrophorese System (Bio-Rad, München). Die Proben wurden mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen der Agarosegele pipettiert. Die Größentrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 0,5 x TBE-Puffer (Laupuffer) bei 100-120 Volt. Anschließend wurden die Gele mit Hilfe eines Gel-Doc 2000 Systems unter UV-Licht dokumentiert. Die Isolierung der gewünschten DNA-Fragmente erfolgte entsprechend den Herstellerangaben mit dem NucleoSpin Extract II Kit. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 Photometers (Peqlab Biotech., Erlangen) bestimmt.

### 3.1.6 Ligation der DNA-Fragmente

Bei der Ligation werden Vektor- und Insert-DNA kovalent miteinander verknüpft. Für die Ligation wurden 50-100 ng Plasmid-DNA, eine fünffache molare Menge der Insert-DNA und 10 U T4-DNA-Ligase in 1 x T4-DNA-Ligasepuffer eingesetzt (Thermo Scientific, Bonn). Der Ligationsansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und direkt für die Transformation von *E.coli* XL1-Blue Bakterien eingesetzt.

### 3.1.7 Transformation der Bakterien

Die thermokompetenten *E.coli* XL1-Blue Bakterien (Stratagene, Walldbronn) wurden durch einen Hitzeschock mit einem Plasmid transformiert. Dafür wurden 25 µl der Bakteriensuspension mit 50-100 ng des Plasmids vorsichtig gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock (1 min bei 42°C) wurden die Bakterien erneut für 5 min auf Eis inkubiert, anschließend wurde 200 µl SOC-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension für 1 h bei 37°C und 900 rpm inkubiert. Nachfolgend wurde die Bakteriensuspension auf einer LB-Platte mit einem Drigalskispatel ausplattiert. Zur Verdünnung wurde mit dem gleichen Drigalskispatel eine zweite LB-Platte beschichtet. Die LB-Platten wurden in einem Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Selektion der transformierten Klone war durch die Zugabe von Antibiotika gewährleistet.

### 3.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli* Bakterien

#### Analytischer Maßstab (ca. 50 µg Plasmid-DNA; „Mini-Präp“):

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden zunächst die transformierten Bakterienklone in einer Übernachtkultur wachsen gelassen. Dafür wurde 1,8 ml LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, mit einem Bakterienklon inkuliert und bei 37°C und 900 rpm über Nacht inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte über das GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Bonn) laut Herstellerprotokoll. Die Plasmide wurden mit 50 µl EB-Puffer eluiert.

#### Präparativer Maßstab (300-800 µg Plasmid-DNS; „Midi-Präp“):

Für die Gewinnung größerer Mengen an rekombinanter Plasmid-DNA wurde eine Midipräparation durchgeführt. Dafür wurden 100 ml LB-Medium (versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum) mit einer Vorkultur (1,8 ml LB-Medium inkuliert mit einem Bakterienklon, für 8 h bei 37°C und 900 rpm inkubiert) inkuliert und bei 37°C und 400 rpm über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur durch Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C für 15 min pelletiert. Die Plasmide wurden mit Hilfe des NucleoBond Xtra Midi Kits (Machery&Nagel, Düren) nach Herstellerangaben isoliert. Nach einer Ethanolfällung wurde die DNA in 150 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde mit Hilfe des Photometers NanoDrop ND-1000 (Peqlab Biotech., Erlangen) bestimmt.

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Subkultivierung von Zelllinien

Die Zelllinien HEK293 (LGC Standards, Wesel) und murine embryonische Fibroblasten (MEFs), Wildtyp, ADAM10-/-, ADAM17-/- und ADAM10/ADAM17-/- [137] wurden im Zellkulturmedium DMEM (PAA Laboratories, Cölbe) mit 10% FKS kultiviert. Die humane Nierenkarzinom Zelllinie 769-P (LGC Standards, Wesel) wurde im Zellkulturmedium RPMI 1640 (PAA Laboratories, Cölbe) mit 10% FKS kultiviert. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in sterilen 10 cm Zellkulturschalen bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> Begasung. Die Zelllinien wurden alle drei bis vier Tage bei einer 90-100%igen Konfluenz passagiert. Dabei wurden die adhärenten Zellen durch Trypsin/EDTA (PAA Laboratories, Cölbe) abgelöst und auf neue Zellkulturschalen überführt.

### 3.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen einer konfluenten 10 cm Zellkulturschale durch Trypsin/EDTA (PAA Laboratories, Cölbe) abgelöst, bei 1.200 rpm pelletiert und in 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Die Kryokonservierung erfolgte in Einfrier-Röhrchen in Kryokonservierungsboxen (befüllt mit Isopropanol) durch ein kontrolliertes Abkühlen von 1°C pro Minute in einem -80°C Gefrierschrank. Zur Langzeitlagerung wurden die Röhrchen in Stickstoffbehälter überführt.

### 3.2.3 Transfektion

Die adhärenten Zellen (HEK293 oder 769-P) wurden mit TurboFect entsprechend den Herstellerangaben transfiziert (Thermo Scientific, Bonn). Dabei wurden  $5 \times 10^5$  Zellen pro Well 24 h vor der Transfektion in 6-Well Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert und die Zellen mit 2 µg Plasmid und 3 µl TurboFect transfiziert. Bei einer Doppel-Transfektion wurde von jedem Plasmid 1 µg eingesetzt. Für die Generierung von stabilen Zelllinien wurden die transfizierten Zellen in einem Selektionsmedium (DMEM, 10% FKS, 0,8 µg/ml G418) für 14 Tage kultiviert. Die gewachsenen Klone wurden gepickt und in eine 96-Well Platte überführt. Anschließend wurden die Klone vermehrt und auf die Expression von rekombinantem Tim-4 mittels Western Blot untersucht.

### 3.2.4 Transfektion mit siRNA

Die Transfektion der 769-P Zellen mit siRNA erfolgte mittels DharmaFECT 1 entsprechend den Herstellerangaben (Thermo Scientific, Bonn). Hierfür wurden  $5 \times 10^5$  769-P Zellen in 6-Well Platten 24 h vor der Transfektion ausgesät. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium erneuert. Die Zellen wurden mit 50 nM siRNA (anti-ADAM10 oder anti-ADAM17) bzw. control siRNA und 9  $\mu$ l DharmaFECT 1 pro Well entsprechend den Herstellerangaben transfiziert (Thermo Scientific, Bonn). Für die doppelte Transfektion wurde jeweils 25 nM der anti-ADAM10 und anti-ADAM17 siRNA und 9  $\mu$ l DharmaFECT 1 pro Well eingesetzt. Nach 24 h wurden die transfizierten Zellen von jedem 6-er Well durch 1 ml Trypsin/EDTA abgelöst, bei 1.200 rpm pelletiert und in 2 ml RPMI+/- Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen auf zwei Wells einer 12-Well Platte verteilt und für weitere 48 h kultiviert. Die Stimulation der transfizierten Zellen erfolgte in 600  $\mu$ l Serum-freien Medium mit 5  $\mu$ M Ionomycin (30 min) oder 100 nM PMA (60 min). Die Überstände wurden mittels Western Blot und die Expression der Proteasen auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie untersucht.

### 3.2.5 Experimente zur Induktion der proteolytischen Spaltung

Die Stimulation der transfizierten HEK293 Zellen erfolgte 48 h posttransfektional und die 769-P Zellen wurden 48 h vor der Stimulation ausgesät ( $5 \times 10^5$  Zellen/Well). Die Stimulation der Zellen erfolgte in 300  $\mu$ l bei einer 12-Well Platte und in 600  $\mu$ l bei einer 6-Well Platte im Serum-freien Medium (DMEM<sup>-/-</sup> bei HEK293 oder RPMI<sup>-/-</sup> bei 769-P Zellen). Die spezifischen Inhibitoren wurden 30 min vor der Stimulation zugesetzt. Folgende Inhibitoren wurden in diesen Experimenten eingesetzt: ADAM10 Inhibitor GI254023X (GI, 3  $\mu$ M), ADAM10 und ADAM17 Inhibitor GW280264X (GW, 3  $\mu$ M), MMP-3 Inhibitor (MI, 3  $\mu$ M) und der ADAM10 Inhibitor ADAM10-Prodomäne (proA10, 10-20  $\mu$ M). Anschließend wurden die Zellen mit BzATP (500  $\mu$ M) für 30 min, mit Ionomycin (2,5-5  $\mu$ M) für 30 min oder mit PMA (100 nM) für 60 min stimuliert. Danach wurden die Überstände in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13.000 rpm für 30 min zentrifugiert. Die Überstände der stabil transfizierten HEK293-Tim-4 und 769-P Zellen wurden anschließend mittels SpeedVac Plus SC110A

(Thermo Scientific, Bonn) von 250 µl auf 50 µl konzentriert und im Western Blot eingesetzt. Die Überstände von transient transfizierten HEK293 Zellen wurden ohne weiteres Konzentrieren im Western Blot (50 µl) eingesetzt. Für die Gewinnung der Proteinextrakte wurden die Zellen pelletiert und in 75 µl RIPA-Puffer lysiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.2.6 Isolierung humaner PBMCs aus peripherem Blut

PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) sind mononukleäre Zellen des peripheren Blutes. Die Isolierung der PBMCs aus dem Blut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe von Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymeren (Histopaque-1077) entsprechend den Herstellerangaben (Sigma Aldrich, Deisenhofen). Ein genehmigter Ethikantrag für die Blutabnahme von gesunden, freiwilligen Probanden lag vor (Nummer: AD 404/12). Zunächst wurden 10 ml periphervenöses Blut von einem gesunden freiwilligen Spender mit 25 ml PBS-EDTA-Puffer (1 x PBS, 2 mM EDTA) verdünnt. In einem 50-ml Falcon wurden 15 ml Histopaque-1077 vorgelegt, mit 35 ml verdünntem Blut vorsichtig überschichtet und bei 400 x g für 30 min bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurde die Plasmaphase abgenommen und die PBMCs wurden vorsichtig aus der Interphase mit einer Pasteurpipette in ein neues Falcon überführt. Anschließend wurden die PBMCs zweimal mit 50 ml PBS-EDTA-Puffer gewaschen (300 x g, 10 min, RT) und in einem Zellzähler Cellometer Auto T4 (Peqlab Biotech., Erlangen) gezählt.

### 3.2.7 Isolierung humaner CD14+ Zellen

Humane CD14<sup>+</sup> Zellen wurden aus den PBMCs mittels der *Magnetic activated cell sorting* (MACS)-Methode isoliert. MACS erlaubt eine Anreicherung markierter Zellen über spezifische Antikörper. Die Antikörper sind an kleine Eisenoxidpartikel gekoppelt und bleiben in einem magnetischen Feld zusammen mit den gebundenen Zellen in einer Säule haften. Nachdem das Magnetfeld entfernt wird, ist es möglich, die Zellen von der Säule zu eluieren. Die Isolierung humaner CD14<sup>+</sup> Zellen erfolgte mit Hilfe der CD14-Microbeads, LS-Columns sowie einem MidiMACS-Separator (Miltenyi Biotec., Bergisch-Gladbach). Zunächst wurden die isolierten humanen PBMCs (siehe 3.2.6) im MACS-Puffer aufgenommen und zusammen

mit den CD14-Microbeads für 30 min bei 4°C inkubiert. Dabei wurden pro  $1 \cdot 10^7$  Zellen 80 µl MACS-Puffer und 20 µl von CD14-Microbeads eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml MACS-Puffer versetzt und bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Die MACS-Separation erfolgte mittels eines Midi-MACS-Separators und einer LS-Säule. Die Säule wurde in den MACS-Separator eingespannt und mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert. Das Zellpellet wurde in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen und auf die Säule pipettiert. Nach dem Waschen der Säule mit 9 ml MACS-Puffer wurde die Säule von dem Magnetfeld entfernt und die Zellen wurden mit 5 ml MACS-Puffer eluiert. Die angereicherten CD14+ Zellen wurden für 10 min bei 300 x g pelletiert und in 10 ml Makrophagen-Medium aufgenommen.

### 3.2.8 Generierung humaner Makrophagen aus den Monozyten

Humane Makrophagen wurden mit Hilfe von M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*) aus den Monozyten generiert. Hierzu wurden ca.  $9 \cdot 10^6$  CD14+ Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale mit 100 ng/ml M-CSF (eBioscience, Frankfurt) versetzt und für 6 bis 12 Tage kultiviert.

### 3.2.9 Invasionsassay

Mit Hilfe des Matrikel Invasionsassays ist es möglich, das invasive Verhalten von Zellen *in vitro* zu untersuchen. Dabei werden die zu untersuchenden Zellen in spezielle Matrikel-Matrix-beschichtete Zellkultur-Kammern (*Transwell Inserts*) gegeben und auf ihre Invasionsfähigkeit hin untersucht. Die *Transwell Inserts* bestehen aus einem 12 mm großen Polystyrol-Zylinder, wobei das untere Ende mit einer Polykarbonatmembran (PET-Membran) versiegelt ist (Millicell, Schwalbach). Die PET-Membran hat 8 µm große Poren und wird mit einer Matrikel-Matrix beschichtet. Die BD Matrikel Basement Membrane Matrix GFR (*growth factor reduced*) besteht aus gelösten Basalmembrananteilen, welche aus Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkomen (EHS) der Maus präpariert wurden (BD Bioscience, Heidelberg). In den EHS-Tumoren sind die Proteine der extrazellulären Matrix angereichert. Die Hauptbestandteile der Matrikel-Matrix sind Laminin, gefolgt von Kollagen Typ IV, Heparansulfatproteoglykan und Entactin [113, 116]. Die Matrikel-Matrix GFR enthält

Wachstumsfaktoren, die natürlicherweise in den EHS-Tumoren vorkommen, wie beispielsweise TGF- $\beta$ , EGF und IGF-1. Der Level der Wachstumsfaktoren ist in der Matrikel-Matrix GFR reduziert. Die Matrix verschließt die Poren der PET-Membran der *Transwell Inserts* und verhindert so die Migration nicht-invasiver Zellen. Invasive Zellen zerstören die Matrix, wandern durch diese hindurch und bleiben an der Unterseite der *Transwell Inserts* haften. Die Membran der *Transwell Inserts* wurde mit Matrikel-Matrix (30  $\mu$ l Matrikel und 70  $\mu$ l RPMI $^{1/}$ ) entsprechend den Herstellerangaben (BD Bioscience, Heidelberg) beschichtet und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die beschichteten *Transwell Inserts* wurden in eine 24 Well Platte eingesetzt, wobei in die untere Kammer 600  $\mu$ l RPMI Medium mit 10% FKS gegeben wurde. Das FKS diente dabei als Chemoattraktant. In die obere Kammer der *Transwell Inserts* wurden  $1 \times 10^5$  769-P Zellen ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden 30 min vor der Stimulation mit PMA (100 nM) die Inhibitoren Marimastat (3-10  $\mu$ M), GI (3  $\mu$ M) oder GW (3  $\mu$ M) zugegeben. Nach 24 h wurden die *Transwell Inserts* mit PBS gewaschen und die Matrikel-Matrix mit den Zellen von der Oberseite der Membran mit Wattestäbchen entfernt. Die Zellen, die an der Unterseite der Membran hafteten, wurden mit 4% Paraformaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaligem Waschen der Inserts mit PBS wurden die Zellen in einer Kristallviolett-Lösung (0,5% Kristallviolett, 25% Methanol) für 10-15 min bei Raumtemperatur gefärbt. Die überschüssige Färbelösung wurde durch Schwenken der Inserts in dH<sub>2</sub>O entfernt. Nach der Dokumentation der gefärbten Zellen mittels Digitalkamera wurde der Farbstoff in einer 10%-igen Essigsäurelösung gelöst und im Mikrotiterplattenleser (Rainbow, Tecan, Crailsheim) bei 595 nm gemessen.

### 3.3 Herstellung der Antikörper

#### 3.3.1 cDNA-Klonierung, bakterielle Expression und Reinigung der Tim-4-IgV-Domäne

Die kodierende Sequenz für die Immunoglobulin V Domäne von humanem Tim-4 wurde mit den Primern IgV-Tim-4-*Nde*I-for und IgV-Tim-4-*Not*I-rev amplifiziert, mit den Enzymen *Nde*I und *Not*I restriktiert und in den bakteriellen Expressionsvektor pET-23a(+) (Novagen, Deutschland) kloniert. Mit dem resultierenden Vektor pET23a-Tim-4-IgV wurden die Bakterien des *E.coli*-Stamms BL21 transformiert. 1 l LB<sup>Amp</sup>-Medium wurde mit den transformierten Bakterien angeimpft. Die Bakterienkultur wurde bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 kultiviert. Anschließend erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch die Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid). Nach 4 h wurde die Bakterienkultur bei 8.000 rpm, 4°C für 15 min zentrifugiert. Die in den Bakterien exprimierten Tim-4-IgV Proteine wurden als unlösliche Einschlussskörperchen (*Inclusion Bodies*) im Zellinneren angereichert. Zur Isolierung der *Inclusion Bodies* wurden die Bakterienzellwände mittels Ultraschall zerstört. Dafür wurde das Pellet in einer Serie von fünf Wiederholungen in jeweils 30 ml PBS (Initiale drei Wiederholungen in PBS/0,2% Tween 20) resuspendiert, drei Mal für eine Minute auf Eis sonifiziert (30% power mit einer TT13 Sonotrode) und 40 min bei 4°C und 20.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 12 ml Denaturierungspuffer aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Roller inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren bei 20.000 rpm für 20 min wurde das Pellet in 10 ml Denaturierungspuffer gelöst. Die Renaturierung des Proteins erfolgte durch eine schnelle Verdünnung (*Rapid Dilution*). Dabei wurde die Proteinlösung tropfenweise mittels einer Peristaltikpumpe zu 1 l Renaturierungspuffer unter ständigem Rühren zugegeben. Anschließend wurde die Lösung mit dem renaturierten Tim-4-IgV Protein in einer Ultrafiltrationsrührzelle (350 ml Volumen) durch eine Ultrafiltration Cellulose Membran mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa (Millipore, Eschborn) auf 100 ml konzentriert. Eine weitere Konzentrierung erfolgte mittels Vivaspin 20 Konzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa (Sartorius, Göttingen) auf ein Endvolumen von 1 ml. Der Austausch des Puffers in PBS wurde über eine Nap-10 Säule (GE Healthcare, München) durchgeführt. Die abschließende Reinigung des Tim-4-IgV Proteins erfolgte über Größenausschlusschromatographie, wobei

die Bestandteile einer proteinhaltigen Lösung der Größe nach voneinander getrennt wurden. Verwendet wurde eine Superdex75 16/60 Säule in dem FPLC-ÄKTA Explorer Proteinreinigungssystem (GE Healthcare, München). Die Säule wurde mit 150 ml PBS äquilibriert und mit 2 ml der Proteinlösung beladen. Die Elution erfolgte mit 120 ml PBS bei einer Flussrate von 3 ml/min und gleichzeitiger Detektion der Absorption bei 280 nm. Das Eluat wurde in jeweils 3 ml Fraktionen gesammelt und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt und mittels Vivaspin20 Konzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa (Sartorius, Göttingen) auf 1 ml konzentriert. Die Konzentration der Proteinlösung wurde spektrometrisch mit Hilfe des Photometers NanoDrop ND-1000 (Peqlab Biotech., Erlangen) bestimmt und auf 1 mg/ml eingestellt.

### 3.3.2 Immunisierung und Generierung von Hybridomzellen

Ein genehmigter Tierantrag für die Herstellung monoklonaler Antikörper zum Nachweis von humanem Tim-4 war vorhanden (Tierantragsnummer: V312-72241.121-3). C57BL/6N Mäuse (Charles River, Köln) wurden mit 100 µg des Tim-4-IgV Proteins zusammen mit 40 µl von Gerbu Adjuvant MM (Gerbu Biotechnik, Heidelberg) intraperitoneal (i.p.) immunisiert. Zur Verstärkung der Immunantwort wurde den Mäusen am Tag 7, 14 und 21 zusätzlich 50 µg Tim-4-IgV und 20% des Adjuvantes i.p. verabreicht. Am Tag 28 und 29 wurden die letzten zwei Dosen (50 µg) des Tim-4-IgV Peptids verabreicht. Am Tag 30 wurden die Milzzellen einer immunisierten Maus mit den Ag8.653 Myelomzellen fusioniert. Die fusionierten Hybridomazellen wurden im Selektionsmedium (Sigma Aldrich, Deisenhofen) für 10 Tage kultiviert. Die Immunisierung der Mäuse sowie die Fusionierung und Kultivierung der Hybridomazellen wurde von Dr. Ahmad Trad, Biochemisches Institut, CAU Kiel durchgeführt. Anschließend wurden Tim-4 Antikörperproduzierende Hybridomazellklone mittels ELISA selektiert.

### 3.3.3 Reinigung der anti-Tim-4 Antikörper

Die zwei Tim-4 antikörperproduzierenden Hybridomazelllinien T27-AK2 und T27-AK3 wurden im Hybridomazellanzuchtmedium auf jeweils 20 Zellkulturschalen (10 cm) expandiert. Für die Produktion der Antikörper wurden die Zellen im serumfreien Hybridomazellmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Begasung kultiviert. Nach zwei Wochen wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und Zellen und Zelltrümmer durch Zentrifugation für 10 min, bei 4.000 rpm entfernt. Anschließend wurden die Hybridomazellkulturüberstände (jeweils 400 ml) in einer Ultrafiltrationsrührzelle (350 ml Volumen) durch eine Ultrafiltration Cellulose Membran mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa (Millipore, Eschborn) auf 75 ml konzentriert. Eine weitere Konzentrierung erfolgte mittels Vivaspin 20 Konzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa (Sartorius, Göttingen) auf ein Endvolumen von 5 ml. Die antikörperhaltige Lösung wurde durch einen 0,2 µm Filter (LGG, Meckenheim) sterilfiltriert. Die Reinigung der Antikörper aus den Hybridomazellkulturüberständen erfolgte durch Affinitätschromatographie mittels der HiTrap Protein G HP Säule in dem ÄKTA-FPLC Proteinreinigung System (GE Healthcare, München) entsprechend den Herstellerangaben. Die Säule wurde mit 50 ml Bindungspuffer (20 mM NaHPO<sub>4</sub>, 8,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0) äquilibriert und mit 5 ml der Antikörperlösung beladen. Zur Entfernung von unspezifisch gebundenen Proteinen und anderen Lösungsbestandteilen wurde die Säule mit 150 ml PBS gespült. Anschließend wurden die Antikörper mit 20 ml Elutionspuffer (0,1 M Glycin, pH 2,7) in jeweils 1,8 ml-große Fraktionen eluiert und mit 200 µl Neutralisationspuffer (1 M Tris-HCl, pH 9,0) neutralisiert. Bei der Elution erfolgte gleichzeitig die Detektion der Absorption bei 280 nm und die entsprechenden antikörperhaltigen Fraktionen wurden miteinander vereinigt. Die Konzentrierung der Lösung erfolgte mittels Vivaspin20 Konzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa (Sartorius, Göttingen) auf 2,5 ml. Anschließend wurde der Puffer mittels Nap-10 Säulen (GE Healthcare, München) gegen PBS ausgetauscht. Die Konzentration der Antikörperlösungen wurde spektrometrisch mit Hilfe des Photometers NanoDrop ND-1000 (Peqlab Biotech., Erlangen) bestimmt und für T27-2 auf 1 mg/ml und für T27-3 auf 0,5 mg/ml eingestellt. Für die Identifizierung des Isotypes von T27-2 wurde das Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit (Thermo Scientific Pierce, Perbio, Bonn, D) benutzt. Der festgestellte Isotyp des T27-AK2 Antikörpers war IgG2a.

### **3.3.4 Antikörper-Biotinylierung**

Die Biotinylierung der T27-2 und T27-3 Antikörper erfolgte mittels eines Biotinylierungskits (Thermo Scientific, Bonn) entsprechend den Herstellerangaben. Für die Biotinylierung wurde 1 mg des jeweiligen Antikörpers verwendet.

## **3.4 Biochemische Methoden**

### **3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die elektrophoretische Größentrennung von Proteinen erfolgte mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit dem Mini-Protean Elektrophorese System (Bio-Rad Laboratories, München) bei 120-180 V. Die Proben wurden mit reduzierendem 5 x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Polyacrylamidgele wurden anschließend entweder für Western Blot verwendet oder mit Coomassie-Färbelösung gefärbt.

### **3.4.2 Western Blot**

Die mittels SDS-PAGE voneinander getrennten Proteine wurden in einem Wet-Blot Criterion Blotter System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) von den Polyacrylamidgele auf eine PVDF-Membran (GE Healthcare, München) bei 100 V und 400 mA für 2 h transferiert. Die Membran wurde mit Blockingpuffer für 60-120 min bei RT geblockt und mit dem ersten Antikörper (T27-AK2, Tim-1 oder  $\beta$ -Aktin) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran drei Mal mit TBS-T gewaschen und für 1-2 h mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus-POD) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T wurden die Proteinbanden mit dem Detektionssystem FluorChem Q (AlphaInnotech, Kasendorf) entsprechend den Herstellerangaben visualisiert. Für die Detektion wurden die ECL-Lösungen SuperSignal West Pico oder Femto eingesetzt (Thermo Scientific, Bonn).

### 3.4.3 Alkalische Phosphatase Assay

Für die Quantifizierung der Spaltung der Tim-1- und Tim-4-Ektodomänen wurde ein Alkalische Phosphatase (AP) Assay durchgeführt [133]. Dafür wurden HEK293 Zellen mit den für die Fusionsproteine AP-Tim-1 und AP-Tim-4 kodierenden Plasmiden transient transfiziert. Die Stimulation erfolgte wie in 3.2.5. beschrieben. Für die Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität wurden jeweils 50 µl des Überstandes und des 1:10 verdünnten Lysats (5 µl Lysat + 45 µl serumfreies Medium) mit 50 µl des AP-Reaktionspuffers in einer 96-Well Platte gemischt. Die Alkalische Phosphatase entfernt eine Phosphatgruppe von dem p-Nitrophenylphosphate (pNPP) wodurch dieses zu p-Nitrophenol umgewandelt wird. Die Menge des p-Nitrophenols kann durch die Messung der Absorption bei 405 nm bestimmt werden und ist direkt proportional zu der Aktivität der AP. Die AP-Aktivität der löslichen AP-Tim-1 und AP-Tim-4 Proteine wurde durch ein Verhältnis der AP-Aktivität im Überstand relativ zu der gesamten AP-Aktivität (Summe der AP-Aktivität im Überstand (S) und Lysat (L)) berechnet: AP-Aktivität = [S/(S+L)].

### 3.4.4 Durchflusszytometrie

Die Expression der Proteine auf der Zelloberfläche wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen für 5 min bei  $0,2 \times g$  zentrifugiert, in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und mit 0,75 - 2 µg der primären Antikörper oder den entsprechenden Isotypkontrollen für 60 min bei 4°C inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden durch zwei Waschschritte mit dem FACS-Puffer entfernt. Dabei wurden die Zellen in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und für 5 min bei  $200 \times g$  und 4°C zentrifugiert. Bei einer Doppelfärbung (ungekoppelte Antikörper) wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer mit dem sekundären Antikörper (1:100, anti-Maus-APC, Dianova, Hamburg) aufgenommen und für weitere 60 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss an zwei weitere Waschschritte wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometriegerät FACSCanto (BD Biosciences, Heidelberg) analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels FACS DIVA Software (BD Biosciences, Heidelberg).

### 3.4.5 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden  $1*10^5$  Zellen (Makrophagen oder HEK293-Tim-4) auf Deckgläschen in 12-Well-Platten ausgesät. Nach 24 bis 48 h wurden die Zellen mit Ionomycin (1  $\mu$ M) oder BzATP (500  $\mu$ M) für 30 min oder mit PMA (100 nM) für 60 min stimuliert. Wenn die Plasmamembran der Zellen angefärbt werden sollte, wurde 10 min vor Ende der Stimulation 5  $\mu$ g/ml WGA-FITC (*wheat germ agglutinin* gekoppelt an FITC) zu den Zellen zugegeben. WGA-FITC bindet an spezifische Glykoproteine mit Salinsäureresten, welche sich in der Plasmamembran befinden. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4%igen Paraformaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Bei einigen Präparaten wurde danach eine Permeabilisierung der Zellmembran mit Hilfe von PBS versetzt mit 0,5% Triton X-100 für 5 min durchgeführt. Um freie Bindungsstellen zu besetzen, wurden die Makrophagen-Präparate mit humanem Serum (Plasmaphase, siehe 3.2.6) und die HEK293-Zellpräparate mit 5%iger BSA-Lösung in 1 x PBS für 1 h bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit primären Antikörpern (5  $\mu$ g/ml von T27-2/Isotyp IgG<sub>2a</sub>) für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS-T (1 x PBS, 0,2% Tween 20) für 5 min gewaschen und mit sekundären Antikörpern (anti-Maus DyLight-649; 1:500 verdünnt) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS-T gewaschen und auf Objektträgern im DAPI-Mounting-Medium eingebettet. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskop IX81 und der Olympus Fluoview FV1000 Software (Olympus, Hamburg).

### 3.4.6 Antikörper-Screen ELISA

Zur Untersuchung der Hybridomazellkulturüberstände wurde ein ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) durchgeführt. Eine 96-Well Platte wurde mit 5  $\mu$ g/ml Tim-4-IgV bzw. Tim-3-IgV (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Katja Möller-Hackbarth, Biochemisches Institut, CAU Kiel) Protein beschichtet. Die freien Bindungsstellen wurden mit 200  $\mu$ l pro Well einer 1%igen Caseinlösung in 1 x PBS abgeblockt. Nach zweistündiger Inkubation des primären Antikörpers (70  $\mu$ l der Hybridomüberstände) wurde die 96-Well

Platte drei Mal mit PBS-T gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus-HRP, 1:3.000 verdünnt) für 2 h bei RT, wobei 50 µl pro Well eingesetzt wurden. Anschließend wurden die ungebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Darauffolgend wurden 50 µl pro Well des Peroxidase-Substrates (BM Blue POD Substrate, Roche, Mannheim) zugegeben. Die Reaktion wurde mit 50 µl einer 1,8 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Lösung gestoppt und die Absorption bei 450 nm in einem Mikrotiterplattenleser (Rainbow Tecan, Crailsheim) gemessen.

### 3.4.7 Phospholipid-ELISA

Die Untersuchung der Interaktion von löslichen Tim-1 und Tim-4 Proteinen mit Phosphatidylserin erfolgte über einen Phospholipid-ELISA [14]. Dafür wurde eine 96-Well Platte mit 10 µg/ml Phosphatidylserin (PS) oder Phosphatidylcholin (PC) (Sigma Aldrich, Deisenhofen) verdünnt in Methanol beschichtet. Die Platte wurde bei Raumtemperatur für 1 h getrocknet und die freien Bindestellen mit 1% BSA in PBS geblockt. Die Zellkulturüberstände mit löslichen Tim-1 und Tim-4 Proteinen wurden zugegeben und bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Platte drei Mal mit PBS-T gewaschen und mit biotinylierten Detektionsantikörpern (10 µg/ml T27-2-biot. bzw. 0,5 µg/ml Anti-Tim-1-biot.) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Anschließend wurde das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (1:200 verdünnt, R&D Systems Europe, Abingdon, England) zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 x mit PBS-T) erfolgte die Zugabe von 90 µl pro Well des Peroxidasesubstrates (BM Blue POD Substrate, Roche, Mannheim). Die Reaktion wurde mit 90 µl einer 1,8 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Lösung gestoppt und die Absorption bei 450 nm in einem Mikrotiterplattenleser (Rainbow Tecan, Crailsheim) gemessen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Generierung der Expressionsplasmide für Tim-1 und Tim-4

Für die Untersuchung der proteolytischen Abspaltung der Ektodomänen (*Shedding*) von Tim-1 und Tim-4 durch ADAM-Proteasen wurden zunächst Plasmide für die Expression von rekombinanten Tim-1 und Tim-4 Proteinen in Säugetierzellen erstellt. Dafür wurden die entsprechenden kodierenden Sequenzen (CDS) von Tim-1 und Tim-4 in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Darmstadt) kloniert. Um die Tim-1 CDS zu erhalten wurden Nierenkarzinomzellen (769-P) benutzt, welche endogenes Tim-1 exprimieren. Aus den 769-P Zellen wurde zunächst mRNA isoliert und für cDNA-Synthese mittels RT-PCR eingesetzt. Anschließend wurde aus der cDNA die Tim-1 CDS mit dem Primerpaar h1-full-CDS-EcoRI-for und h1-full-CDS-NotI-rev mittels PCR amplifiziert. Das erstellte Insert wurde mit *Eco*RI und *Not*I restringiert und in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kloniert. Das entstandene Plasmid wurde pcDNA3.1-Tim-1 genannt (Abb. 9.1.1).

Die Tim-4 CDS (ohne Signalpeptid-Sequenz) wurde aus dem Puc57-hTim-4 (synthetisiert bei GENEART, München) mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Af*II und *Not*I gespalten und in den Vektor pcDNA3.1(+-)HmIL23-6xHis (zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. Doreen M. Floß) subkloniert. In dem Vektor war ein Signalpeptid der murinen Immunoglobulin κ-Kette sowie ein N-terminaler FLAG-Tag und ein C-terminaler 6xHis-Tag enthalten. Das generierte Plasmid wurde als pcDNA3.1-FLAG-Tim-4-6xHis bezeichnet (Abb. 9.1.5).

Für die Expression des Fusionsproteins AP-Tim-4 (AP: Alkalische Phosphatase) wurde die CDS der AP aus dem Plasmid PCRscript-AP-TGF $\alpha$  mit *Hind*III restringiert und in den Vektor pcDNA3.1-FLAG-Tim-4-6xHis vor der FLAG-Sequenz kloniert. Der generierte Vektor wurde pcDNA3.1-AP-Tim-4 genannt (Abb. 9.1.7). Für die Herstellung des Fusionsproteins AP-hTim-1 wurde die Tim-1 CDS mit den Primern Tim-1-*Af*II-for und Tim-1-*Not*I-rev, sowie dem pcDNA3.1-Tim-1 Vektor als Template, amplifiziert. Anschließend wurde das Insert über die Schnittstellen *Af*II und *Not*I in den Vektor pcDNA3.1-AP-Tim-4 subkloniert. Das entstandene Plasmid wurde pcDNA3.1-AP-Tim-1 genannt (Abb. 9.1.3).

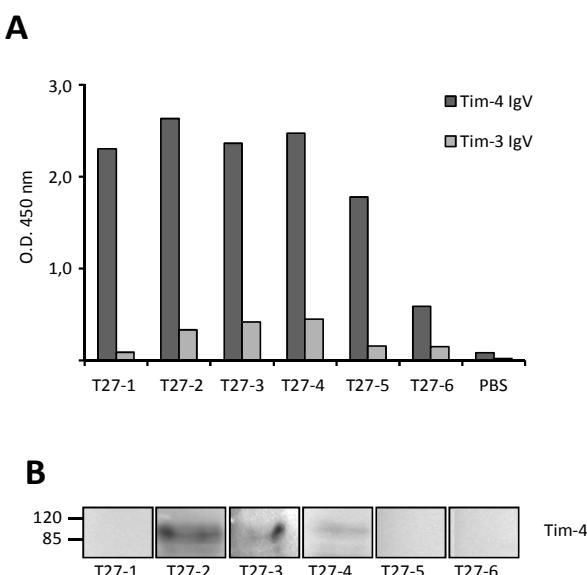
Weiterhin wurden Deletionsmutanten von Tim-1 und Tim-4 erstellt. Die Deletion von F282 bis T289 in der Tim-1 CDS (Tim-1  $\Delta$ 282-288 (FLEHSLL)) wurde mittels SOE-PCR durchgeführt (Siehe 3.1.3). Im ersten Schritt wurden zwei DNA-Fragmente mit den Primerpaaren Tim1- $\Delta$ 1-for und h1-full-CDS-NotI-rev sowie mit h1-full-CDS-EcoRI-for und Tim1- $\Delta$ 1-rev hergestellt. Im zweiten Schritt wurden die beiden DNA-Fragmente mit dem Primerpaar h1-full-CDS-EcoRI-for und h1-full-CDS-NotI-rev zu dem Tim-1  $\Delta$ 282-288 Insert kombiniert. Anschließend wurde das Insert (Tim-1  $\Delta$ 282-289) über die Schnittstellen EcoRI und NotI in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kloniert. Das resultierende Plasmid wurde als pcDNA3.1-Tim-1  $\Delta$ 282-288 bezeichnet (Abb.9.1.2). Für die Herstellung des AP-Tim-1- $\Delta$ 282-288 Fusionsproteins wurde das Tim-1  $\Delta$ 282-288 Insert mit dem Primerpaar Tim-1-AfII-for und Tim-1-NotI-rev aus dem pcDNA3.1-Tim-1  $\Delta$ 282-288 Vektor amplifiziert. Anschließend wurde das DNA-Fragment mit den Restriktionsendonukleasen AfII und NotI gespalten und in den Vektor pcDNA3.1-AP-Tim-4 subkloniert. Der hergestellte Vektor wurde als pcDNA3.1-AP-Tim-1  $\Delta$ 282-288 bezeichnet (Abb.9.1.4).

Die Herstellung von Tim-4 Mutanten erfolgte ebenfalls mittels SOE-PCR. Dabei wurden jeweils 10 Aminosäuren von M304 zu S313 ( $\Delta$ 304-313), von T294 zu P303 ( $\Delta$ 294-303) und von D284 zu T293 ( $\Delta$ 284-293) deletiert. Im ersten Schritt der SOE-PCR wurden pro Mutante zwei DNA-Fragmente erstellt. Dafür wurden neben den flankierenden Primern (Tim-4-AfII-for und Tim-4-NotI-rev) für die Mutante  $\Delta$ 304-313 das Primerpaar AP-Tim-4- $\Delta$ 1for und AP-Tim-4- $\Delta$ 1rev, für die Mutante  $\Delta$ 294-303 das Primerpaar AP-Tim-4- $\Delta$ 2for und AP-Tim-4- $\Delta$ 2rev und für die Mutante  $\Delta$ 284-293 das Primerpaar AP-Tim-4- $\Delta$ 3for und AP-Tim-4- $\Delta$ 3rev eingesetzt. Im zweiten Schritt wurden die zwei generierten DNA-Fragmente für jede Mutante mit dem flankierenden Primerpaar Tim-4-AfII-for und Tim-4-NotI-rev zu den Tim-4  $\Delta$ 304-313,  $\Delta$ 294-303 oder  $\Delta$ 284-293 Inserts kombiniert. Anschließend wurden die jeweiligen Inserts mit AfII und NotI restriktiert und in den Vektor pcDNA3.1-AP-Tim-4 kloniert. Die resultierenden Plasmide wurden pcDNA3.1-AP-Tim-4  $\Delta$ 304-313, pcDNA3.1-AP-Tim-4  $\Delta$ 294-303 und pcDNA3.1-AP-Tim-4  $\Delta$ 284-293 genannt (Abb.9.1.8). Für die Generierung von Tim-4 Mutanten ohne eine Fusion mit AP wurden die Inserts mit Hilfe von AfII und NotI in den pcDNA3.1(+) Vektor subkloniert. Die hergestellten Vektoren wurden pcDNA3.1-FLAG-Tim-4 pcDNA3.1-FLAG-Tim-4  $\Delta$ 304-313, pcDNA3.1-FLAG-Tim-4  $\Delta$ 294-303 und pcDNA3.1-FLAG-Tim-4  $\Delta$ 284-193 genannt (Abb.9.1.6).

Für die Deletion der intrazellulären Domäne in den Tim-1 und Tim-4 Proteinen (Tim-1 ΔICD: von A316 zu D364 und Tim-4 ΔICD: von R337 zu L378) wurden die Primer Tim-1-for-AfII, AP-Tim-1-ΔICD-rev, Tim-4-for-AfII und AP-Tim4-ΔICD-rev eingesetzt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden über die Restriktionsschnittstellen *Af*II und *Not*I in den Vektor pcDNA3.1-AP-Tim4 kloniert. Die entstandenen Plasmide wurden pcDNA3.1-AP-Tim-1 ΔICD und pcDNA3.1-AP-Tim-4 ΔICD genannt (Abb.9.1.9 und 9.1.10).

## 4.2 Herstellung der gegen Tim-4 gerichteten monoklonalen Antikörper

Die Herstellung der monoklonalen Tim-4 Antikörper wurde wie unter Punkt 3.3 beschrieben, durchgeführt. Die Selektion der Tim-4 antikörperproduzierenden Hybridomazellklone erfolgte mittels ELISA (siehe 3.4.6). Die ELISA Platte wurde mit dem Tim-4-IgV Protein oder dem Kontrollprotein, Tim-3-IgV, beschichtet. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände der Hybridomazellklone untersucht. In den Überständen von 6 Hybridomazellklonen (T27-1 bis T27-6) waren Tim-4 Antikörper vorhanden, welche spezifisch an das Tim-4-IgV und nicht an das Tim-3-IgV Protein gebunden haben (Abb. 4.2.1 A).

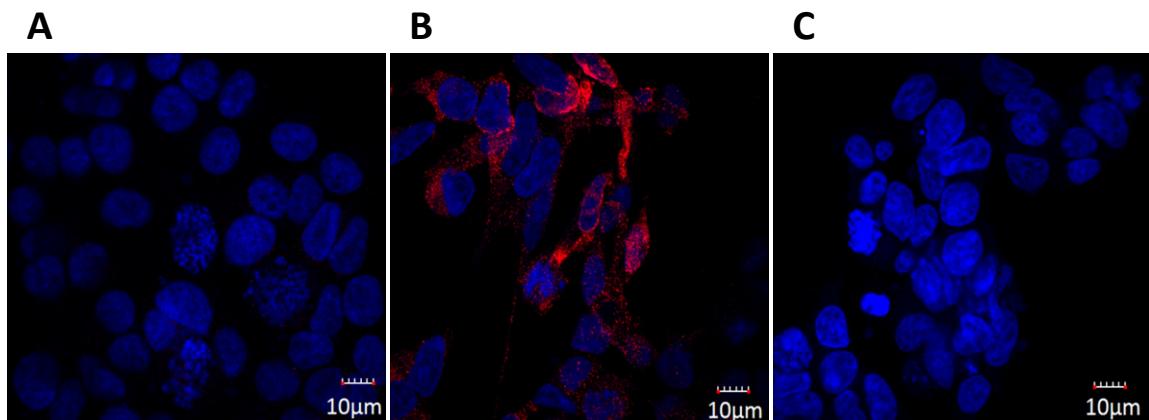


**Abb. 4.2.1** Antigenerkennung der antikörperhaltigen Hybridomazellkulturüberstände im ELISA und Western Blot

(A) Die antikörperhaltigen Überstände der Hybridomazellklone (T27-1 bis T27-6) wurden mittels ELISA auf die Erkennung des Tim-4-IgV Proteins untersucht. Das Tim-3-IgV Protein wurde als Kontrolle eingesetzt. (B) Die antikörperhaltigen Überstände der Hybridomazellklone wurden mittels Western Blot auf die Erkennung des in HEK293 exprimierten Tim-4 (Lysat) untersucht.

Weiterhin wurde die Bindung von monoklonalen Antikörpern an das in HEK293 Zellen exprimierte Tim-4 Protein mittels Western Blot untersucht. Wie in Abb. 4.2.1 B dargestellt, haben die Antikörper der Hybridomazellklone T27-2, T27-3 und T27-4 an das rekombinante Tim-4 Protein gebunden. Die Antikörper T27-2 und T27-3 wurden gereinigt und für weitere Untersuchungen in dieser Arbeit eingesetzt.

Ferner wurde untersucht, ob der T27-2 Antikörper für eine Immunfluoreszenzfärbung von fixierten Zellen geeignet ist. Hierfür wurden HEK293 und stabil transfizierte HEK293-Tim-4 Zellen eingesetzt. Mit Hilfe von T27-2 konnte Tim-4 in transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb.4.2.2 A-B), wobei die Isotypkontrolle (Abb.4.2.2 C) kein Signal aufwies.

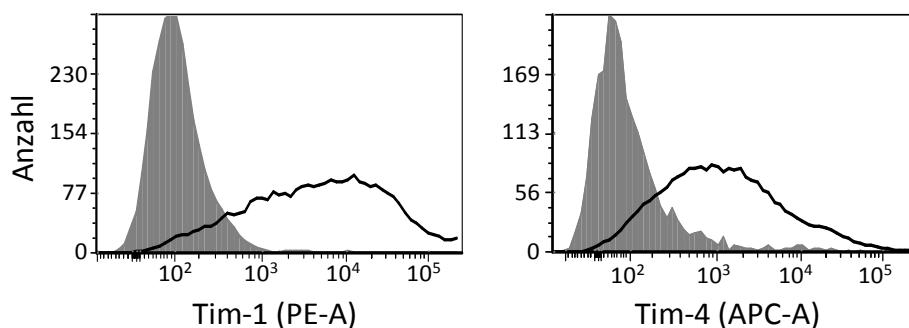


**Abb. 4.2.2 Immunfluoreszenzfärbung mit T27-2 (anti-Tim-4 Antikörper)**

(A-C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HEK293 oder stabil transfizierte HEK293-Tim-4 Zellen. Immunfluoreszenzfärbung mit dem T27-2 oder der Isotypkontrolle IgG<sub>2a</sub> sowie dem sekundärem anti-maus-649 Antikörper und DAPI. (A) HEK293 Zellen gefärbt mit T27-2 und anti-Maus-649 (rot) und DAPI (blau). (B-C) HEK293-Tim-4 Zellen wurden mit T27-2 (B) oder Isotypkontrolle IgG<sub>2a</sub> (C) und anti-Maus-649 Antikörpern und mit DAPI gefärbt. Sequenzielle Aufnahmen mit einem 60x-Objektiv und einer numerischen Apertur von 1,35.

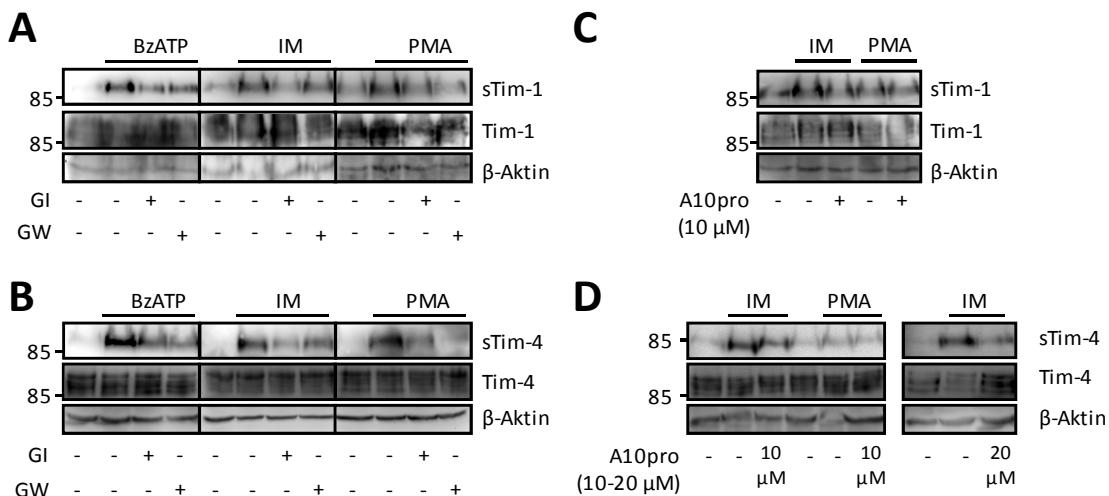
### 4.3 Induzierte proteolytische Freisetzung von löslichem Tim-1 und Tim-4 durch ADAM-Proteasen

Die lösliche Tim-1 Variante wird bei Nierenerkrankungen (akuter Nierenschaden oder Nierenzellkrebs) in den Urin abgesondert und dient als ein zuverlässiger Biomarker bei der Diagnose von Nierenerkrankungen [6, 66]. Untersuchungen haben gezeigt, dass das lösliche Tim-1 durch proteolytische Spaltung entsteht, an welcher Metalloproteasen beteiligt sind [66]. Das Ziel dieser Arbeit bestand unter anderem darin, die Tim-1-spaltende Metalloprotease zu identifizieren. Zusätzlich wurde untersucht, ob Tim-4 ebenfalls der proteolytischen Spaltung unterliegt und welche Protease in diesen Prozess involviert ist. Für die Analyse der induzierten proteolytischen Spaltung von membranständigen Tim-1 und Tim-4 wurden HEK293 Zellen eingesetzt, welche mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert wurden. Die Oberflächenexpression wurde mittels Durchflusszytometrie verifiziert (Abb.4.3.1).



**Abb. 4.3.1 Oberflächenexpression von Tim-1 und Tim-4 auf transient transfizierten HEK293 Zellen**  
 Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von Tim-1 und Tim-4 in transient transfizierten HEK293 Zellen. Für die Detektion von Tim-1 wurde der Tim-1-PE Antikörper (schwarz), sowie die entsprechende Isotypkontrolle (IgG<sub>1</sub>-PE, grau) eingesetzt. Tim-4 wurde mit Hilfe von T27-2 (schwarz) / Isotypkontrolle (IgG<sub>2a</sub>, grau) und dem sekundären anti-Maus-APC Antikörper nachgewiesen.

Als nächstes wurden die transient transfizierten HEK293-Tim-1 und Tim-4 Zellen wie unter Punkt 3.2.5 beschrieben stimuliert. Die spezifischen Inhibitoren, ADAM10 Inhibitor GI254023X (GI, 3  $\mu$ M), ADAM10 und ADAM17 Inhibitor GW280264X (GW, 3  $\mu$ M) und der ADAM10 Inhibitor ADAM10-Prodomäne (proA10, 10-20  $\mu$ M), wurden 30 min vor der Stimulation zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit BzATP (500  $\mu$ M) für 30 min, mit Ionomycin (5  $\mu$ M) für 30 min oder mit PMA (100 nM) für 60 min stimuliert. Die Zellkulturüberstände und Zelllysate wurden mittels Western Blot auf das Vorhandensein von Tim-1 und Tim-4 analysiert.



**Abb. 4.3.2 Induziertes *Shedding* von Tim-1 und Tim-4 in transient transfizierten HEK293 Zellen**

Transient transfizierte HEK293-Tim-1 (A und C) und HEK293-Tim-4 (B und D) Zellen wurden mit BzATP (500  $\mu$ M, 30 min), Ionomycin (5  $\mu$ M, 30 min) oder PMA (100 nM, 60 min) stimuliert. (A-D) Die Zugabe von Inhibitoren, ADAM10 Inhibitoren GI (3 $\mu$ M) und A10pro (10-20  $\mu$ M), ADAM10/17 Inhibitor GW (3  $\mu$ M) erfolgte 30 min vor der Stimulation. Die Überstände und Lysate wurden mittels Western Blot mit den Tim-1 oder T27-2 und dem  $\beta$ -Aktin Antikörpern analysiert. (sTim-1/Tim-4: lösliches Tim-1/Tim-4).

Nach einer Stimulation mit BzATP, Ionomycin und PMA wurde lösliches Tim-1 und Tim-4 in den Zellkulturüberständen detektiert (Abb.4.3.2 A und B). Die mit BzATP und Ionomycin induzierte Freisetzung von löslichen Tim-Proteinen wurde durch den ADAM10 Inhibitor GI fast vollständig und durch den ADAM10 und ADAM17 Inhibitor GW zum Teil gehemmt (Abb.4.3.2 A und B). Im Gegensatz dazu wurde das PMA-induzierte *Shedding* von Tim-1 und Tim-4 fast komplett durch den ADAM10 und ADAM17 Inhibitor GW und nur teilweise durch den ADAM10 Inhibitor GI gehemmt (Abb.4.3.2 A und B).

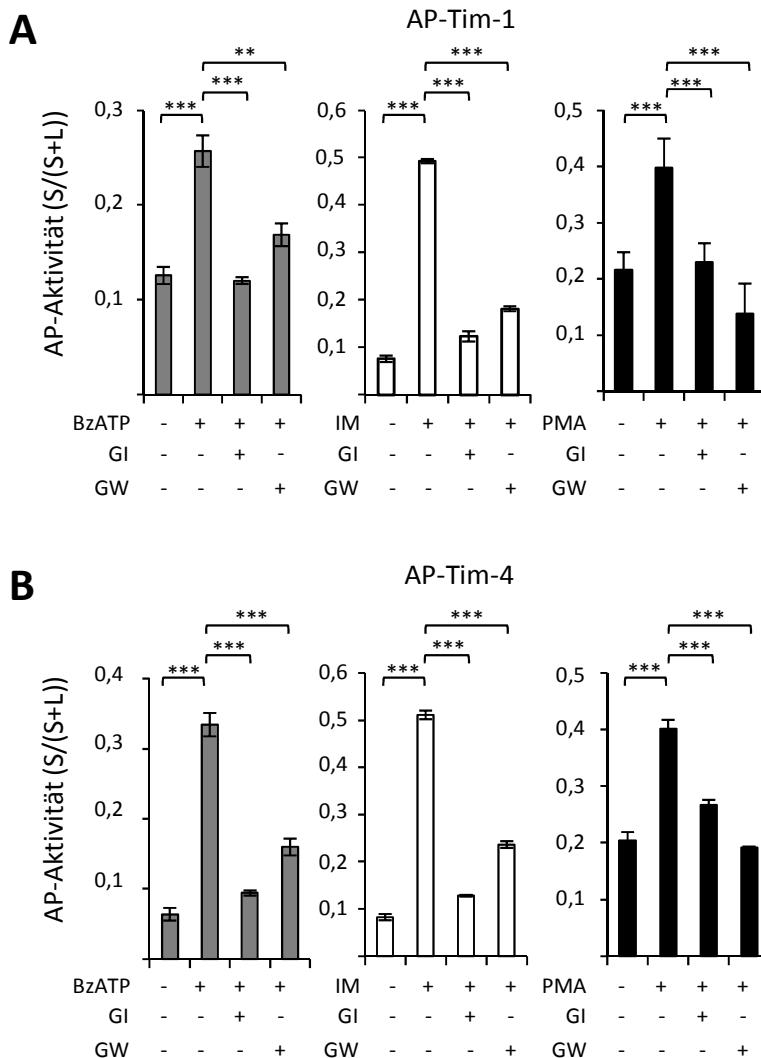
In weiteren Untersuchungen wurde die ADAM10 Prodomäne (A10pro) eingesetzt, welche spezifisch die ADAM10 Protease hemmt [106]. Die ADAM10 Prodomäne inhibierte komplett die Ionomycin-induzierte Generierung des löslichen Tim-1 (Abb.4.3.2 C). Das Ionomycin-induzierte *Shedding* von Tim-4 wurde dagegen erst durch eine höhere Konzentration der ADAM10 Prodomäne blockiert (Abb.4.3.2 D). Die ADAM10 Prodomäne hatte keinen Einfluss auf das PMA-induzierte *Shedding* von Tim-1 und Tim-4, obwohl der ADAM10 Inhibitor GI teilweise das PMA-induzierte *Shedding* inhibierte (Abb.4.3.2 C und D).

### 4.4 Induzierte Generierung löslicher AP-Tim-1 und AP-Tim-4 Proteine durch ADAM-Proteasen

Mit Hilfe eines AP (Alkalische Phosphatase)-Assays ist es möglich, die proteolytische Spaltung von Membranproteinen quantitativ zu untersuchen. Dabei werden die zu untersuchenden Proteine N-terminal mit einer Alkalischen Phosphatase fusioniert. Die AP-Aktivität von membranständigen und freigesetzten löslichen Proteinen kann photometrisch gemessen und für die Quantifizierung des *Shedding* herangezogen werden [133].

HEK293 Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden, welche für die Fusionsproteine AP-Tim-1 und AP-Tim-4 kodieren, transient transfiziert. Die Verifizierung der Oberflächenexpression dieser Fusionsproteine erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Abb.4.6.2 A und 4.6.4 A). Für die Analyse von induziertem *Shedding* wurden die Zellen wie im Punkt 3.2.5 beschrieben stimuliert. Anschließend wurden die Überstände und Lysate in einem AP-Assay untersucht.

Nach einer Stimulation mit BzATP, Ionomycin und PMA wurde eine signifikant erhöhte AP-Aktivität von löslichen AP-Tim-1 und AP-Tim-4 Proteinen im Überstand gemessen (Abb. 4.4.1 A und B). Die inhibitorische Wirkung des ADAM10 Inhibitors GI und des ADAM10 und ADAM17 Inhibitors GW führte zu einer signifikanten Reduktion der BzATP-, Ionomycin- und PMA-induzierten Freisetzung der löslichen AP-Tim-1 und AP-Tim-4 Proteine. Beide eingesetzten Inhibitoren haben das induzierte *Shedding* von Tim-1 und Tim-4 gehemmt. Der ADAM10 Inhibitor GI inhibierte das BzATP- und Ionomycin-induzierte *Shedding* jedoch stärker als der ADAM10 und ADAM17 Inhibitor GW. Die PMA-induzierte Spaltung der AP-Tim-1 und AP-Tim-4 Ektodomänen wurde dagegen stärker durch den ADAM10 und ADAM17 Inhibitor GW als durch den ADAM10 Inhibitor GI gehemmt (Abb.4.4.1 A und B).



**Abb. 4.4.1 Induziertes *Shedding* von AP-Tim-1 und AP-Tim-4 Fusionsproteinen in transient transfizierten HEK293 Zellen**

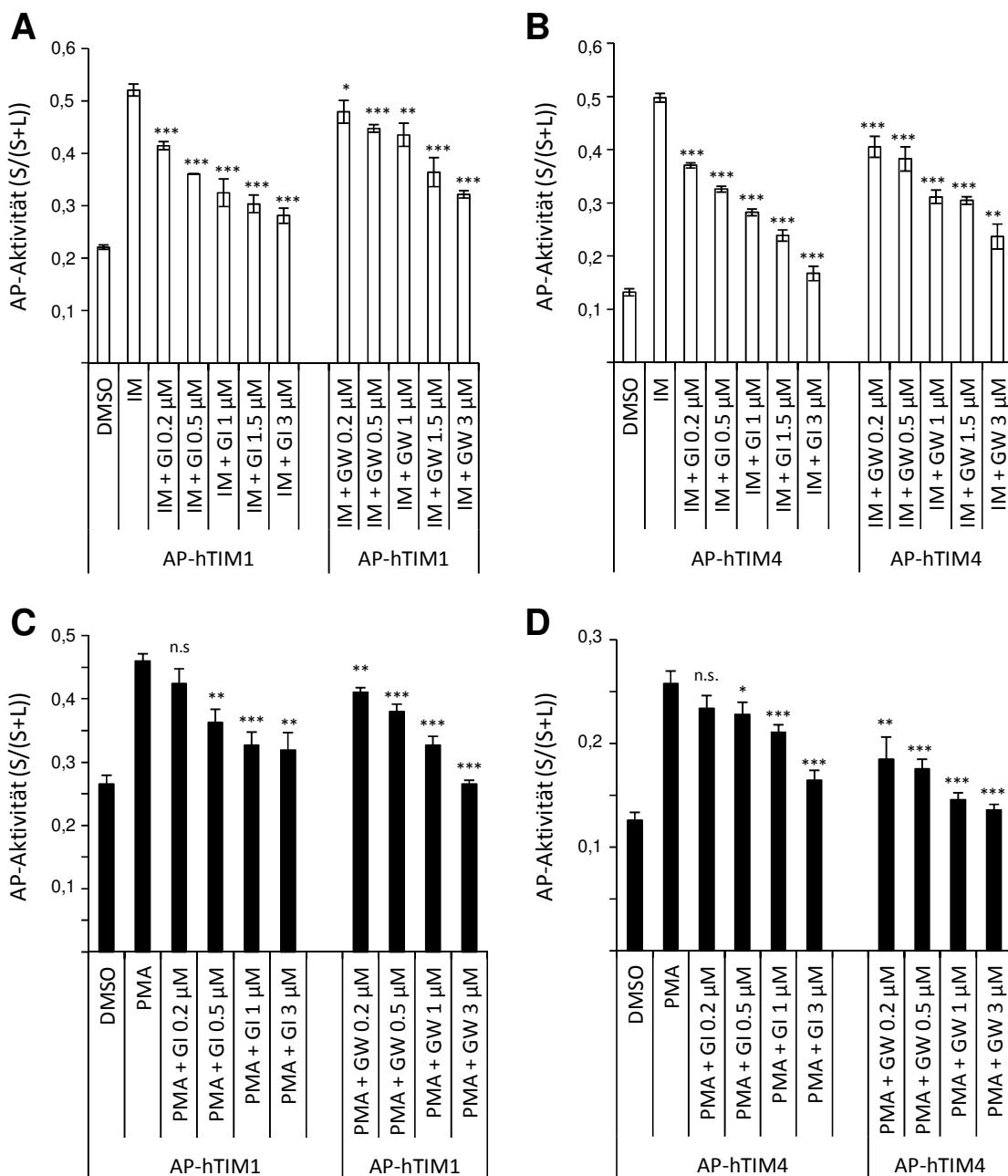
Transient transfizierte HEK293-AP-Tim-1 (A) und HEK-AP-Tim-4 (B) Zellen wurden mit BzATP (500  $\mu$ M, 30 min), Ionomycin (5  $\mu$ M, 30 min) oder PMA (100 nM, 60 min) stimuliert. Die Zugabe von Inhibitoren, ADAM 10 Inhibitor GI (3  $\mu$ M), ADAM10 und ADAM17 Inhibitor GW (3  $\mu$ M) erfolgte 30 min vor der Stimulation. Die Überstände und Lysate wurden in einem AP-Assay analysiert. Die AP-Aktivität wurde als ein Verhältnis der AP-Aktivität im Überstand relativ zu der gesamten AP-Aktivität (Überstände + Lysate) berechnet. Die Werte repräsentieren Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) eines repräsentativen Experimentes (n=3); \*\* = p<0,01, \*\*\* = p< 0,001 (ungepaarter Student's t-Test).

Obwohl GI eine schwächere Wirkung gegenüber von GW zeigte, konnte eine signifikante Reduzierung der PMA-induzierten Spaltung von AP-Tim-1 und AP-Tim-4 durch den ADAM10 Inhibitor GI gezeigt werden. PMA aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche dann in der Lage ist ADAM17 jedoch nicht ADAM10 zu aktivieren [144]. Deswegen lässt sich die Hemmung des PMA-induzierten *Sheddings* durch den ADAM10-spezifischen Inhibitor GI nicht eindeutig erklären (Abb.4.3.2 A und B und Abb.4.4.1 A und B).

Eine mögliche Erklärung stellt die eingesetzte Konzentration der Inhibitoren dar. Durch sehr hohe Konzentrationen der Inhibitoren könnten auch andere Proteasen beeinflusst worden sein. Deswegen kann die Spezifität der eingesetzten chemischen Inhibitoren bei hohen Konzentrationen nicht garantiert werden. In mehreren Studien wurde die Aktivität von ADAM10 und ADAM17 mit einer 3  $\mu$ M hohen Konzentration von GI und GW spezifisch gehemmt [115, 142]. In anderen Studien konnte dagegen die hohe Spezifität dieser Inhibitoren erst bei geringeren Konzentrationen (0,5 - 1  $\mu$ M) gezeigt werden [114, 155].

Aus diesen Gründen wurde für weitere Untersuchungen eine Konzentrationsreihe (von 0,2  $\mu$ M bis 3  $\mu$ M) der Inhibitoren eingesetzt (Abb.4.4.2). Es zeigte sich, dass das Ionomycin-induzierte *Shedding* von AP-Tim-1 und AP-Tim-4 dosisabhängig durch GI und GW gehemmt wurde (Abb.4.4.2 A und B). Die geringste Konzentration von GI und GW (0,2  $\mu$ M) führte zur signifikanter Reduzierung der AP-Aktivität nach IM-Stimulation. PMA-induziertes *Shedding* wurde ebenfalls dosisabhängig durch GI und GW gehemmt (Abb.4.4.2 C und D). Interessanterweise zeigte sich, dass die geringste Konzentration von GI (0,2  $\mu$ M) im Gegensatz zu GW (0,2  $\mu$ M) keine signifikante Hemmung der PMA-induzierten proteolytischen Spaltung aufwies. Hier zeigte sich, dass das PMA-induzierte *Shedding* von AP-Tim-1 und AP-Tim-4 nicht durch GI, aber sehr wohl durch GW bei einer Konzentration von 0,2  $\mu$ M gehemmt wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das AP-Tim-1 und AP-TIM-4 *Shedding* nach Ionomycin-Stimulation durch ADAM10 und nach PMA-Stimulation durch ADAM17 erfolgt.

Hier zeigte sich, dass das PMA-induzierte *Shedding* von AP-Tim-1 und AP-Tim-4 nicht durch GI, aber sehr wohl durch GW bei einer Konzentration von 0,2  $\mu$ M gehemmt wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das AP-Tim-1 und AP-TIM-4 *Shedding* nach Ionomycin-Stimulation durch ADAM10 und nach PMA-Stimulation durch ADAM17 erfolgt.



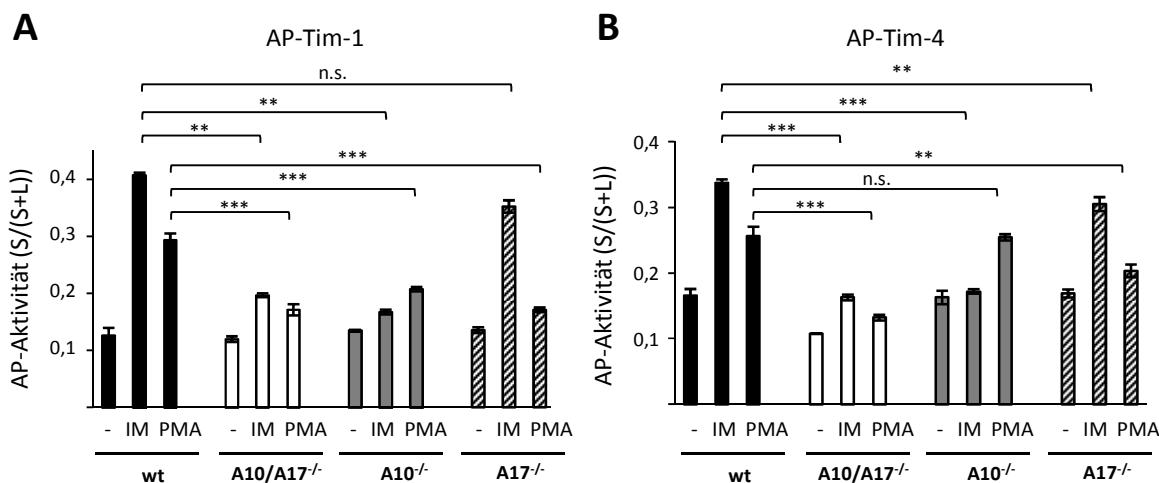
**Abb. 4.4.2 Induziertes *Shedding* von AP-Tim-1 und AP-Tim-4 Fusionsproteinen wird durch die geringen Konzentrationen der eingesetzten Inhibitoren gehemmt**

Transient transfizierte HEK293-AP-Tim-1 (A und C) und HEK-AP-Tim-4 (B und D) Zellen wurden mit Ionomycin (5 µM, 30 min) oder PMA (100 nM, 60 min) stimuliert. Die Zugabe von Inhibitoren, ADAM 10 Inhibitor GI (0,2 – 3 µM), ADAM10 und ADAM17 Inhibitor GW (0,2 - 3 µM) erfolgte 30 min vor der Stimulation. Die Überstände und Lysate wurden in einem AP-Assay analysiert. Die AP-Aktivität wurde als ein Verhältnis der AP-Aktivität im Überstand relativ zu der gesamten AP-Aktivität (Überstände + Lysate) berechnet. Die Werte repräsentieren Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) eines repräsentativen Experiments ( $n=2$ ); \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  (ungepaarter Student's t-Test).

Für die Identifikation der beteiligten Protease können neben den spezifischen Inhibitoren Zellen eingesetzt werden, welche defizient für die jeweilige Protease sind. ADAM10 und ADAM17 defiziente Mäuse sind nicht lebensfähig. Aus diesem Grund wurden aus den Embryonen der *Knockout*-Mäuse murine embryonale Fibroblasten (MEFs) gewonnen und anschließend immortalisiert [137, 156]. In weiteren Experimenten wurden MEFs, welche defizient für ADAM10 ( $ADAM10^{-/-}$ ), ADAM17 ( $ADAM17^{-/-}$ ) oder für ADAM10 und ADAM17 ( $ADAM10/17^{-/-}$ ) sind, eingesetzt. Die Zellen wurden für die Expression von AP-Tim-1 und AP-Tim-4 mit den entsprechenden Plasmiden transient transfiziert und anschließend mit Ionomycin oder PMA stimuliert.

Die Stimulation mit Ionomycin führte zu einem Anstieg der AP-Aktivität von löslichen AP-Tim-1 und AP-Tim-4 in den Überständen von Wildtyp und  $ADAM17^{-/-}$  MEFs. In  $ADAM10^{-/-}$  und  $ADAM10/17^{-/-}$  MEFs wurde eine signifikante Reduktion des *Shedding* von AP-Tim-1 und AP-Tim-4 nach Stimulation mit Ionomycin im Vergleich zu den Wildtyp MEFs festgestellt (Abb.4.4.3 A und B). Die Stimulation mit PMA induzierte das *Shedding* von AP-Tim-1 nur bei den Wildtyp MEFs. In den Überständen von  $ADAM10^{-/-}$ ,  $ADAM17^{-/-}$  sowie in  $ADAM10/17^{-/-}$  MEFs war die AP-Aktivität des löslichen AP-Tim-1 signifikant verringert im Vergleich zu den Wildtyp MEFs (Abb.4.4.3 A). Lösliches AP-Tim-4 wurde nach einer PMA-Stimulation bei den Wildtyp und  $ADAM10^{-/-}$  MEFs generiert. Im Vergleich dazu war das *Shedding* von AP-Tim-4 bei den  $ADAM17^{-/-}$  und  $ADAM10/17^{-/-}$  MEFs signifikant reduziert (Abb.4.4.3 B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass in das Ionomycin-induzierte *Shedding* von AP-Tim-1 und AP-Tim-4 in den MEFs ADAM10 involviert ist. Für AP-Tim-4 konnte gezeigt werden, dass ADAM17 an dem PMA-induziertem *Shedding* in den MEFs beteiligt ist. Die Ergebnisse für das PMA-induzierte *Shedding* von AP-Tim-1 sind dagegen nicht ganz eindeutig. Die proteolytische Spaltung von AP-Tim-1 war nach der PMA-Stimulation bei den  $ADAM17^{-/-}$  MEFs reduziert. Aber auch bei den  $ADAM10^{-/-}$  MEFs wurde eine signifikante Reduktion des AP-Tim-1 *Shedding* beobachtet. PMA aktiviert Proteinkinase C, welche anschließend ADAM17 aber nicht ADAM10 aktiviert [144]. Aus diesen Gründen ist das verringerte *Shedding* von AP-Tim-1 in den  $ADAM10^{-/-}$  MEFs nach einer PMA-Stimulation nach heutigem Wissensstand nicht zu erklären.



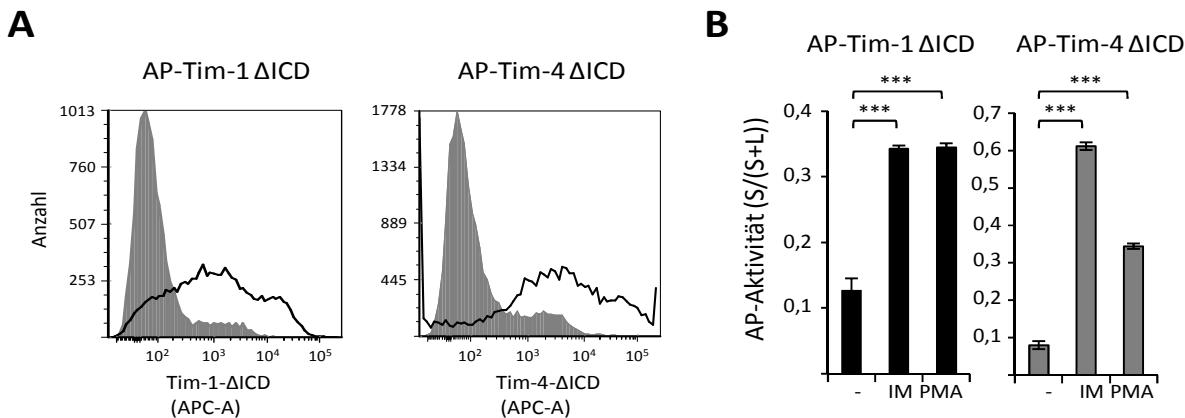
**Abb. 4.4.3 Induziertes *Shedding* der AP-Tim-1 und AP-Tim-4 Fusionsproteine in transient transfizierten MEFs**

(A-B) MEF Zellen (Wildtyp: wt, MEFs defizient für ADAM10: A10<sup>-/-</sup>, defizient für ADAM17: A17<sup>-/-</sup> und MEFs defizient für ADAM10 und ADAM17: A10/A17<sup>-/-</sup>) wurden mit den für AP-Tim-1 (A) und AP-Tim-4 (B) kodierenden Expressionsplasmiden transient transfiziert. Die Zellen wurden 48 h posttransfektional mit Ionomycin (5  $\mu$ M, 30 min) oder PMA (100 nM, 60 min) stimuliert. Überstände und Lysate wurden in einem AP-Assay analysiert. Die AP-Aktivität wurde als ein Verhältnis der AP-Aktivität im Überstand relativ zu der gesamten AP-Aktivität (Überstand + Lysate) berechnet. Die Werte repräsentieren Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) eines repräsentativen Experiments (n=3); n.s. = nicht signifikant, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p< 0,001 (ungepaarter Student's t-Test).

#### 4.5 Die intrazellulären Domänen von Tim-1 und Tim-4 haben keinen Einfluss auf ADAM-vermitteltes *Shedding*

Im folgendem wurde untersucht, ob die intrazelluläre Domäne (ICD) von Tim-1 und Tim-4 Proteinen eine Rolle bei der proteolytischen Spaltung durch ADAM-Proteasen spielt. Hierzu wurden HEK293 Zellen mit Expressionsplasmiden für die rekombinanten Fusionsproteine AP-Tim-1  $\Delta$ ICD und AP-Tim-4  $\Delta$ ICD transient transfiziert und die Expression mittels Durchflusszytometrie verifiziert. Beide Deletionsmutanten waren auf der Zelloberfläche lokalisiert (Abb.4.5.1 A). Im Anschluss an die Stimulation mit Ionomycin oder PMA wurden die Überstände und Lysate in einem AP-Assay untersucht.

Die Stimulation mit Ionomycin und PMA führte zu einem signifikanten Anstieg der AP-Aktivität von löslichen AP-Tim-1  $\Delta$ ICD und AP-Tim-4  $\Delta$ ICD Fusionsproteinen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb.4.5.1 B). Die Induktion von *Shedding* mittels Ionomycin und PMA war vergleichbar mit den Wildtyp Tim-1 und Tim-4 Proteinen (Abb. 4.4.1 A und B). Das Fehlen der intrazellulären Domäne beeinträchtigt nicht das Ionomycin- und PMA-induzierte *Shedding* von AP-Tim-1 und AP-Tim-4 Proteinen.

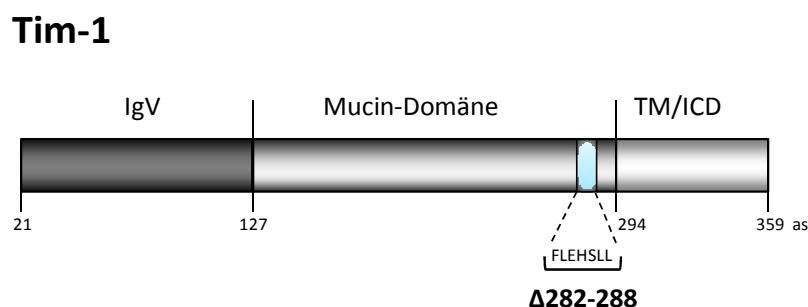


**Abb. 4.5.1 Expression und *Shedding* von AP-Tim-1-ΔICD und AP-Tim-4-ΔICD Mutanten in transient transfizierten HEK293 Zellen**

(A) Die Expression von AP-Tim-1 ΔICD und AP-Tim-4 ΔICD auf der Oberfläche von transient transfizierten HEK293 Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. AP-Tim-1 ΔICD wurde mit dem anti-TIM-1 oder Isotypkontrolle (IgG<sub>1</sub>-PE, in grau) und AP-Tim-4 ΔICD mit dem T27-2 oder Isotypkontrolle (IgG<sub>2a</sub>, grau) und dem sekundären anti-Maus-Antikörper nachgewiesen. (B) HEK293-AP-Tim-1 ΔICD und -AP-Tim-4 ΔICD wurden mit Ionomycin (5  $\mu$ M, 30 min) oder PMA (100 nM, 60 min) stimuliert. Die Überstände und Lysate wurden in einem AP-Assay analysiert. Die AP-Aktivität wurde als ein Verhältnis der AP-Aktivität im Überstand relativ zu der gesamten AP-Aktivität (Überstände + Lysate) berechnet. Die Werte repräsentieren Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) eines repräsentativen Experiments (n=3); \*\*\* = p < 0,001 (ungepaarter Student's t-Test).

## 4.6 Untersuchungen zur ADAM-Spaltregion von Tim-1 und Tim-4

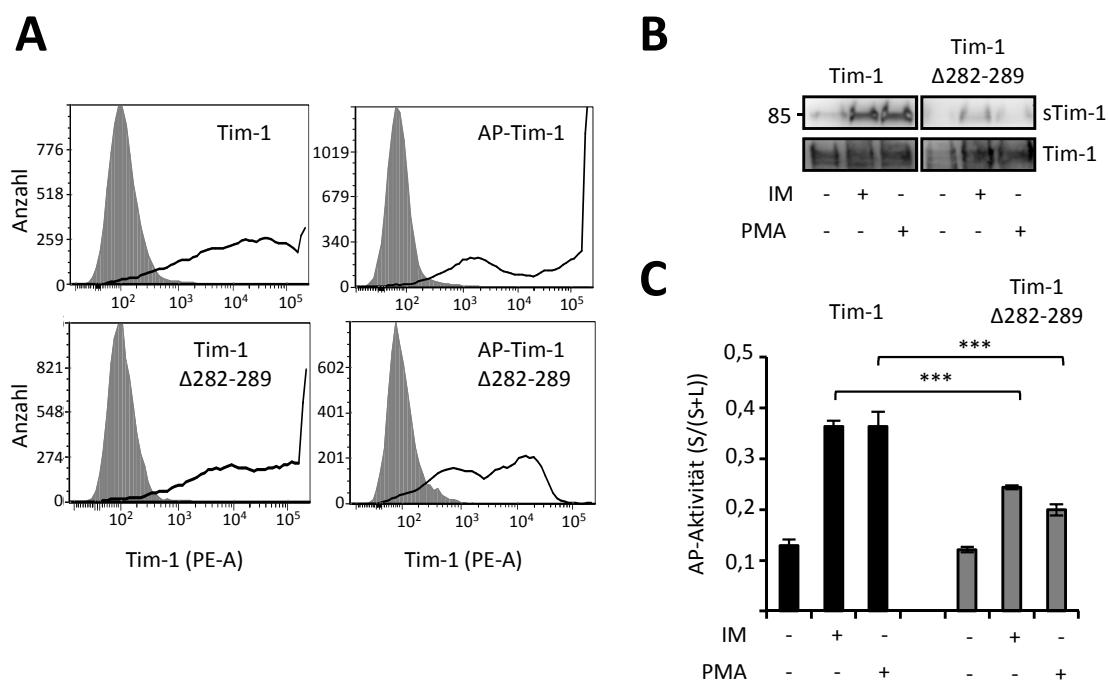
In einer Studie wurde eine unspaltbare Tim-1-Variante beschrieben. Eine Deletion von sieben Aminosäuren in der Mucin-Domäne ( $\Delta 278-283$  FLEHSLL) führte dazu, dass das Pervanadat-induzierte *Shedding* von Tim-1 unterbrochen wurde [66]. In dieser Arbeit wurde die gleiche Mutante, Tim-1  $\Delta 282-288$  ( $\Delta 282-288$  FLEHSLL), generiert (Abb.4.6.1). Zusätzlich wurde Tim-1  $\Delta 282-288$  an Alkalische Phosphatase fusioniert (Abb.9.1.4).



**Abb. 4.6.1 Schematische Darstellung der Tim-1  $\Delta 282-288$  Mutante**

Dargestellt ist die Immunoglobulin (IgV) Domäne, die Mucin-Domäne, Transmembranbereich (TM) und die Intrazelluläre Domäne (ICD). Die Aminosäuresequenz der deletierten Region ist in der Mucin-Domäne dargestellt.

HEK293 Zellen wurden mit Expressionsplasmiden kodierend für Tim-1 und den generierten Mutanten transient transfiziert. Die Zelloberflächenexpression wurde mittels Durchflusszytometrie verifiziert. Sowohl das Tim-1  $\Delta$ 282-288 Protein, als auch das Fusionsprotein AP-Tim-1  $\Delta$ 282-288 wurden an der Zelloberfläche von transient transfizierten HEK293 Zellen exprimiert (Abb. 4.6.2 A). Die HEK293-Tim-1  $\Delta$ 282-288 und HEK293-AP-Tim-1  $\Delta$ 282-288 Zellen wurden 48 h posttransfektional mit Ionomycin und PMA stimuliert. Die Überstände und Lysate der HEK293-Tim-1  $\Delta$ 282-288 Zellen wurden mittels Western Blot und die der HEK293-AP-Tim-1  $\Delta$ 282-288 Zellen mittels AP-Assay analysiert.

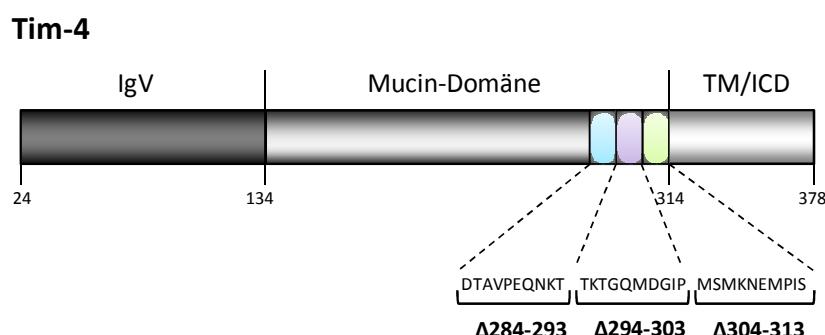


**Abb. 4.6.2 Expression und *Shedding* der Tim-1 Mutante  $\Delta$ 282-288 in transient transfizierten HEK293 Zellen**

(A) Oberflächenexpression von Tim-1- $\Delta$ 282-288 und AP-Tim-1- $\Delta$ 282-288 in transient transfizierten HEK293 Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Tim-1 wurde mit Hilfe von anti-TIM-1-PE oder Isotypkontrolle (IgG<sub>1</sub>-PE, grau) nachgewiesen. (B-C) Transient transfizierte (B) HEK293-Tim-1 und HEK293-Tim-1  $\Delta$ 282-288 oder (C) HEK293-AP-Tim-1 und HEK293-AP-Tim-1  $\Delta$ 282-288 Zellen wurden mit Ionomycin (5  $\mu$ M, 30 min) oder PMA (100 nM, 60 min) stimuliert. (B) Die Überstände und Lysate wurden mittels Western Blot mit dem Tim-1 Antikörper untersucht. (C) Die Überstände und Lysate wurden in einem AP-Assay analysiert. Die AP-Aktivität wurde als ein Verhältnis der AP-Aktivität im Überstand relativ zu der gesamten AP-Aktivität (Überstände + Lysate) berechnet. Die Werte repräsentieren Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) eines repräsentativen Experiments (n=3); \*\*\* = p < 0,001 (ungepaarter Student's t-Test).

Nach Stimulation mit PMA und Ionomycin wurden, im Vergleich zum löslichen Tim-1 Wildtyp Protein, viel schwächere Banden von löslichem Tim-1  $\Delta$ 282-288 detektiert (Abb. 4.6.2 B). Im AP-Assay des Zellüberstandes wurde eine signifikante Reduktion der AP-Aktivität von AP-Tim-1  $\Delta$ 282-288 im Vergleich zu AP-Tim-1 nach Stimulation mit Ionomycin und PMA festgestellt (Abb. 4.6.2 C). Dementsprechend kann vermutet werden, dass sich die ADAM-Proteasen Spaltungsstelle von Tim-1 nahe der Transmembranregion innerhalb der deletierten Sequenz ( $\Delta$ 282-288 FLEHSLL) befindet. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Region auch regulatorisch das *Shedding* von Tim-1 beeinflusst.

Da es bis jetzt nicht bekannt gewesen ist, dass Tim-4 einer proteolytischen Spaltung unterliegt, gibt es keine Untersuchungen bezüglich der möglichen Spaltregion von Tim-4. Um diese zu untersuchen, wurden drei verschiedenen Deletionsmutanten AP-Tim-4  $\Delta$ 304-314,  $\Delta$ 294-304 und  $\Delta$ 284-294 generiert. Dabei wurden jeweils 10 Aminosäuren nahe der Transmembranregion deletiert (Abb. 4.6.3). Außerdem wurden Tim-4 Mutanten ohne eine Fusion mit der Alkalischen Phosphatase erstellt: Tim-4  $\Delta$ 304-314,  $\Delta$ 294-304 und  $\Delta$ 284-294.

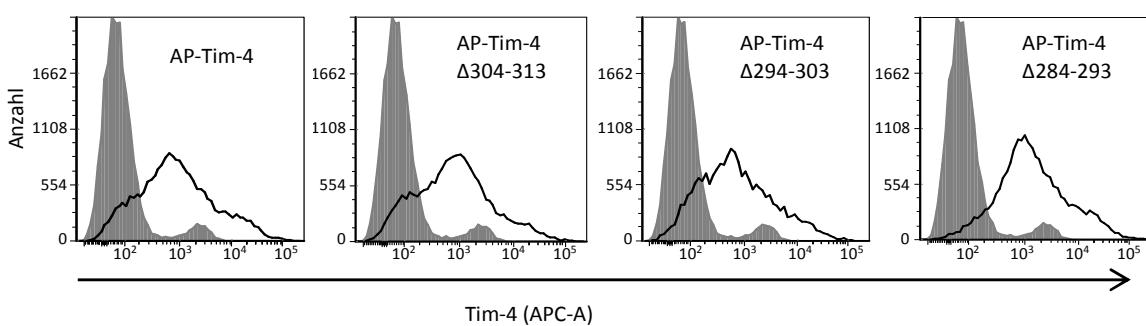


**Abb. 4.6.3 Schematische Darstellung der Tim-4 Deletionsmutanten**

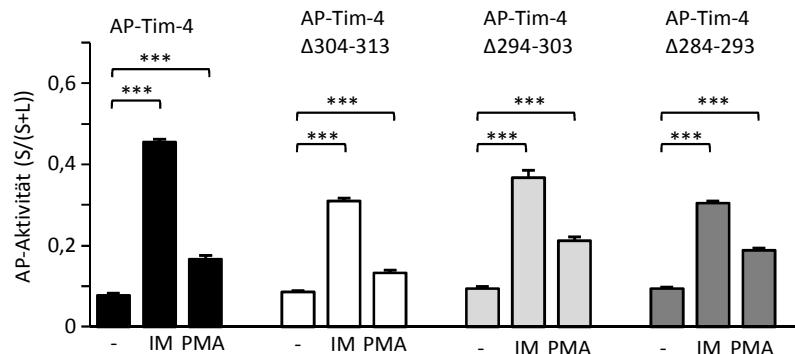
Dargestellt ist die Immunoglobulin (IgV) Domäne, die Mucin-Domäne, Transmembranbereich (TM) und die Intrazelluläre Domäne (ICD). Die Sequenzen der deletierten Regionen sind in der Mucin-Domäne dargestellt.

Zunächst wurde die Oberflächenexpression der Mutanten in transient transfizierten HEK293 Zellen mittels Durchflusszytometrie verifiziert (Abb. 4.6.4 A und Abb. 4.6.5A). Die HEK293-AP-Tim-4  $\Delta$ 304-313,  $\Delta$ 294-303 und  $\Delta$ 284-293 Zellen wurden mit Ionomycin oder PMA stimuliert. Anschließend wurden die Überstände und Lysate mittels AP-Assay und Western Blot analysiert.

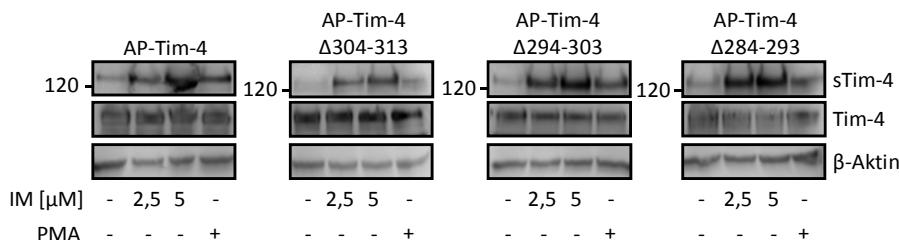
A



B



C

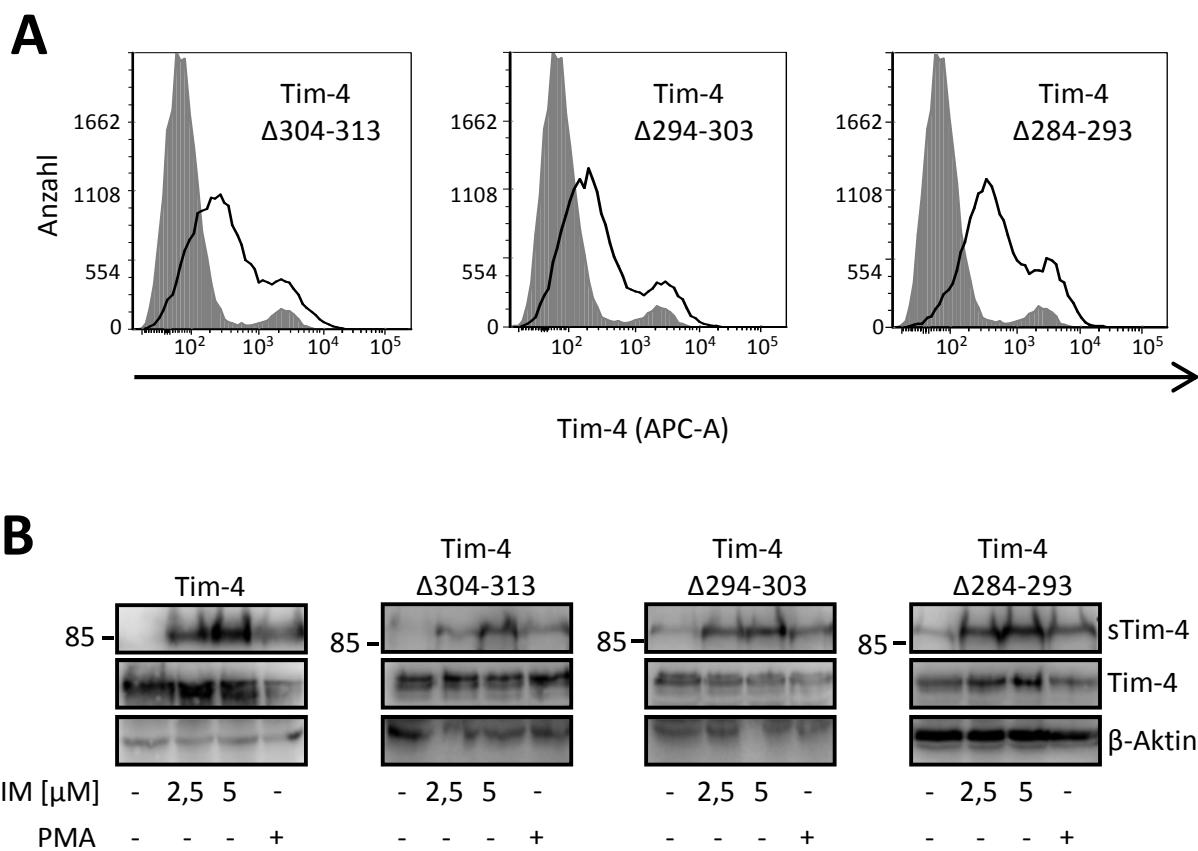


**Abb. 4.6.4 Expression und Sheding der AP-Tim-4 Deletionsmutanten in transient transfizierten HEK293 Zellen**

(A) Die Oberflächenexpression von AP-Tim-4 Δ304-313, Δ294-303 und Δ284-293 in transient transfizierten HEK293 Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierzu wurden T27-2 bzw. Isotypkontrolle (IgG<sub>2a</sub>, grau) und der sekundäre anti-Maus-APC Antikörper eingesetzt. (B-C) Transient transfizierte HEK293-AP-Tim-4, Δ304-313, Δ294-303 und Δ284-293 wurden mit Ionomycin (5 μM, 30 min) oder PMA (100 nM, 60 min) stimuliert. Die Überstände und Lysate wurden im (B) AP-Assay oder im (C) Western Blot analysiert. Die AP-Aktivität wurde als ein Verhältnis der AP-Aktivität im Überstand relativ zu der gesamten AP-Aktivität (Überstände + Lysate) berechnet. Die Werte repräsentieren Mittelwerte (± Standardabweichung) eines repräsentativen Experiments (n=3); \*\*\* = p < 0,001 (ungepaarter Student's t-Test). (C) Die Überstände und Lysate wurden mittels Western Blot mit T27-2 und β-Aktin Antikörpern untersucht.

Eine Stimulation mit Ionomycin und PMA führte zu einem signifikanten Anstieg der AP-Aktivität vom Wildtyp und allen Deletionsmutanten (Abb.4.6.4 B). Die Western Blots bestätigen, dass nach Ionomycin und PMA Stimulation eine proteolytische Spaltung von allen generierten löslichen AP-Tim-4 Deletionsmutanten stattfindet (Abb.4.6.4 C).

Weitere Untersuchungen der Tim-4 Deletionsmutanten, die nicht an eine AP fusioniert waren, zeigten ähnliche Resultate. Die Freisetzung von löslichen Tim-4 Proteinen erfolgte bei allen Deletionsvarianten (Tim-4  $\Delta$ 304-313,  $\Delta$ 294-303 und  $\Delta$ 284-293), wenn diese mit Ionomycin und PMA stimuliert wurden (Abb. 4.6.5 B). Mit dieser Strategie war es also nicht möglich, eine unspaltbare Tim-4 Variante zu erstellen. Es konnte aber festgestellt werden, dass das *Shedding* der Mutante Tim-4  $\Delta$ 304-313 nach Stimulation mit PMA im Vergleich zu der Wildtypvariante deutlich schwächer war (Abb. 4.6.4 B und C und Abb. 4.6.5 B).

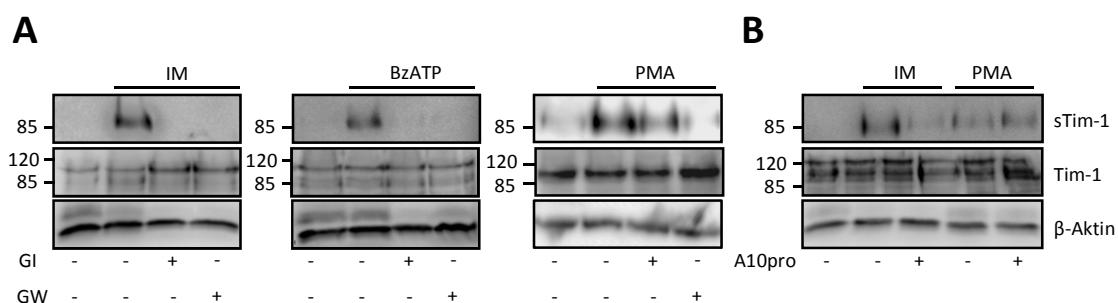


**Abb. 4.6.5 Expression und *Shedding* von Tim-4 Deletionsmutanten in transient transfizierten HEK293 Zellen**

- (A) Die Oberflächenexpression von Tim-4- $\Delta$ 304-313, - $\Delta$ 294-303 und - $\Delta$ 284-293 in transient transfizierten HEK293 Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierzu wurden T27-2 bzw. Isotypkontrolle (IgG<sub>2a</sub>, grau) und der sekundäre anti-Maus-APC Antikörper eingesetzt.
- (B) Transient transfizierte HEK293-Tim-4, - $\Delta$ 304-313, - $\Delta$ 294-303 und - $\Delta$ 284-293 wurden mit Ionomycin (5  $\mu$ M, 30 min) oder PMA (100 nM, 60 min) stimuliert. Die Überstände und Lysate wurden mittels Western Blot mit T27-2 (Tim-4) und  $\beta$ -Aktin Antikörpern untersucht.

## 4.7 Proteolytische Spaltung der Ektodomäne von endogenem Tim-1 in 769-P Zellen

Lösliche Tim-1 Proteine dienen als biologische Marker bei akutem Nierenschaden oder einem Nierenkarzinom beim Menschen [60, 64, 67]. Auch aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse, die proteolytische Spaltung von endogenem Tim-1 zu untersuchen. Dafür wurde eine Nierenkarzinomzelllinie (769-P Zellen) eingesetzt, welche Tim-1 exprimiert [6]. 769-P Zellen wurden wie unter Punkt 3.2.5 beschrieben stimuliert. Anschließend wurden die Überstände und Lysate mittels Western Blot untersucht.



**Abb. 4.7.1 Induziertes *Shedding* von endogenem Tim-1 in 769-P Zellen**

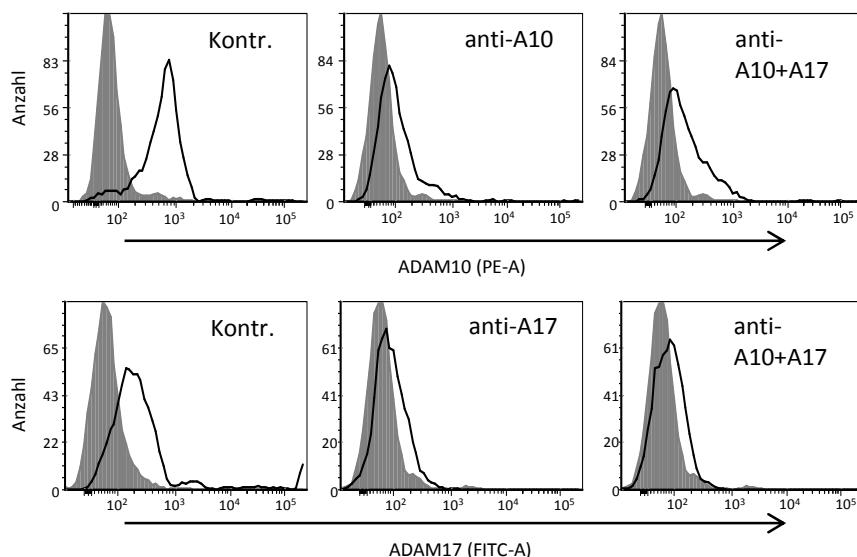
(A-B) 769-P Zellen wurden mit BzATP (500  $\mu$ M, 30 min), Ionomycin (5  $\mu$ M, 30 min) oder PMA (100 nM, 60 min) stimuliert. Die Zugabe von Inhibitoren, (A) ADAM 10 Inhibitoren GI (3  $\mu$ M) und (B) A10pro (10  $\mu$ M), (A) ADAM10/17 Inhibitor GW (3  $\mu$ M) erfolgte 30 min vor der Stimulation. Die Überstände und Lysate wurden mittels Western Blot mit Tim-1 und  $\beta$ -Aktin Antikörpern analysiert.

Die Freisetzung von löslichem Tim-1 in 769-P Zellen wurde durch eine Stimulation mit Ionomycin, BzATP und PMA induziert (Abb.4.7.1 A). Der Einsatz von Inhibitoren zeigte, dass der ADAM10 Inhibitor GI und der ADAM10 und ADAM17 Inhibitor GW das BzATP- und Ionomycin induzierte *Shedding* von Tim-1 in 769-P Zellen komplett inhibierten. PMA-induziertes *Shedding* von endogenem Tim-1 wurde dagegen nur teilweise durch den ADAM10 Inhibitor GI und komplett durch den ADAM10 und ADAM17 Inhibitor GW blockiert (Abb.4.7.1 A). Die ADAM10 Prodomäne hemmte die Ionomycin-induzierte Freisetzung von endogenem Tim-1 und hatte keinen Einfluss auf das PMA-induzierte *Shedding* von Tim-1 in 769-P Zellen (Abb.4.7.1 B).

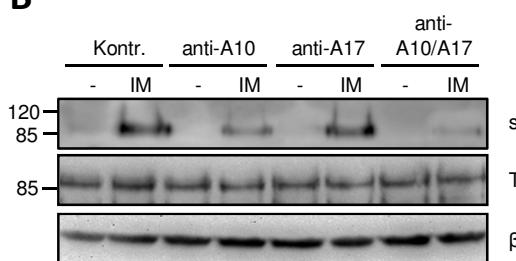
Als nächstes wurde in 769-P Zellen die Expression von ADAM10 und ADAM17 mittels Transfektion mit siRNA herunterreguliert. Die Oberflächenexpression von ADAM10 und ADAM17 wurde mittels Durchflusszytometrie verifiziert. Wurden die Zellen mit Kontroll-siRNA transfiziert, wurde die Expression von ADAM10 und ADAM17 in 769-P Zellen nicht beeinflusst (Abb. 4.7.2 A).

Nach einer Transfektion mit siRNA, gerichtet gegen ADAM10 und/oder ADAM17, wurde die Oberflächenexpression beider Proteasen deutlich reduziert (Abb.4.7.2 A). Entsprechend zu den vorherigen Ergebnissen war die Freisetzung von löslichem Tim-1 nach Stimulation mit Ionomycin in ADAM10 sowie in ADAM10 und ADAM17 defizienten 769-P Zellen deutlich reduziert (Abb.4.7.2 B). Außerdem wurde die PMA-induzierte Spaltung der Tim-1 Ektodomäne in ADAM17 sowie in ADAM10 und ADAM17 defizienten Zellen inhibiert (Abb. 4.7.3 C). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 an der Generierung des löslichen Tim-1 in 769-P Zellen beteiligt sind.

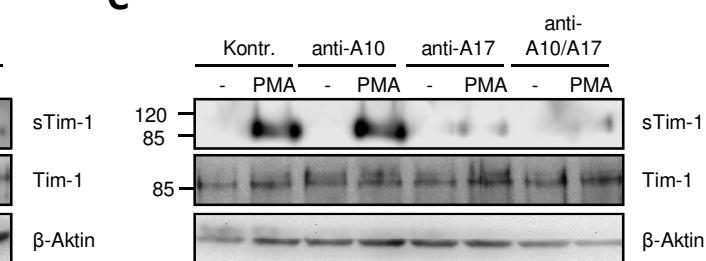
**A**



**B**



**C**

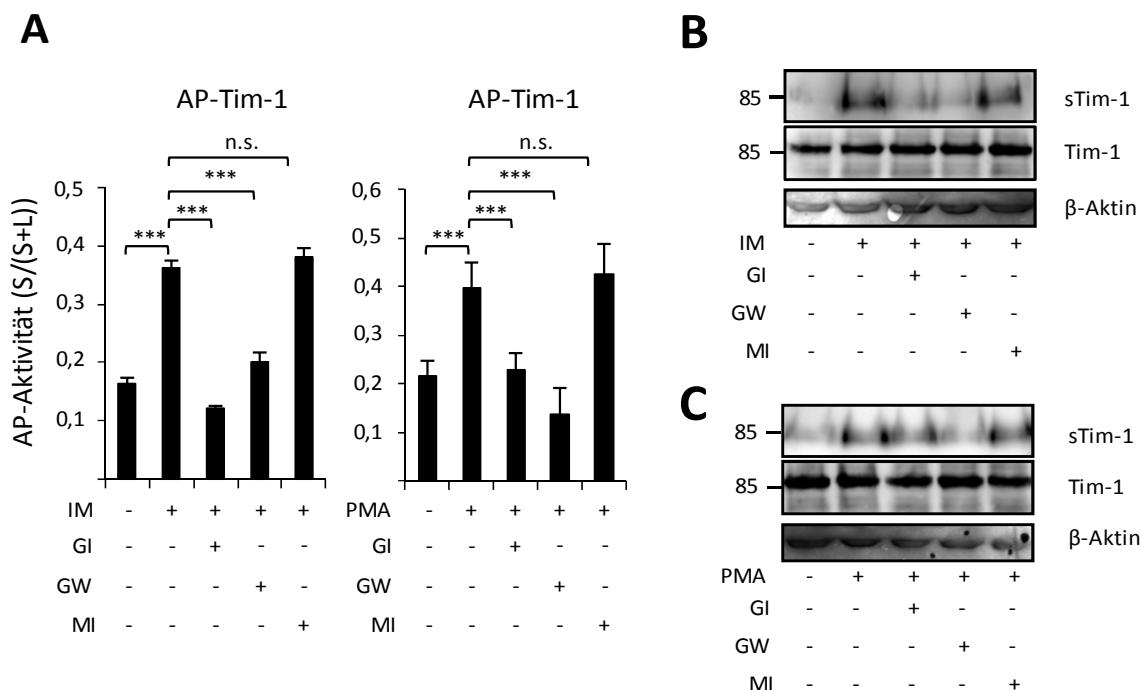


**Abb. 4.7.2 Expression von ADAM10 und ADAM17 und Induziertes *Shedding* in 769-P Zellen defizient für ADAM10 und / oder ADAM17 mittels siRNA in 769-P Zellen**

769-P Zellen wurden mit siRNA gerichtet gegen ADAM10 und/oder ADAM17 sowie mit Kontroll-siRNA transient transfiziert. (A) Durchflusszytometrische Untersuchung der Oberflächenexpression von ADAM10 und ADAM17 in 769-P Zellen. Für die ADAM10-Detektion wurde ADAM10-PE Antikörper bzw. Isotypkontrolle IgG<sub>1</sub>-PE (grau) und für ADAM17-Detektion, ADAM-17 Antikörper bzw. Isotypkontrolle IgG<sub>1</sub>-FITC (grau) eingesetzt. (B-C) Die mit siRNA transfizierten 769-P Zellen wurden mit Ionomycin (5 µM, 30 min) oder PMA (100 nM, 60 min) stimuliert. Die Überstände und Lysate wurden mittels Western Blot mit Tim-1 und β-Aktin Antikörpern analysiert.

## 4.8 Matrix Metalloproteinase 3 ist nicht in das Ionomycin- und PMA-induzierte *Shedding* von Tim-1 involviert

Vor kurzem wurde berichtet, dass an der Freisetzung von löslichem Tim-1 die Matrix Metalloprotease 3 (MMP-3) beteiligt ist. Tim-1 *Shedding* durch MMP-3 wurde mit TNF- $\alpha$  oder humanem Serumalbumin in den proximalen Tubulusepithelzellen induziert [88]. Aus diesem Grund wurde die Beteiligung der MMP-3 Protease an dem Ionomycin- und PMA-induzierten *Shedding* von Tim-1 untersucht. Hierzu wurde der MMP-3 spezifische Inhibitor MI eingesetzt. Der MI Inhibitor hemmt MMP-3 mit einer 1200-fach größeren Affinität im Vergleich zu MMP-1, -2, -9, und 14. Außerdem ist die Hemmung der MMP-3 Protease mit dem MI Inhibitor 100-fach stärker als die Inhibition der MMP-13. Ferner besitzt MI keine Affinität zu ADAM17 [154].



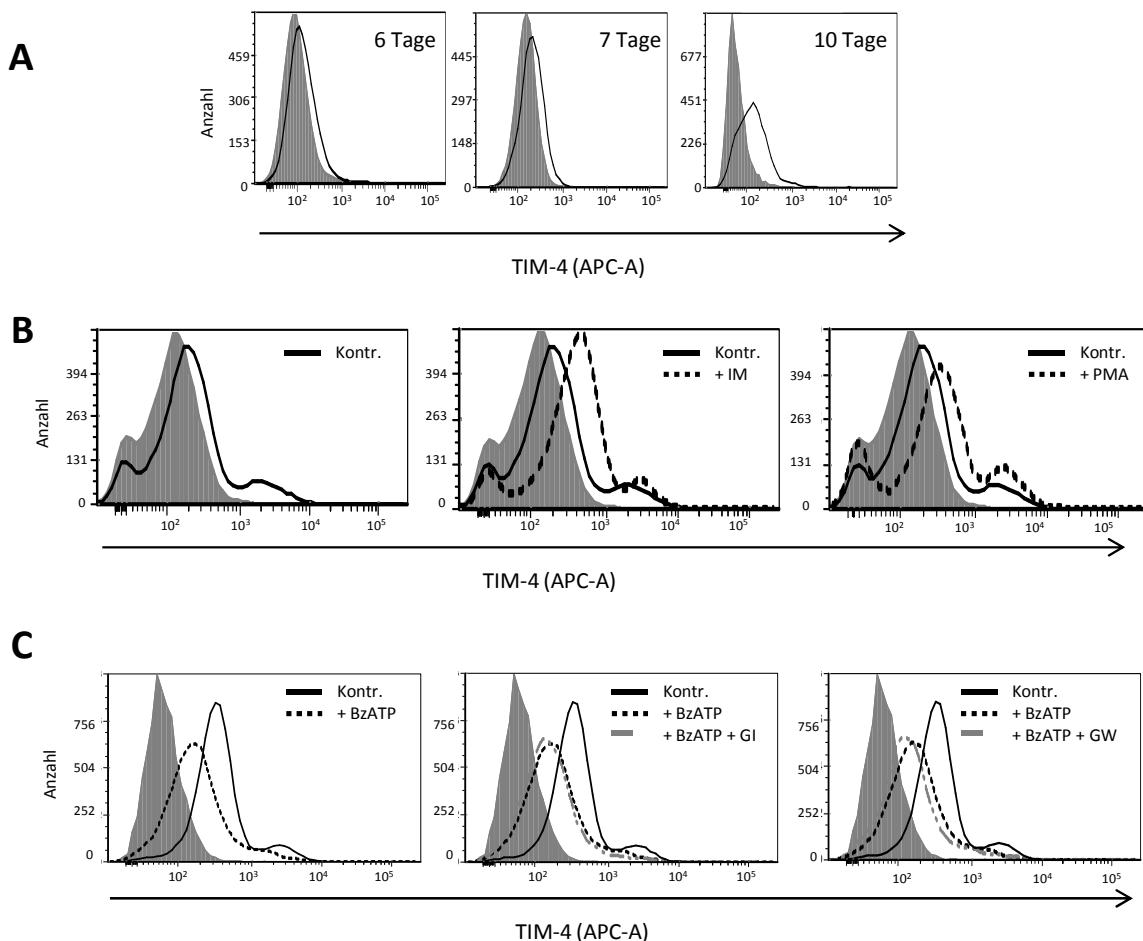
**Abb. 4.8.1 MMP-3 ist nicht an PMA und Ionomycin induziertem *Shedding* von Tim-1 beteiligt**

(A) Transient transfizierte HEK293-AP-Tim-1 und (B - C) 769-P Zellen wurden mit Ionomycin (5  $\mu$ M, 30 min) oder PMA (100 nM, 60 min) stimuliert. Die Zugabe von Inhibitoren, ADAM 10 Inhibitor GI (3  $\mu$ M), ADAM10 und ADAM17 Inhibitor GW (3  $\mu$ M) und MMP-3-Inhibitor MI (3  $\mu$ M) erfolgte 30 min vor der Stimulation. (A) Die Überstände und Lysate wurden mittels AP-Assay analysiert. Die AP-Aktivität wurde als ein Verhältnis der AP-Aktivität im Überstand relativ zu der gesamten AP-Aktivität (Überstände + Lysate) berechnet. Die Werte repräsentieren Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) eines repräsentativen Experiments ( $n=3$ ); n.s. = nicht signifikant, \*\*\* =  $p < 0,001$  (ungepaarter Student's t-Test). (B-C) Die Überstände und Lysate wurden mittels Western Blot mit anti-Tim-1 und anti- $\beta$ -Aktin Antikörpern untersucht.

Untersucht wurden transient transfizierte HEK293-AP-Tim-1 und 769-P Zellen. Die AP-Aktivität von AP-Tim-1 nach einer Stimulation mit Ionomycin und PMA wurde durch den MMP-3 Inhibitor MI nicht beeinflusst (Abb.4.8.1 A). Die Ionomycin- und PMA-induzierte Freisetzung von löslichem Tim-1 in 769-P Zellen wurde durch die ADAM Inhibitoren GI und GW und nicht durch den MMP-3 Inhibitor MI blockiert (Abb.4.8.1 B und C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MMP-3 nicht an dem Ionomycin- oder PMA-induziertem *Shedding* von Tim-1 beteiligt ist.

### 4.9 Expression und Analyse der proteolytischen Spaltung der Tim-4 Ektodomäne in humanen Makrophagen

Tim-4 wird ausschließlich auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs) exprimiert [28, 76, 77]. Tim-4 bindet an Phosphatidylserin und Tim-4<sup>+</sup> Makrophagen sind an der Phagozytose apoptotischer Zellen beteiligt [14, 28]. Eine Behandlung von Mäusen mit Tim-4 Antikörpern inhibierte die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen im Thymus und führte zu einer Entwicklung von Autoantikörpern, welche eine große Rolle bei Allergieerkrankungen spielen [16, 28]. Die Spaltung von Tim-4 auf Makrophagen könnte eine Rolle bei der Regulation der Phagozytose spielen. Für die Untersuchung der proteolytischen Spaltung von endogenem Tim-4 wurden humane Makrophagen aus Monozyten generiert (siehe 3.2.8). Dazu wurden CD14<sup>+</sup> Monozyten aus PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) isoliert und mit M-CSF (*Macrophage-Colony Stimulating Factor*) stimuliert. Durch die Behandlung mit M-CSF differenzieren Monozyten zu Makrophagen des Typs M1 [157]. Zunächst wurde der Zeitpunkt der höchsten Tim-4 Expression auf den generierten Makrophagen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Nach einer sechstägigen Differenzierung wurde Tim-4 auf der Zelloberfläche von Makrophagen detektiert. Nach einer zehntägigen Differenzierung war die Tim-4 Expression maximal (Abb. 4.9.1 A). Aus diesem Grund wurden für die weiteren Versuche 10 Tage ausdifferenzierte Makrophagen verwendet. Für die Analyse des *Sheddings* von Tim-4 wurden Makrophagen mit Ionomycin, PMA und BzATP stimuliert. Anschließend erfolgte die Verifizierung der Tim-4 Oberflächenexpression auf den Makrophagen (Abb.4.9.1 B und C).

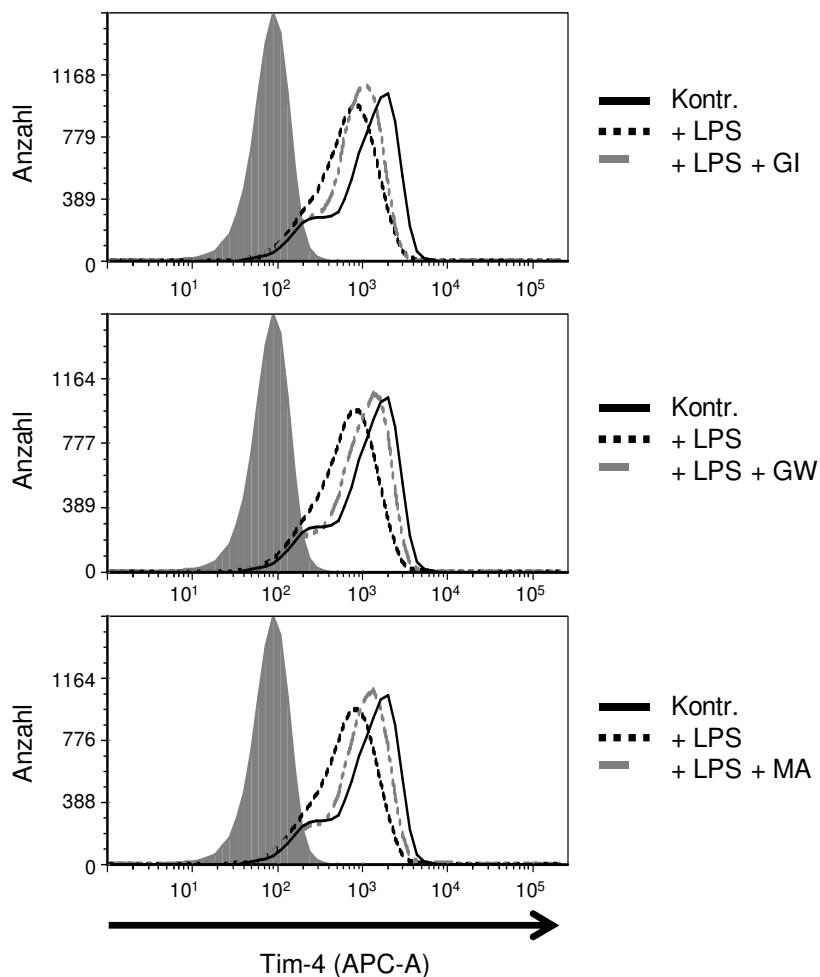


**Abb. 4.9.1 Expression von endogenem Tim-4 auf *in vitro* differenzierten Makrophagen**

(A-C) Durchflusszytometrische Tim-4 Oberflächenexpression in mit M-CSF differenzierten humanen Makrophagen. Tim-4 Detektion erfolgte mit T27-2 Antikörper oder Isotypkontrolle ( $IgG_{2a}$ , grau) und sekundärem anti-Maus-APC Antikörper. (A) Nach 6-, 7- und 10-tägiger Differenzierung wurden die Makrophagen auf Tim-4 Oberflächenexpression untersucht. (B-C) Nach zehntägiger Differenzierung wurden die Makrophagen auf 12-Well-Platten ausgesät und für weitere 48 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit (B) Ionomycin ( $1 \mu M$ , 30 min) oder PMA ( $100 nM$ , 60 min) sowie mit (C) BzATP ( $500 \mu M$ , 30 min) und den ADAM 10 Inhibitor GI ( $3 \mu M$ ) sowie ADAM10 und ADAM17 Inhibitor GW ( $3 \mu M$ ), welche 30 min vor BzATP-Stimulation zugesetzt wurden (Kontr. = nicht stimuliert).

Interessanterweise stellte sich heraus, dass eine Stimulation mit Ionomycin oder PMA zu einer Steigerung der Tim-4 Oberflächenexpression auf den Makrophagen führte (Abb. 4.9.1 B). Die Stimulation mit BzATP führte dagegen zu einer leichten Reduktion von Tim-4 auf der Zelloberfläche. Der ADAM10 Inhibitor GI, sowie der ADAM10 und ADAM17 Inhibitor GW hatten jedoch keinen Einfluss auf die geringere Oberflächenexpression von Tim-4 nach BzATP-Stimulation (Abb. 4.9.1. C). Die Reduktion von Tim-4 Expression auf der Zelloberfläche ist zwar ein Hinweis für eine mögliche proteolytische Spaltung von Tim-4, eine Beteiligung von ADAM Proteasen konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

In einer Studie wurde gezeigt, dass eine Behandlung von Makrophagen mit LPS (Lipopolysaccharid) zu einer deutlichen Reduktion der Tim-4 Expression auf murinen, residenten peritonealen Makrophagen führt [76]. Als nächstes wurde deswegen LPS zur Induktion der proteolytischen Spaltung von Tim-4 auf Makrophagen eingesetzt. Anschließend wurde die Oberflächenexpression von Tim-4 auf Makrophagen mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abb.4.9.2).



**Abb. 4.9.2** *Shedding* von Tim-4 auf *in vitro* differenzierten Makrophagen

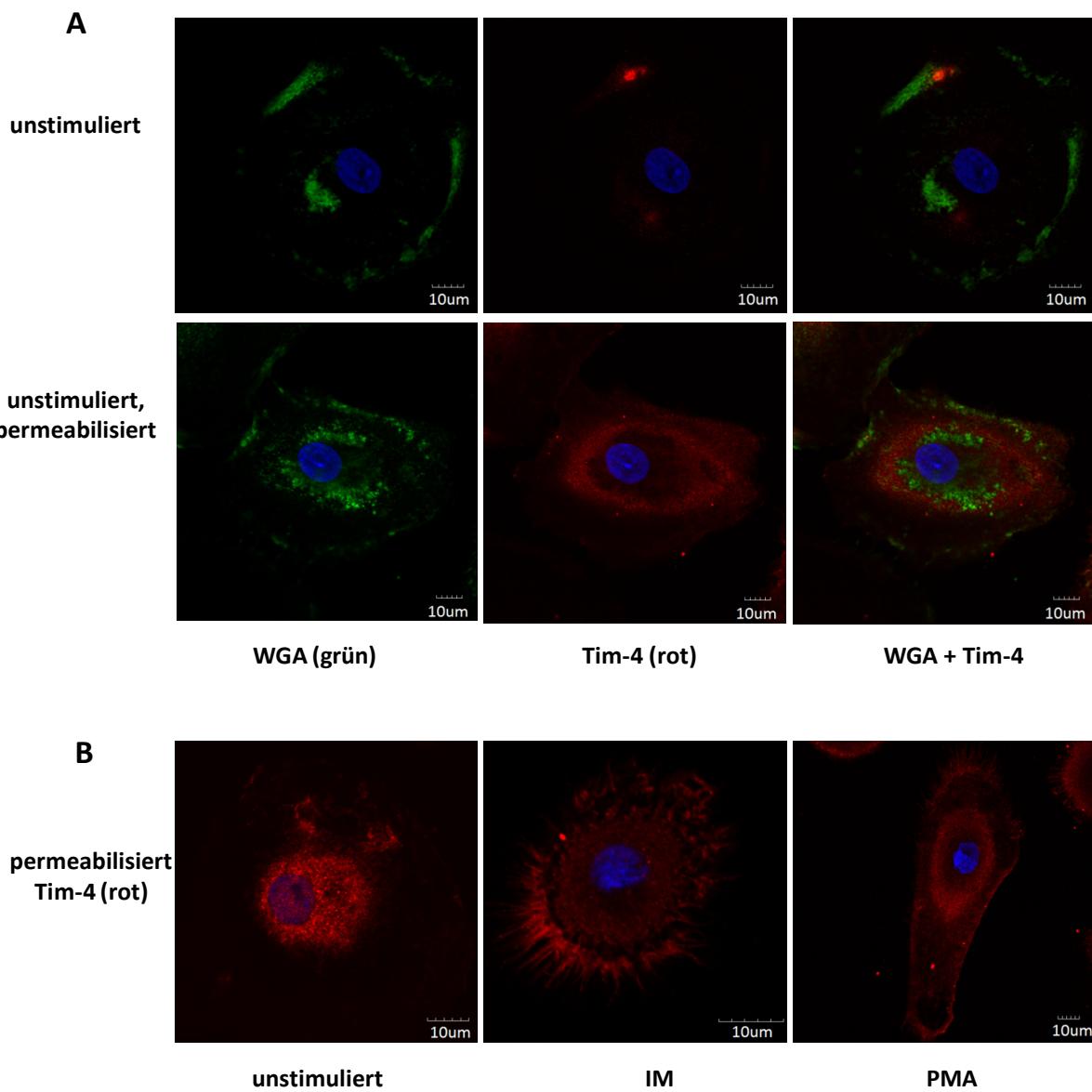
Durchflusszytometrische Tim-4 Oberflächenexpression in mit M-CSF differenzierten humanen Makrophagen. Tim-4 Detektion erfolgte mit T27-2 Antikörper oder Isotypkontrolle ( $\text{IgG}_{2a}$ , grau) und sekundärem anti-Maus-APC Antikörper. (A) Nach zehntägiger Differenzierung wurden die Makrophagen auf 12-Well-Platten ausgesät und für weitere 48 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 120 min) und den ADAM-Inhibitoren GI (3  $\mu\text{M}$ ) und GW (3  $\mu\text{M}$ ), welche 30 min vor LPS-Stimulation zugesetzt wurden (Kontr. = nicht stimuliert).

Die Stimulation der differenzierten Makrophagen mit LPS führte zu einer deutlichen Reduktion der Tim-4 Expression auf der Zelloberfläche im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen. Mit Hilfe des ADAM10 Inhibitors GI wurde das LPS-induzierte *Shedding* von Tim-4 geringfügig inhibiert. Der Einsatz des ADAM10 und ADAM17 Inhibitors GW, sowie des Breitbandmetalloproteaseinhibitor Marimastat (MA) führte dagegen zu einer deutlichen Hemmung der LPS-induzierten Reduktion der Oberflächenexpression von Tim-4 auf Makrophagen. Diese Daten deuten darauf hin, dass eine LPS-Stimulation die proteolytische Spaltung von Tim-4 auf den Makrophagen induziert, an welcher die Proteasen ADAM10 und ADAM17 beteiligt sind.

### 4.10 Lokalisation von Tim-4 in humanen Makrophagen

In einer Studie wurde berichtet, dass murines Tim-4 diffus verteilt auf der Plasmamembran von murinen peritonealen Makrophagen lokalisiert ist. Erst bei Vorhandensein apoptotischer Zellen konzentriert sich Tim-4 am Punkt der Interaktion zwischen den Makrophagen und apoptotischen Zellen [76]. Des Weiteren wurde die Lokalisation von Tim-1 auf murinen Lymphozyten von Santiago et al. 2007 untersucht [17]. Dabei stellte sich heraus, dass Tim-1 auf der Plasmamembran der prä-B-Zellen, in einzelnen Punkten konzentriert, lokalisiert ist. Interessanterweise findet nach einer Stimulation mit Ionomycin und PMA eine starke Translokation von Tim-1 zur Zelloberfläche statt [17]. Außerdem wurde gezeigt, dass Tim-1 einer konstitutiven Internalisierung und einem konstitutiven Rücktransport zur der Zelloberfläche in 769-P Zellen unterliegt [37].

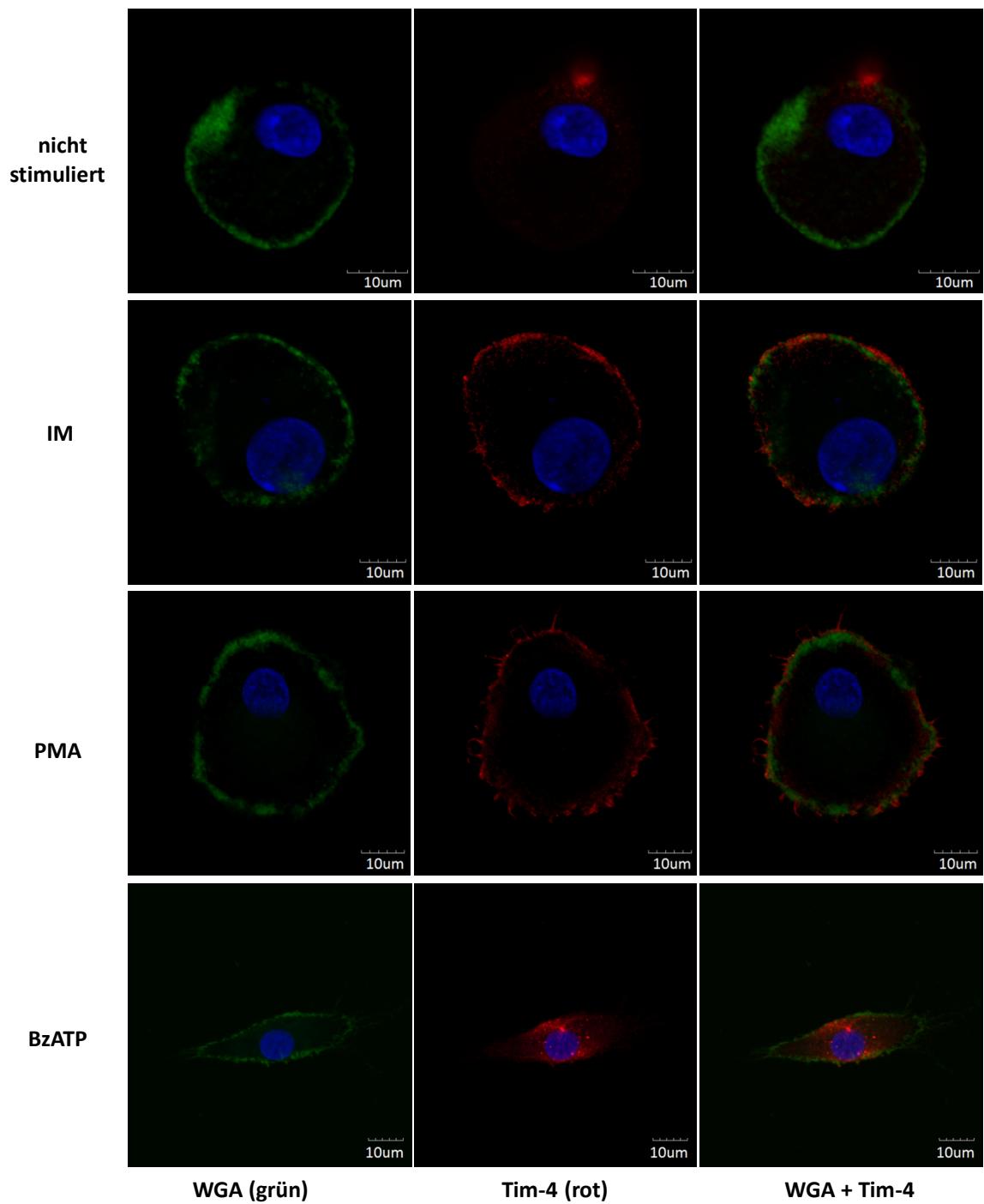
Eine weitere Untersuchung sollte Aufschluss über die Lokalisation von Tim-4 in unbehandelten oder mit Ionomycin, BzATP und PMA stimulierten M-CSF-differenzierten Makrophagen geben. Dazu wurden 10 Tage mit M-CSF-differenzierte Makrophagen mit Ionomycin oder PMA stimuliert. Anschließend erfolgte die Detektion von Tim-4 mittels Immunfluoreszenzfärbung (siehe Punkt 3.4.5)



**Abb. 4.10.1 Lokalisation von endogenem Tim-4 auf *in vitro* differenzierten Makrophagen**

(A-B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach zehntägiger Differenzierung humaner Makrophagen mit M-CSF (100 ng/ml). Die Makrophagen wurden mit IM (1 µM, 30 min), PMA (100 nM) stimuliert oder unbehandelt für die Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt. (A) Die Plasmamembran der Makrophagen wurde entweder unbehandelt oder permeabilisiert. Färbung mit T27-2 (Tim-4, rot), WGA (Plasmamembran, grün) und DAPI (Zellkern, blau). (B) Die Färbung mit T27-2 (Tim-4, rot) und DAPI (Zellkern, blau) erfolgte nach einer Permeabilisierung der Plasmamembran. Sequenzielle Aufnahmen mit einem 60x-Objektiv und einer numerischen Apertur von 1,35.

In den unbehandelten Makrophagen wurde Tim-4 konzentriert an einzelnen Stellen der Plasmamembran detektiert (Abb.4.10.1 A). Erst nach einer Permeabilisierung der Zellmembran konnte gezeigt werden, dass Tim-4 auch im Zellinneren vorhanden ist (Abb.4.10.1 B).



**Abb. 4.10.2 Translokation von Tim-4 nach Stimulation auf *in vitro* differenzierten Makrophagen**  
 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach zehntägiger Differenzierung humaner Makrophagen mit M-CSF (100 ng/ml). Die Makrophagen wurden mit IM (1  $\mu$ M, 30 min), PMA (100 nM) oder BzATP (500  $\mu$ M, 30 min) stimuliert oder unbehandelt für die Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt. Die Färbung erfolgte mit T27-2 (Tim-4, rot), WGA (Plasmamembran, grün) und DAPI (Zellkern, blau). Sequenzielle Aufnahmen mit einem 60x-Objektiv und einer numerischen Apertur von 1,35.

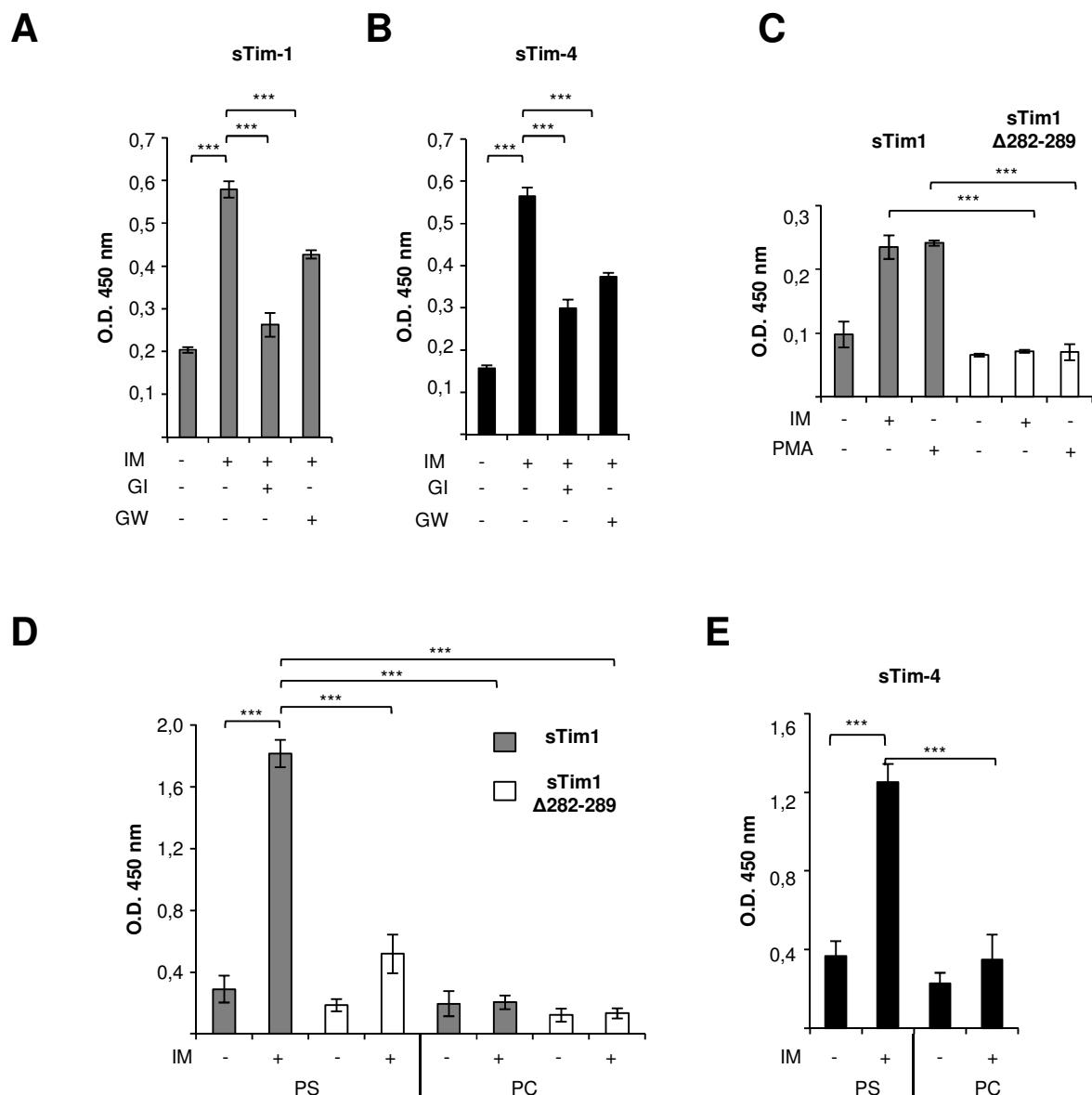
Nach der Stimulation der Makrophagen mit Ionomycin oder PMA wurde eine verstärkte Translokation von Tim-4 zur Plasmamembran beobachtet (Abb. 4.10.2). Die Stimulation mit BzATP bewirkte dagegen eine verstärkte Internalisierung von Tim-4 in das Zellinnere der

Makrophagen (Abb. 4.10.2). Obwohl die Zellen nicht permeabilisiert wurden, konnte Tim-4 in diesen Präparaten im Zellinneren detektiert werden. Das liegt daran, dass BzATP eine Permeabilität der Plasmamembran für größere Moleküle induzieren kann [158]. Diese Beobachtungen bestätigten die mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Ergebnisse (Abb. 4.9.1 B und C). Tim-4 wird durch Stimulation mit Ionomycin oder PMA verstärkt auf der Zelloberfläche exponiert. Dieser Prozess macht es schwierig das *Shedding* von endogenem Tim-4 auf Makrophagen nach Stimulation mit Ionomycin oder PMA nachzuweisen. Ein eindeutiger Nachweis von löslichem Tim-4 im Überstand stimulierter Makrophagen könnte mittels eines ELISAs erbracht werden. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit existierter allerdings noch kein Tim-4 ELISA, der sensitiv genug wäre, um endogenes lösliches Tim-4 nachzuweisen.

### 4.11 Lösliche Tim-1 und Tim-4 Proteine binden an Phosphatidylserin

Membranständige Tim-1 und Tim-4 Proteine binden an Phosphatidylserin und vermitteln die Phagozytose apoptotischer Zellen [14, 28]. Miyanishi et al. haben 2007 gezeigt, dass lösliche Tim-1-Fc und Tim-4-Fc Fusionsproteine (Tim-1 und Tim-4 fusioniert mit der Fc-Region eines humanen IgG<sub>1</sub>) fähig waren, an Phosphatidylserin zu binden [28]. Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass natürlich vorkommende, durch ADAM-Proteasen generierte, lösliche Tim-1 und Tim-4 Proteine auch an Phosphatidylserin binden können. Um eine Interaktion zwischen löslichen Tim-1 oder Tim-4 und Phosphatidylserin zu untersuchen, wurde ein Phospholipid-ELISA durchgeführt. Dazu wurden transient transfizierte HEK293-Tim-1 oder HEK293-Tim-1 Δ282-288 und stabil transfizierte HEK293-Tim-4 Zellen verwendet. Die Zellen wurden wie unter Punkt 3.2.5 beschrieben stimuliert. Anschließend wurden die Überstände mittels Phospholipid-ELISA untersucht. Dabei wurde ein weiteres Phospholipid, Phosphatidylcholin, als Kontrolle verwendet.

Wie in der Abb. 4.11.1 A und B zu sehen ist, binden die durch ADAM-Proteasen entstandenen löslichen Tim-1 und Tim-4 Proteine spezifisch an Phosphatidylserin und nicht an Phosphatidylcholin (Abb. 4.11.1 D und E).



**Abb. 4.11.1 Bindung der löslichen Tim-1 und Tim-4 Proteine an Phosphatidylserin**

(A-E) Phospholipid-ELISA beschichtet mit (A-C) Phosphatidylserin und (D-E) mit Phosphatidylserin (PS) oder Phosphatidylcholin (PC). (A) HEK293-Tim-1, (C) HEK293-Tim-1 Δ282-288 oder (B) HEK293-Tim-4 wurden mit Ionomycin (5  $\mu$ M, 30 min) oder PMA (100 nM, 60 min) stimuliert. Die Zugabe von Inhibitoren, ADAM 10 Inhibitor GI (3  $\mu$ M) und ADAM10 und 17 Inhibitor GW (3  $\mu$ M) erfolgte 30 min vor der Stimulation. Die Überstände wurden in einem Phopsholipid-ELISA mit Hilfe von biotinylierten Tim-1 und T27-2 (Tim-4) Antikörpern untersucht. Die Werte repräsentieren Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) eines repräsentativen Experiments ( $n=3$ ); \*\*\* =  $p < 0,001$  (ungepaarter Student's t-Test).

Durch den Einsatz der Inhibitoren GI und GW wurde die Generierung von löslichen Tim-1 und Tim-4 Proteinen gehemmt. Aufgrund der verminderten Menge an löslichem Tim-1 und Tim-4 wurde eine reduzierte Bindung an Phosphatidylserin in diesen Proben beobachtet (Abb.4.11.1 A und B). Eine weitere Kontrolle stellt der Überstand der Tim-1 Δ282-288 Mutante dar. Die Bindung an Phosphatidylserin der Tim-1 Δ282-288 Mutante war signifikant

reduziert im Vergleich zu Tim-1 (Abb.4.11.1 C). Nach Stimulation mit Ionomycin und PMA ist das *Shedding* der Tim-1  $\Delta$ 282-288 Mutante deutlich reduziert im Vergleich zur Wildtyp-Variante (Abb. 4.6.2 B und C). Folglich war im Überstand nicht genug lösliches Tim-1 Protein vorhanden, welches durch die Bindung an Phosphatidylserin detektiert werden könnte. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass lösliche Tim-1 und Tim-4 Proteine fähig sind an Phosphatidylserin zu binden.

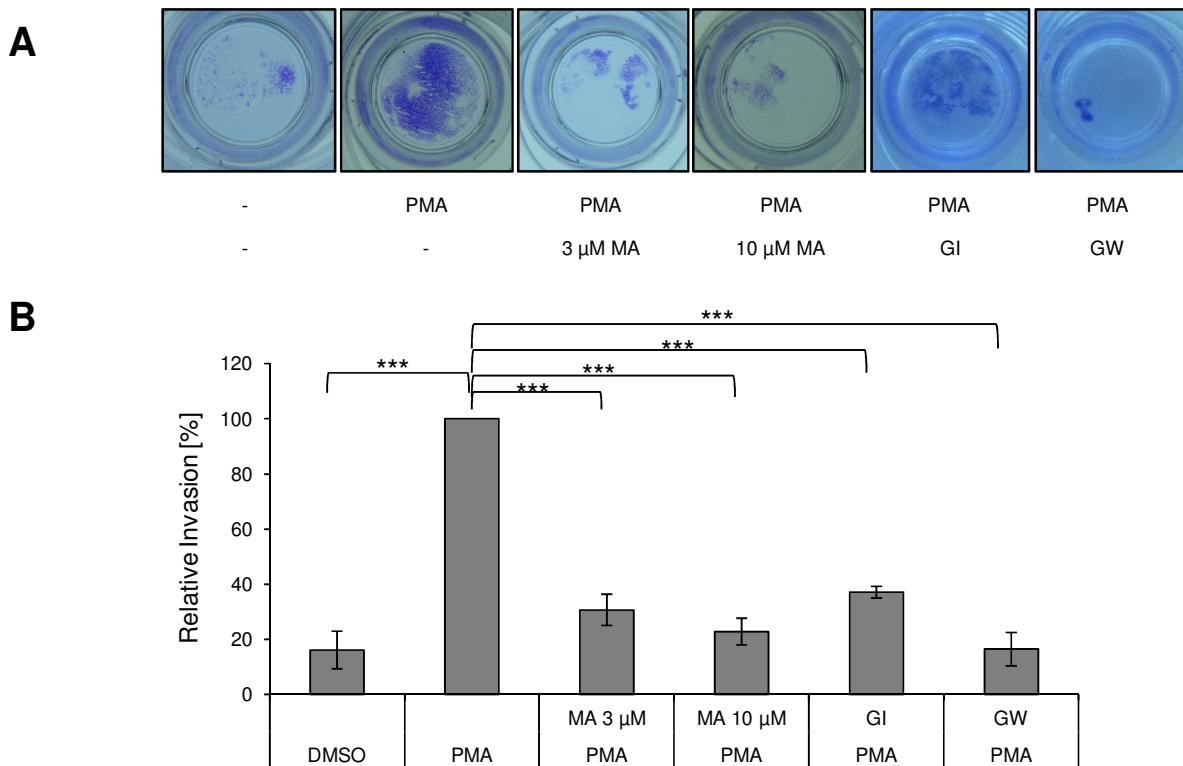
### **4.12 Induktion des ADAM-vermittelten Tim-1 *Shedding* korreliert mit einem erhöhten Invasionsverhalten von 769-P Zellen**

2013 zeigten Cuadros et al., dass ein Anstieg des *Sheddings* von Tim-1 zu einem erhöhten invasiven Verhalten der Nierenkarzinomzellen 786-O führt. In diesen Experimenten wurde festgestellt, dass die Transfektion von 786-O Zellen mit einer unspaltbaren Tim-1 Variante das Invasionsverhalten der Zellen nicht beeinflusst. Die Transfektion mit einer Tim-1 Variante, welche spontan und viel intensiver als die Wildtyp-Variante gespalten wird, führte dagegen zu einem erhöhten Invasionsverhalten der 786-O Zellen [64]. In dieser Arbeit wurden die 769-P Zellen für die Analyse des Invasionsverhaltens eingesetzt, da es zum Zeitpunkt dieser Arbeit die 786-O Zellen nicht zugänglich waren.

Die Invasionsfähigkeit von 769-P Zellen wurde mittels Invasionsassay wie im Punkt 3.2.9 beschrieben untersucht. Invasive Zellen zerstören die verwendete Matrikel-Matrix, wandern durch diese hindurch und können anschließend mittels Kristallviolett-Färbung nachgewiesen werden.

Die PMA-Stimulation induzierte eine erhöhte Invasionsfähigkeit von 769-P Zellen in die Matrikel-Matrix. Mit Hilfe von eingesetzten Metalloproteaseninhibitoren wurde die Invasion der PMA-stimulierten 769-P Zellen in die Matrikel-Matrix deutlich reduziert. Die PMA-induzierte Invasionsfähigkeit von 769-P Zellen wurde durch den Einsatz des ADAM10 Inhibitors GI gehemmt. Der Breitbandmetalloproteaseinhibitor MA sowie der ADAM10 und ADAM17 Inhibitor GW blockierten die PMA-induzierte Invasion der 769-P Zellen noch stärker als der ADAM10 Inhibitor GI (Abb.4.12.1A und B).

Die Daten deuten darauf hin, dass die ADAM17 Aktivierung für den Invasionsprozess verantwortlich ist. Dieses verstärkte Invasionsverhalten von 769-P Zellen korreliert mit dem PMA-induziertem *Shedding* von Tim-1. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Invasionsverhalten und Tim-1 *Shedding* konnte hier aber nicht festgestellt werden.



**Abb. 4.12.1 PMA-Stimulation induziert Invasion von 769-P Zellen.**

(A-B) 769-P Zellen wurden in mit Matrigel-Matrix beschichteten *Transwell Inserts* ausgesät. Die Inhibitoren, Metalloproteasen Inhibitor MA (3-10  $\mu$ M), ADAM10 Inhibitor GI (3  $\mu$ M) und ADAM10/17 Inhibitor GW (3  $\mu$ M) wurden 30 min vor der Stimulation mit PMA (100 nM) zugegeben. (A) Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt (Digitalbilder). (B) Die Kristallviolett-Färbung wurde mit einer 10%-igen Essigsäure abgelöst und die Intensität der Färbung bei 595 nm in einem Mikrotiterplattenleser gemessen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte der relativen Invasion von drei unabhängigen Experimenten. \*\*\* =  $p < 0,001$  (ungepaarter Student's t-Test).

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Generierung von löslichen Tim-1 und Tim-4 Proteinen mittels proteolytischer Spaltung (*Ectodomain Shedding*) untersucht. Tim-1 und Tim-4, Mitglieder der Tim-Familie (*T cell Immunoglobulin and Mucin domain*) spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Immunantworten sowie der Immuntoleranz [79]. Tim-1 ist außerdem in die Regenerierung des ischämisch beschädigten Tubulusepithels der Niere involviert [22, 62]. Die Tim-1 Ektodomäne, bestehend aus der Immunglobulin- und Mucin-Domäne, kann durch proteolytische Spaltung prozessiert und als lösliche Form mit dem Urin ausgeschieden werden [6, 66]. Diese lösliche Tim-1 Variante dient als ein sensitiver Biomarker bei akutem Nierenschaden sowie bei Nierenzellkrebs [60, 64, 67]. Untersuchungen zur proteolytischen Spaltung der Tim-1 Ektodomäne zeigten, dass Metalloproteasen in diesen Prozess involviert sind [6, 66]. In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass Tim-1 durch ADAM10 und ADAM17 zu seiner löslichen Form prozessiert werden kann. Außerdem wurde gezeigt, dass auch Tim-4 proteolytischer Spaltung durch ADAM10 und ADAM17 unterliegt.

### 5.1 ADAM10 und ADAM17 sind die Tim-1 und Tim-4 spaltende Proteasen

In dieser Arbeit wurden ADAM10 und ADAM17 durch verschiedene Methoden als Tim-1 und Tim-4 spaltende Proteasen identifiziert. Mittels Immunoblot-Analyse von konzentrierten Überständen transient transfizierter HEK293-Tim-1 und -Tim-4 Zellen, welche mit *Shedding*-induzierenden Stimulanzien (BzATP, Ionomycin, PMA) behandelt wurden, konnten lösliche Tim-1 und Tim-4 Proteine nachgewiesen werden. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren der ADAM10- (GI und ADAM10 Pro-Domäne) und ADAM17- (GW) Aktivität wurde festgestellt, dass beide Proteasen, abhängig von den eingesetzten Stimulanzien, die proteolytische Spaltung rekombinanter Tim-1 und Tim-4 Proteine vermitteln. Auch durch die Verwendung eines Alkalischen Phosphatase-Assays konnten diese Ergebnisse bestätigt werden.

Überraschenderweise zeigte sich, dass der ADAM10-Inhibitor GI in der Lage war, PMA-induziertes *Shedding* von Tim-1 und Tim-4 partiell zu inhibieren, obwohl ein anderer ADAM10-Inhibitor, die ADAM10 Pro-Domäne, das *Shedding* nach PMA-Stimulation nicht unterdrücken konnte. In den ADAM10 defizienten MEFs (murine embryonale Fibroblasten) führte die Stimulation mit PMA zum *Shedding* von Tim-4. Die proteolytische Spaltung von Tim-1 wurde dagegen nur sehr schwach mittels PMA in ADAM10<sup>-/-</sup> MEFs induziert. PMA aktiviert die Proteinkinase C, welche in der Lage ist ADAM17 aber nicht ADAM10 zu aktivieren [144]. Der ADAM10-Inhibitor GI kann neben ADAM10 auch Matrix-Metalloproteasen, wie MMP-9 und MMP-13 inhibieren [114]. Es wurde berichtet, dass Tim-1 durch MMP-3 [88] oder MT1-MMP [159] gespalten werden kann. Der Einfluss dieser Proteasen auf das mittels PMA-induzierte *Shedding* von Tim-1 und Tim-4 kann jedoch weitgehend ausgeschlossen werden. Zum einen wurde in beiden Studien nicht PMA zur Stimulation der proteolytischen Spaltung von Tim-1 eingesetzt [88, 159]. Zum anderen kann der ADAM10-Inhibitor GI die Aktivität dieser Proteasen nicht unterdrücken [114]. Weiterhin konnte hier gezeigt werden, dass ein MMP-3 spezifischer Inhibitor (MI) in das PMA-oder Ionomycin-induzierte *Shedding* von rekombinantem sowie endogenem Tim-1 nicht involviert ist. Der eingesetzter MI Inhibitor inhibiert mit einer mindestens 100-fach größeren Affinität MMP-3 im Vergleich zu den MMP-1, -2, -9, -13 und 14 [154].

Für ein besseres Verständnis der Wirkung von GI auf das PMA-induzierte *Shedding* von Tim-1 und Tim-4 wurden weitere Versuche durchgeführt, in denen unterschiedliche Konzentrationen der ADAM-Inhibitoren GI und GW eingesetzt wurden. Eine vorweg gewählte Konzentration von GI und GW von 3 µM beruhte neben den experimentellen Erfahrungen der Arbeitsgruppe auf zahlreichen Publikationen, welche bestätigten, dass diese Konzentration von GI und GW spezifisch die Aktivität von ADAM10 und ADAM17 hemmt [115, 142]. In anderen Studien konnte dagegen die Spezifität dieser Inhibitoren durch den Einsatz von geringeren Konzentrationen (0,2-1 µM) erreicht werden [114, 155]. Durch den Einsatz einer Konzentrationsreihe von GI und GW (0,2-3 µM) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass selbst die geringste GI-Konzentration (0,2 µM) signifikant das Ionomycin-induzierte *Shedding* von Tim-1 und Tim-4 inhibierte. Das gleiche galt für den ADAM10 und 17 Inhibitor GW, welcher in einer Konzentration von 0,2 µM in der Lage war, das PMA-induzierte *Shedding* von Tim-1 und Tim-4 zu hemmen. Mittels des ADAM10 Inhibitors GI bei einer Konzentration von 0,2 µM erfolgte dagegen keine signifikante Reduzierung der PMA-

induzierten Freisetzung von löslichen Tim-1 und Tim-4. Damit konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Spaltung von Tim-1 und Tim-4 durch ADAM10 nach Stimulation mit Ionomycin und durch ADAM17 nach Stimulation mit PMA erfolgt. Die Untersuchung des *Sheddings* von endogenem Tim-1 in der Nierenkarzinomzelllinie 769-P, bei welcher die Tim-1 Expression hochreguliert ist, bestätigte diese Erkenntnis. Mittels Transfektion von 769-P Zellen mit den spezifischen siRNA-Oligonukleotiden konnte die Expression von ADAM10 und ADAM17 stark herunter reguliert werden. Es zeigte sich, dass Tim-1 nach einer Stimulation mit Ionomycin durch ADAM10 und nach Stimulation mit PMA in diesen Zellen durch ADAM17 gespalten wird.

### **5.2 ADAM-Spaltregion von Tim-1 und Tim-4 und der Einfluss der ICD auf das *Shedding* von Tim-1 und Tim-4**

Die Vorhersage der ADAM-Spaltstelle bei ihren Substraten ist schwierig, da keine konservierte Spaltungssequenz der ADAM-Substrate existiert. Bekannt ist, dass die ADAM-Spaltstelle nahe der Juxtamembran-Region, welche sich in der extrazellulären Domäne nah an der Transmembranregion befindet, lokalisiert ist [144, 160]. Zhang et al. generierten eine Tim-1 Mutante, ( $\Delta 278-283$  FLEHSL), welche nicht mehr proteolytisch prozessiert wird. Dabei wurde zur Induktion des Tim-1 *Shedding* Pervanadat (ein Tyrosinphosphatase-Inhibitor) eingesetzt. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass nach der Stimulation mit Ionomycin oder PMA die proteolytische Spaltung der Tim-1 Mutante ( $\Delta 282-289$  FLEHSL) im Vergleich zu Wildtyp-Variante signifikant reduziert war. Die Aminosäure-Sequenz FLEHSL ist demnach sehr wahrscheinlich die Spaltstelle für ADAM10 und ADAM17 bei Tim-1. Um die Spaltregion bei Tim-4 einzugrenzen, wurden Tim-4-Mutanten hergestellt, bei welchen zehn Aminosäuren im Bereich der Juxtamembran-Region deletiert wurden. Die ADAM-Spaltregion von Tim-4 konnte mittels der generierten Mutanten jedoch nicht identifiziert werden, da alle hergestellten Mutanten proteolytisch gespalten wurden. Es konnte aber eine Reduktion des PMA-induzierten *Shedding* für die Tim-4  $\Delta 304-313$  Mutante festgestellt werden, wobei Ionomycin-induziertes Shedding nicht beeinträchtigt war.

Die intrazelluläre Domäne (ICD) von Substraten der ADAM-Proteasen kann einen Einfluss auf die proteolytische Prozessierung haben. Bei einigen EGFR-Liganden, welche proteolytisch durch ADAM10 oder 17 prozessiert werden, ist die ICD wichtig für das induzierte und konstitutive *Shedding* dieser Substrate [161]. Auch bei L-Selektin ist die ICD essentiell für das ADAM-vermittelte *Shedding* [162]. Andererseits war die ICD des IL-6-Rezeptors nicht relevant für das ADAM17-vermittelte *Shedding* [163]. Der Einfluss der ICD auf das *Shedding* ist substratabhängig und muss für jedes Substrat untersucht werden. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Deletion der intrazellulären Domäne von Tim-1 und Tim-4 keinen Einfluss auf das Ionomycin oder PMA-induzierte *Shedding* dieser Proteine hatte.

### 5.3 *Shedding* von endogenem Tim-4 auf Makrophagen wird durch ADAM17 vermittelt

Tim-4 wird ausschließlich auf APCs (*Antigen Presenting Cells*) exprimiert [14, 25] und aus diesem Grund war es wichtig, das Tim-4 *Shedding* in physiologisch relevanten Zellen zu untersuchen. Für die Analyse der proteolytischen Spaltung des endogenen Tim-4 wurden humane M-CSF-differenzierte Makrophagen eingesetzt. Die Untersuchung der proteolytischen Spaltung von Tim-4 konnte lediglich mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzfärbung erfolgen, da zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine weiteren Detektionsmöglichkeiten für lösliches Tim-4 (wie zum Beispiel ein Tim-4-ELISA) existierten. Eine Reduzierung der Oberflächenexpression eines Proteins stellt einen Hinweis für die proteolytische Spaltung dieses Proteins dar und kann für die Analyse des *Sheddings* herangezogen werden. Überraschenderweise führte eine Stimulation mit Ionomycin oder PMA zu einer Hochregulation der Tim-4 Expression auf der Zelloberfläche. Eine Neusynthese von Tim-4 wurde auf Grund der kurzen Stimulationszeit (30 – 60 min) ausgeschlossen. Die Detektion von Tim-4 auf Makrophagen mittels Immunfluoreszenzfärbung bestätigte die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Es wurde beobachtet, dass Tim-4 auf der Zelloberfläche von Makrophagen auf einen Punkt konzentriert ist. Dieses Verteilungsmuster von Tim-4 wurde bereits in einer anderen Studie beschrieben [76]. Nach einer Stimulation mit Ionomycin oder PMA wurde Tim-4 zur Zelloberfläche von Makrophagen transloziert. Der Grund hierfür war wahrscheinlich die veränderte Kalzium-Konzentration durch die

Behandlung mit Ionomycin oder PMA. Das gleiche Phänomen wurde bereits für Tim-1 beschrieben, welches nach einer Ionomycin-Stimulation vermehrt auf der Zelloberfläche zu finden war [17]. Die erhöhte Translokation von Tim-4 auf die Zelloberfläche von Makrophagen nach Stimulation mit PMA oder Ionomycin schließt das *Shedding* von Tim-4 nicht aus. Allerdings war dadurch der Nachweis von Tim-4 *Shedding* mittels Durchflusszytometrie oder Immunfluoreszenzfärbung nicht möglich.

Die Stimulation der Makrophagen mit BzATP bewirkte eine Reduktion der Tim-4 Oberflächenexpression. Die eingesetzten Inhibitoren konnten diese Reduktion nicht blockieren. Außerdem konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung festgestellt werden, dass Tim-4 im Zellinneren der Makrophagen nach Stimulation aufzufinden war. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die BzATP-Stimulation eine Internalisierung von Tim-4 hervorruft. Außerdem ist es möglich, dass BzATP die Freisetzung von Tim-4 von der Zelloberfläche durch eine andere Protease als ADAM10 oder ADAM17 induzierte.

In einer Studie wurde gezeigt, dass eine Behandlung von primären murinen Makrophagen mit LPS (*Lipopolysaccharid*) für 16 Stunden zu einer Reduktion der Tim-4 Expression führt [76]. Hier konnte dagegen gezeigt werden, dass die LPS-Stimulation bereits nach zwei Stunden eine Reduktion der Tim-4-Expression in humanen Makrophagen hervorruft. Mittels der eingesetzten Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass diese Reduktion auf die Aktivität von ADAM17 und nicht ADAM10 zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse liefern einen Hinweis dafür, dass ADAM17 in das LPS-induzierte *Shedding* von endogenem Tim-4 involviert ist.

### 5.4 Lösliche Tim-1 und Tim-4 Proteine binden an Phosphatidylserin

Phosphatidylserin (PS) ist ein Phospholipid, welches sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran befindet. Apoptotische Zellen exponieren PS auf die Außenseite der Membran. Mittels PS-Rezeptoren können Phagozyten apoptotische Zellen erkennen und aufnehmen [12, 13]. Tim-1 und Tim-4 sind Rezeptoren für Phosphatidylserin und vermitteln die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Phagozyten [14, 28]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass lösliche Tim-1 und Tim-4 Proteine, freigesetzt durch die ADAM-vermittelte proteolytische Spaltung, weiterhin fähig waren, an PS zu binden. Die physiologische Relevanz der Erkennung und Bindung von löslichen Tim-Proteinen an PS ist nicht bekannt. Eine

denkbare Funktion dieser Interaktion wäre die Markierung PS-tragender Zellen, wie zum Beispiel im Fall von MFG-E8 (*Milk fat globule-EGF factor 8*), einem löslichen Protein, welches von Makrophagen zur Erkennung apoptotischer Zellen sezerniert wird. Die Opsonierung PS-tragender Zellen durch MFG-E8 dient der Erkennung und Aufnahme dieser Zellen durch Makrophagen [89]. Verschiedene Subtypen von Phagozyten exprimieren unterschiedliche Rezeptoren für die Erkennung apoptotischer Zellen [81]. Denkbar wäre, dass Tim-1/Tim-4<sup>-/-</sup> Makrophagen die apoptotischen Zellen, welche durch lösliche Tim-1/Tim-4 Proteine markiert worden sind, erkennen und aufnehmen könnten. Dabei könnte der Tim-1/Tim-4-Ligand LMIR5 eine Rolle spielen, welcher neben Neutrophilen auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird [32].

Die Opsonierung PS-tragender Zellen durch lösliche Tim-Proteine könnte auch die Aufnahme dieser Zellen durch Makrophagen verhindern. Dies ist beispielsweise der Fall bei RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End products*), welches als membranständiges Protein und als lösliches Protein an PS bindet. Lösliches RAGE, welches nach Prozessierung durch ADAM10 entsteht, besetzt die PS-Bindungsstellen an PS-tragenden Zellen und verhindert somit deren Aufnahme durch Makrophagen [164].

Es ist bekannt, dass nicht-apoptotische T-Zellen kurz nach ihrer Aktivierung PS auf der Außenseite der Membran exponieren [165, 166]. Der Unterschied zu apoptotischen Zellen ist dabei die Menge von exponiertem PS. Es wurde gezeigt, dass PS-tragende Zellen erst dann durch die Makrophagen aufgenommen werden, wenn die Menge an PS auf der Außenmembran einen bestimmten Schwellenwert überschreitet [167]. Lösliche Tim-Proteine könnten in den Prozess der Unterscheidung zwischen apoptotischen oder aktivierten T-Zellen involviert sein.

## 5.5 Der Invasionsprozess einer Nierenkrebszelllinie korreliert mit Tim-1 *Shedding*

Untersuchungen von Nierenzellkrebs-Patienten offenbarten, dass die Menge an löslichem Tim-1 im Urin mit der höheren Malignität und Fähigkeit zur Metastasierung der Tumore korreliert [64]. Krebszellen sind resistent gegen wachstumsinhibierende Signale, induzieren Angiogenese sowie Migration und dringen in das umliegende Gewebe ein [168]. Es wurde berichtet, dass bei Nierenzellkrebs die entarteten Zellen vermehrt lösliches TGF- $\alpha$  durch ADAM17-vermittelte proteolytische Spaltung produzieren, was zu vermehrtem Wachstum der Tumore über den TGF- $\alpha$ /EGFR-Signalweg führte [169]. *In vivo* wurde festgestellt, dass die Verabreichung von ADAM17<sup>-/-</sup> Nierenkarzinomzellen (786-O) weniger Tumore bei Mäusen hervorriefen als Wildtyp-Zellen. Außerdem sind diese Nierenkarzinomzellen in ihrem Migrations- und Invasionsverhalten gehemmt [170]. Interessanterweise wurde festgestellt, dass die erhöhte Invasionsfähigkeit dieser Nierenkarzinomzellen (786-O) im Zusammenhang mit Tim-1 *Shedding* steht. Wenn die Nierenkarzinomzellen mit einer Tim-1-Mutante transfiziert wurden, welche vermehrt ohne Stimulation proteolytisch gespalten wurde, verstärkte sich signifikant ihre Invasionsfähigkeit [64].

In dieser Arbeit wurde das Invasionsverhalten einer Nierenkarzinomzelllinie 769-P im Zusammenhang mit dem Tim-1 *Shedding* untersucht. Es zeigte sich, dass die ADAM17-Aktivierung mittels PMA das Invasionsverhalten dieser Zellen signifikant erhöhte und dass der ADAM17-Inhibitor GW dieses Invasionsverhalten blockierte. Eine PMA-Stimulation von 769-P Zellen führt auch zur Generierung des löslichen Tim-1 Proteins durch ADAM17. Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Invasionsverhalten, der ADAM17-Aktivierung und Tim-1 *Shedding* konnte dennoch nicht festgestellt werden. Es wurde lediglich eine Korrelation zwischen dem erhöhtem Invasionsverhalten und mittels PMA induziertem *Shedding* von Tim-1 festgestellt. Da die Nierenkarzinomzelllinie 769-P eine erhöhte Expression von Tim-1 aufweist, war eine Transfektion dieser Zellen mit der unspaltbaren Tim-1-Variante nicht möglich. Für die Aufklärung des Invasionsverhaltens im Zusammenhang mit Tim-1 *Shedding* sind weitere Untersuchungen nötig. Dafür müsste die Reduktion der Tim-1-Expression in 769-P Zellen mittels siRNA und anschließender Transfektion mit der unspaltbaren Tim-1 Variante eingesetzt werden.

## 5.6 Physiologische Relevanz des ADAM-vermittelten Tim-1 und Tim-4 Sheddings

Proteolytische Spaltung von Proteinen führt nicht nur zur Generierung von Signalmolekülen, chemotaktischen Proteinen und Zytokinen, sie dient auch der Modifizierung von Proteinen sowie einer schnellen Entfernung eines nicht mehr benötigten Rezeptors. Bei ischämischen Nierenerkrankungen wird Tim-1 vermehrt in seine lösliche Form prozessiert und mit dem Urin ausgeschieden [62, 63]. Membranständiges Tim-1 verleiht den proximalen Tubulusepithelzellen (PTECs) die Fähigkeit, umliegende apoptotische Zellen aufzunehmen. Anschließend verlieren die Phagozyten-PTECs ihre Fähigkeit, apoptotische Zellen aufzunehmen, dedifferenzieren sich in ihre ursprüngliche Form und bilden ein neues funktionstüchtiges Epithel [71, 72]. Es wäre denkbar, dass nachdem sich semi-professionelle Phagozyten-PTECs sich in ein neues Epithelum verwandeln, Tim-1 nicht mehr für die Erkennung von apoptotischen Zellen benötigt wird. *Shedding* wäre dann ein möglicher Mechanismus, um die Hochregulation der Tim-1 Expression schnell und effektiv zu reduzieren. Lösliches Tim-1 könnte in die Infiltration der ischämisch geschädigten Niere durch Neutrophile über die Interaktion mit LMIR5, einem Tim-1-Liganden, involviert sein. LMIR5<sup>+</sup> Neutrophile infiltrieren das Nierenepithel nach einer Hochregulation der Tim-1 Expression in PTECs ischämisch geschädigter Nieren. Bei den LMIR5 defizienten Mäusen war die Infiltration des Nierenepithels durch Neutrophile reduziert. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass lösliches Tim-1-Fc Fusionsprotein die Akkumulation von Neutrophilen induziert [32]. Lösliches Tim-1 könnte als ein chemotaktisches Protein für die Infiltration der LMIR5<sup>+</sup> Neutrophile in das Nierenepithel dienen.

Tim-1 ist ein Rezeptor für das Hepatitis A-Virus sowie für das Ebolavirus und das Marburgvirus [30]. Die proteolytische Spaltung von Tim-1 könnte nicht nur der Prävention von Virusinfektionen dienen, sondern auch der Opsonierung der Viren durch lösliches Tim-1. Dadurch wären die Bindungsstellen des Virus besetzt und dieser wäre nicht mehr in der Lage, weitere Zellen zu infizieren. Eine weitere Möglichkeit der Markierung von Viren durch lösliches Tim-1 wäre die Erkennung der Viren durch Immunzellen.

Tim-1 und Tim-4 sind an der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz und an der Entstehung von Allergien beteiligt. Aktivierung des membranständigen Tim-1 wirkt kostimulierend auf

die Proliferation aktiverter T-Zellen [39]. Lösliches Tim-1-Fc Fusionsprotein dagegen hemmt die T-Zellproliferation. Membranständiges Tim-4 fördert ebenfalls die T-Zellproliferation [25, 77]. Auswirkungen von löslichem Tim-4-Fc auf die T-Zell-Aktivierung sind bisher nicht eindeutig geklärt worden. Es wurde beobachtet, dass Tim-4-Fc kostimulierend [25, 77], aber auch inhibierend [78] auf die T-Zellproliferation wirkt. Zwei Studien zeigten unabhängig voneinander, dass die Tim-1-Fc und Tim-4-Fc Fusionsproteine das Wachstum von anti-CD3/CD28 aktivierten T-Zellen durch einen Zellzyklusarrest im G0/G1-Kontrollpunkt inhibieren [75, 171]. Zellzyklus-Kontrollpunkte regulieren die Phasenübergänge bei der Zellteilung. Der Zellzyklusarrest von T-Zellen stellt eine Möglichkeit der Depletion antigenspezifischer T-Zellen (für Auto-Antigene oder harmlose Antigene) dar. Dieser Prozess ist wichtig für die Vermeidung von Allergien oder Autoimmunerkrankungen. Die Stimulation von aktivierte T-Zellen mit löslichen Tim-1-Fc und Tim-4-Fc Fusionsproteinen führte zur Hemmung der Produktion von Komponenten der Zellzyklus-Maschinerie, welche notwendig sind für die Progression durch die G0/G1-Phase [75, 171]. *In vivo* hemmte lösliches Tim-1-Fc die Ohr-Schwellung bei Mäusen in einem Kontakt-Hypersensitivitäts-Modell und führte zu einer Reduktion der Gelenkschwellungen bei Mäusen im AIA-Modell (Adjuvant-induzierte-Arthritis) [171]. Dies zeigt, dass lösliche Tim-1 und Tim-4 Proteine in der Lage wären, die laufenden Immunantworten zu hemmen und therapeutisch bei Behandlungen der Autoimmunerkrankungen oder/und Allergien eingesetzt werden könnten.

Die Fähigkeit der löslichen Tim-1 und Tim-4 Proteine, an Phosphatidylserin zu binden, deutet auf eine mögliche Rolle dieser Proteine als Zytokine hin. Die Bindung von löslichem Tim-1 und Tim-4 an Phosphatidylserin von PS-tragenden Zellen könnte entweder die Aufnahme dieser Zellen durch Makrophagen fördern oder aber auch hemmen. Nicht-apoptotische, aktivierte T-Zellen exponieren PS auf die Außenmembran [165, 166]. Es wurde gezeigt, dass die Blockade von exponiertem PS auf den T-Zellen durch Annexin V (einem PS-bindendem Protein) zu einer Reduzierung des Aktivierungsstatus von T-Zellen führte [166]. Außerdem inhibierte die Besetzung von PS durch Annexin V auf T-Zellen die Infiltration von T-Zellen durch die peritoneale Membran *in vivo* und reduzierte die T-Zellmigration durch ein Endothelmonolayer *in vitro* [165]. Lösliche Tim-1 und Tim-4 Proteine könnten eine ähnliche Wirkung auf die Aktivierung und Migration aktiverter T-Zellen durch die Bindung an Phosphatidylserin haben.

## 5.7 Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Entstehung löslicher Tim-1 und Tim-4 Proteine können für weitere Untersuchungen ihrer Funktion im Immunsystem herangezogen werden. Weitere Schritte wären die Bestätigung des Tim-1 und Tim-4 *Sheddings* durch ADAM10 und ADAM17 *in vivo* sowie die Aufklärung ihrer Funktion. Interessant wäre die Frage bezüglich der kostimulatorischen Rolle der löslichen Tim-1 und Tim-4 Proteine bei der T-Zellaktivierung und Proliferation. Einige Studien lieferten gegensätzliche Ergebnisse über die kostimulierende Rolle von Tim-4, welche mittels eines Fusionsproteins Tim-4-Fc gewonnen wurden [25, 77]. Der Einsatz von löslichem Tim-4, das durch proteolytische Spaltung generiert wird, könnte die Funktion von Tim-4 bei der T-Zellaktivierung aufklären.

Weiterhin wäre von Interesse, die Rolle der Bindung von löslichen Tim-1 und Tim-4 an Phosphatidylserin zu untersuchen. Wirken die löslichen Tim-1 und Tim-4 Proteine als Chemokine oder Zytokine? Führt die Markierung der PS-tragenden Zellen durch lösliche Tim-1 und Tim-4 Proteine zu einem Schutz gegen Phagozytose oder fördert es vielmehr die Aufnahme dieser opsonierter Zellen durch Makrophagen? Die Aufklärung der Funktion von löslichen Tim-1 und Tim-4 Proteinen bei der Regulation der Immunantwort, Immuntoleranz sowie bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Allergien könnte mögliche therapeutische Ansätze liefern.

Die Entfernung des membranständigen Tim-1 durch gezieltes *Shedding* könnte zu einem Schutz gegen die Virusinfektionen beitragen. Interessant wäre zu untersuchen, ob dieser Mechanismus als Prävention gegen eine virale Infektion genutzt werden kann oder auch als therapeutischer Ansatz, indem verhindert wird, dass weitere Zellen infiziert werden.

Interessant ist auch der Einfluss des löslichen Tim-1 auf die Entwicklung von Tumoren. Durch eine gezielte Hemmung des Tim-1 *Sheddings* könnten Metastasierung und Tumorwachstum therapeutisch behandelt werden. Die pathogene Rolle von löslichem Tim-4 ist nicht bekannt. Tim-4 wird mit Autoimmunerkrankungen und Allergien assoziiert. Ein nächster Schritt wäre die Menge von löslichem Tim-4 im Serum von Patienten mit Autoimmunerkrankungen oder Allergien zu untersuchen und eventuell vorhandene Korrelationen festzustellen.

## 6 Zusammenfassung

Tim-1 und Tim-4 sind Mitglieder der Tim (*T cell Immunoglobulin and Mucin domain*) Protein-Familie und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunantworten, Immuntoleranz sowie bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Allergien. Während Tim-1 ausschließlich auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird, wurde die Tim-4 Expression auf T-Zellen, regulatorischen B-Zellen sowie Dendritischen Zellen nachgewiesen. Eine Reihe von Liganden (Viren, Rezeptoren, Lipide oder Kernproteine) wurde für die Tim-1 und Tim-4 Proteine beschrieben, was auf eine Liganden-spezifische Diversität ihrer Funktion hindeutet. Die Funktion von Tim-1 und Tim-4 ist bislang nicht eindeutig aufgeklärt. Tim-1 und Tim-4 wirken als kostimulierende Moleküle bei der T-Zellaktivierung und können die Phagozytose apoptotischer Zellen als Rezeptoren für Phosphatidylserin vermitteln. Neben seiner Rolle im Immunsystem ist Tim-1 in die Pathogenese der ischämischen Nierenerkrankungen und Nierenzellkrebs involviert. Bei diesen Erkrankungen entsteht lösliches Tim-1 Protein, welches durch proteolytische Spaltung generiert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aufgeklärt, dass ADAM10 und ADAM17 in die proteolytische Generierung von löslichen Tim-1 und Tim-4 involviert sind. PMA-induziertes *Shedding* von Tim-1 und Tim-4 wird durch ADAM17 und Ionomycin-induziertes *Shedding* durch ADAM10 vermittelt. Tim-1 und Tim-4 sind Rezeptoren für Phosphatidylserin und vermitteln die Aufnahme apoptotischer Zellen, welche PS an der Außenseite der Membran tragen, durch Makrophagen. Hier wurde nachgewiesen, dass lösliche Tim-1 und Tim-4 Proteine ihre Fähigkeit, an Phosphatidylserin zu binden, behalten, was zur weiteren Aufklärung ihrer Funktion als PS-Rezeptoren beitragen könnte. Interessanterweise wurde in dieser Arbeit eine Korrelation zwischen ADAM17-vermitteltem Tim-1 *Shedding* und der Fähigkeit der Nierenkarzinomzellen sich invasiv zu verhalten, festgestellt.

Die Freisetzung von löslichen Tim-1 und Tim-4 Proteinen stellt ein wichtiges Kriterium für die Aufklärung ihrer Funktion im Immunsystem dar. Darüber hinaus kann gezieltes *Shedding* von Tim-1 auf Grund seiner Funktion als Rezeptor für Viren und seiner Rolle in Krebsentwicklung zur Entwicklung von therapeutischen Ansätzen beitragen.

## 7 Summary

Tim 1 and Tim-4 are members of the Tim (Immunoglobulin and T cell mucin domain) protein family and play a major role in the regulation of immune responses, immune tolerance, as well as in the pathogenesis of autoimmune diseases and allergies. While Tim-4 is only expressed on antigen-presenting cells, Tim-1 expression was detected on T cells, regulatory B cells and dendritic cells. A number of different molecules including viruses, receptors, lipids, or nuclear proteins have been described as ligands for Tim-1 and Tim-4 proteins, suggesting a ligand-specific diversity of their function. The function of Tim-1 and Tim-4 is not completely understood. It was described that Tim-1 and Tim-4 act as costimulatory molecules during T cell activation and are involved in phagocytosis of apoptotic cells. In addition to their role in the immune system Tim-1 is involved in the pathogenesis of ischemic renal disease and renal cell cancer. Soluble Tim-1, which is generated by proteolytic cleavage, is used as a biomarker in these diseases.

In this thesis ADAM10 and ADAM17 (*A Desintegrin And Metalloproteinases 10 and 17*) have been identified as proteases of Tim-1 and Tim-4. PMA-induced shedding of Tim-1 and Tim-4 was mediated by ADAM17 while ionomycin-induced shedding was mediated by ADAM10. Tim-1 and Tim-4 are receptors for phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells, which carry phosphatidylserine on the outer leaflet of the membrane. Here, it was demonstrated that soluble Tim-1 and Tim-4 proteins retain their ability to bind to phosphatidylserine. This could contribute to further elucidation of their function as phosphatidylserine receptors. Furthermore, a correlation between ADAM17-mediated shedding of Tim-1 and the ability of invading renal carcinoma cells was found in this thesis.

The release of soluble Tim-1 and Tim-4 proteins is an important clue regarding the clarification of their function in the immune system. Moreover, due to its function as a receptor for viruses and its role in cancer development, selective shedding of Tim-1 may contribute to development of therapeutic approaches.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Kaplan, G., A. Totsuka, P. Thompson, T. Akatsuka, Y. Moritsugu and S.M. Feinstone, Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J*, 1996. 15(16): p. 4282-96.
2. Feigelstock, D., P. Thompson, P. Mattoo, Y. Zhang and G.G. Kaplan, The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol*, 1998. 72(8): p. 6621-8.
3. McIntire, J.J., S.E. Umetsu, O. Akbari, M. Potter, V.K. Kuchroo, G.S. Barsh, G.J. Freeman, D.T. Umetsu and R.H. DeKruyff, Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol*, 2001. 2(12): p. 1109-16.
4. Kuchroo, V.K., D.T. Umetsu, R.H. DeKruyff and G.J. Freeman, The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(6): p. 454-62.
5. McIntire, J.J., D.T. Umetsu and R.H. DeKruyff, TIM-1, a novel allergy and asthma susceptibility gene. *Springer Semin Immunopathol*, 2004. 25(3-4): p. 335-48.
6. Bailly, V., Z. Zhang, W. Meier, R. Cate, M. Sanicola and J.V. Bonventre, Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem*, 2002. 277(42): p. 39739-48.
7. Kim, H.Y., M.B. Eyheramondo, M. Pichavant, C. Gonzalez Cambaceres, P. Matangkasombut, G. Cervio, S. Kuperman, R. Moreiro, K. Konduru, M. Manangeeswaran, G.J. Freeman, G.G. Kaplan, R.H. DeKruyff, D.T. Umetsu and S.D. Rosenzweig, A polymorphism in TIM1 is associated with susceptibility to severe hepatitis A virus infection in humans. *J Clin Invest*, 2011. 121(3): p. 1111-8.
8. McIntire, J.J., S.E. Umetsu, C. Macaubas, E.G. Hoyte, C. Cinnioglu, L.L. Cavalli-Sforza, G.S. Barsh, J.F. Hallmayer, P.A. Underhill, N.J. Risch, G.J. Freeman, R.H. DeKruyff and D.T. Umetsu, Immunology: hepatitis A virus link to atopic disease. *Nature*, 2003. 425(6958): p. 576.
9. Gao, P.S., R.A. Mathias, B. Plunkett, A. Togias, K.C. Barnes, T.H. Beaty and S.K. Huang, Genetic variants of the T-cell immunoglobulin mucin 1 but not the T-cell immunoglobulin mucin 3 gene are associated with asthma in an African American population. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. 115(5): p. 982-8.
10. Graves, P.E., V. Siroux, S. Guerra, W.T. Klimecki and F.D. Martinez, Association of atopy and eczema with polymorphisms in T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-IL-2-inducible T-cell kinase gene cluster in chromosome 5 q 33. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. 116(3): p. 650-6.
11. Nakajima, T., S. Wooding, Y. Satta, N. Jinnai, S. Goto, I. Hayasaka, N. Saitou, J. Guan-Jun, K. Tokunaga, L.B. Jorde, M. Emi and I. Inoue, Evidence for natural selection in the HAVCR1 gene: high degree of amino-acid variability in the mucin domain of human HAVCR1 protein. *Genes Immun*, 2005. 6(5): p. 398-406.
12. Fadok, V.A., D.R. Voelker, P.A. Campbell, J.J. Cohen, D.L. Bratton and P.M. Henson, Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 1992. 148(7): p. 2207-16.
13. Verhoven, B., R.A. Schlegel and P. Williamson, Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*, 1995. 182(5): p. 1597-601.

14. Kobayashi, N., P. Karisola, V. Peña-Cruz, D.M. Dorfman, M. Jinushi, S.E. Umetsu, M.J. Butte, H. Nagumo, I. Chernova, B. Zhu, A.H. Sharpe, S. Ito, G. Dranoff, G.G. Kaplan, J.M. Casasnovas, D.T. Umetsu, R.H. DeKruyff and G.J. Freeman, TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity*, 2007. 27: p. 927-40.
15. Miyanishi, M., K. Segawa and S. Nagata, Synergistic effect of Tim4 and MFG-E8 null mutations on the development of autoimmunity. *Int Immunol*, 2012. 24(9): p. 551-9.
16. Rodriguez-Manzanet, R., M.A. Sanjuan, H.Y. Wu, F.J. Quintana, S. Xiao, A.C. Anderson, H.L. Weiner, D.R. Green and V.K. Kuchroo, T and B cell hyperactivity and autoimmunity associated with niche-specific defects in apoptotic body clearance in TIM-4-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(19): p. 8706-11.
17. Santiago, C., A. Ballesteros, C. Tami, L. Martinez-Munoz, G.G. Kaplan and J.M. Casasnovas, Structures of T Cell immunoglobulin mucin receptors 1 and 2 reveal mechanisms for regulation of immune responses by the TIM receptor family. *Immunity*, 2007. 26(3): p. 299-310.
18. Toda, S., R. Hanayama and S. Nagata, Two-step engulfment of apoptotic cells. *Mol Cell Biol*, 2012. 32(1): p. 118-25.
19. Albacker, L.A., P. Karisola, Y.J. Chang, S.E. Umetsu, M. Zhou, O. Akbari, N. Kobayashi, N. Baumgarth, G.J. Freeman, D.T. Umetsu and R.H. DeKruyff, TIM-4, a receptor for phosphatidylserine, controls adaptive immunity by regulating the removal of antigen-specific T cells. *J Immunol*, 2010. 185(11): p. 6839-49.
20. Santiago, C., A. Ballesteros, L. Martinez-Munoz, M. Mellado, G.G. Kaplan, G.J. Freeman and J.M. Casasnovas, Structures of T cell immunoglobulin mucin protein 4 show a metal-ion-dependent ligand binding site where phosphatidylserine binds. *Immunity*, 2007. 27(6): p. 941-51.
21. DeKruyff, R.H., X. Bu, A. Ballesteros, C. Santiago, Y.L. Chim, H.H. Lee, P. Karisola, M. Pichavant, G.G. Kaplan, D.T. Umetsu, G.J. Freeman and J.M. Casasnovas, T cell/transmembrane, Ig, and mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol*, 2010. 184(4): p. 1918-30.
22. Ichimura, T., E.J. Asseldonk, B.D. Humphreys, L. Gunaratnam, J.S. Duffield and J.V. Bonventre, Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest*, 2008. 118(5): p. 1657-68.
23. Tami, C., E. Silberstein, M. Manangeeswaran, G.J. Freeman, S.E. Umetsu, R.H. DeKruyff, D.T. Umetsu and G.G. Kaplan, Immunoglobulin A (IgA) is a natural ligand of hepatitis A virus cellular receptor 1 (HAVCR1), and the association of IgA with HAVCR1 enhances virus-receptor interactions. *J Virol*, 2007. 81(7): p. 3437-46.
24. Wilker, P.R., J.R. Sedy, V. Grigura, T.L. Murphy and K.M. Murphy, Evidence for carbohydrate recognition and homotypic and heterotypic binding by the TIM family. *Int Immunol*, 2007. 19(6): p. 763-73.
25. Meyers, J.H., S. Chakravarti, D. Schlesinger, Z. Illes, H. Waldner, S.E. Umetsu, J. Kenny, X.X. Zheng, D.T. Umetsu, R.H. DeKruyff, T.B. Strom and V.K. Kuchroo, TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nat Immunol*, 2005. 6(5): p. 455-64.

26. Sizing, I.D., V. Bailly, P. McCoon, W. Chang, S. Rao, L. Pablo, R. Rennard, M. Walsh, Z. Li, M. Zafari, M. Dobles, L. Tarilonte, S. Miklasz, G. Majeau, K. Godbout, M.L. Scott and P.D. Rennert, Epitope-dependent effect of anti-murine TIM-1 monoclonal antibodies on T cell activity and lung immune responses. *J Immunol*, 2007. 178(4): p. 2249-61.
27. Binne, L.L., M.L. Scott and P.D. Rennert, Human TIM-1 associates with the TCR complex and up-regulates T cell activation signals. *J Immunol*, 2007. 178(7): p. 4342-50.
28. Miyanishi, M., K. Tada, M. Koike, Y. Uchiyama, T. Kitamura and S. Nagata, Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*, 2007. 450(7168): p. 435-9.
29. Thery, C., L. Zitvogel and S. Amigorena, Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(8): p. 569-79.
30. Kondratowicz, A.S., N.J. Lennemann, P.L. Sinn, R.A. Davey, C.L. Hunt, S. Moller-Tank, D.K. Meyerholz, P. Rennert, R.F. Mullins, M. Brindley, L.M. Sandersfeld, K. Quinn, M. Weller, P.B. McCray, Jr., J. Chiorini and W. Maury, T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(20): p. 8426-31.
31. Moller-Tank, S., A.S. Kondratowicz, R.A. Davey, P.D. Rennert and W. Maury, Role of the phosphatidylserine receptor TIM-1 in enveloped-virus entry. *J Virol*, 2013. 87(15): p. 8327-41.
32. Yamanishi, Y., J. Kitaura, K. Izawa, A. Kaitani, Y. Komeno, M. Nakamura, S. Yamazaki, Y. Enomoto, T. Oki, H. Akiba, T. Abe, T. Komori, Y. Morikawa, H. Kiyonari, T. Takai, K. Okumura and T. Kitamura, TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b: LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury. *J Exp Med*, 2010. 207(7): p. 1501-11.
33. Calnan, B.J., S. Szychowski, F.K. Chan, D. Cado and A. Winoto, A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity*, 1995. 3(3): p. 273-82.
34. Hazel, T.G., D. Nathans and L.F. Lau, A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(22): p. 8444-8.
35. Davis, I.J., T.G. Hazel, R.H. Chen, J. Blenis and L.F. Lau, Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77. *Mol Endocrinol*, 1993. 7(8): p. 953-64.
36. Fahrner, T.J., S.L. Carroll and J. Milbrandt, The NGFI-B protein, an inducible member of the thyroid/steroid receptor family, is rapidly modified posttranslationally. *Mol Cell Biol*, 1990. 10(12): p. 6454-9.
37. Balasubramanian, S., S.K. Kota, V.K. Kuchroo, B.D. Humphreys and T.B. Strom, TIM family proteins promote the lysosomal degradation of the nuclear receptor NUR77. *Sci Signal*, 2012. 5(254): p. ra90.
38. Chintharlapalli, S., R. Burghardt, S. Papineni, S. Ramaiah, K. Yoon and S. Safe, Activation of Nur77 by selected 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(p-substituted phenyl)methanes induces apoptosis through nuclear pathways. *J Biol Chem*, 2005. 280(26): p. 24903-14.

39. Umetsu, S.E., W.L. Lee, J.J. McIntire, L. Downey, B. Sanjanwala, O. Akbari, G.J. Berry, H. Nagumo, G.J. Freeman, D.T. Umetsu and R.H. DeKruyff, TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat Immunol*, 2005. 6(5): p. 447-54.
40. Xiao, S., C.R. Brooks, C. Zhu, C. Wu, J.M. Sweere, S. Petecka, A. Yeste, F.J. Quintana, T. Ichimura, R.A. Sobel, J.V. Bonventre and V.K. Kuchroo, Defect in regulatory B-cell function and development of systemic autoimmunity in T-cell Ig mucin 1 (Tim-1) mucin domain-mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(30): p. 12105-10.
41. Ding, Q., M. Yeung, G. Camirand, Q. Zeng, H. Akiba, H. Yagita, G. Chalasani, M.H. Sayegh, N. Najafian and D.M. Rothstein, Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *J Clin Invest*, 2011. 121(9): p. 3645-56.
42. Nakae, S., M. Iikura, H. Suto, H. Akiba, D.T. Umetsu, R.H. Dekruyff, H. Saito and S.J. Galli, TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells. *Blood*, 2007. 110(7): p. 2565-8.
43. Khademi, M., Z. Illes, A.W. Gielen, M. Marta, N. Takazawa, C. Baecher-Allan, L. Brundin, J. Hannerz, C. Martin, R.A. Harris, D.A. Hafler, V.K. Kuchroo, T. Olsson, F. Piehl and E. Wallstrom, T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. *J Immunol*, 2004. 172(11): p. 7169-76.
44. Xiao, S., B. Zhu, H. Jin, C. Zhu, D.T. Umetsu, R.H. DeKruyff and V.K. Kuchroo, Tim-1 stimulation of dendritic cells regulates the balance between effector and regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 2011. 41(6): p. 1539-49.
45. Page, N.S., G. Jones and G.J. Stewart, Genetic association studies between the T cell immunoglobulin mucin (TIM) gene locus and childhood atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol*, 2006. 141(4): p. 331-6.
46. Chae, S.C., J.H. Song, Y.C. Lee, J.W. Kim and H.T. Chung, The association of the exon 4 variations of Tim-1 gene with allergic diseases in a Korean population. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 312(2): p. 346-50.
47. Chae, S.C., Y.R. Park, J.H. Song, S.C. Shim, K.S. Yoon and H.T. Chung, The polymorphisms of Tim-1 promoter region are associated with rheumatoid arthritis in a Korean population. *Immunogenetics*, 2005. 56(10): p. 696-701.
48. Sonar, S.S., Y.M. Hsu, M.L. Conrad, G.R. Majeau, A. Kilic, E. Garber, Y. Gao, C. Nwankwo, G. Willer, J.C. Dudda, H. Kim, V. Bailly, A. Pagenstecher, P.D. Rennert and H. Renz, Antagonism of TIM-1 blocks the development of disease in a humanized mouse model of allergic asthma. *J Clin Invest*, 2010. 120(8): p. 2767-81.
49. Wang, Y., J. Meng, X. Wang, S. Liu, Q. Shu, L. Gao, Y. Ju, L. Zhang, W. Sun and C. Ma, Expression of human TIM-1 and TIM-3 on lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients. *Scand J Immunol*, 2008. 67(1): p. 63-70.
50. de Souza, A.J., T.B. Oriss, J. O'Malley K, A. Ray and L.P. Kane, T cell Ig and mucin 1 (TIM-1) is expressed on in vivo-activated T cells and provides a costimulatory signal for T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(47): p. 17113-8.
51. Boussiotis, V.A., G.J. Freeman, G. Gray, J. Gribben and L.M. Nadler, B7 but not intercellular adhesion molecule-1 costimulation prevents the induction of human alloantigen-specific tolerance. *J Exp Med*, 1993. 178(5): p. 1753-63.
52. Linsley, P.S. and J.A. Ledbetter, The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol*, 1993. 11: p. 191-212.

53. Perez, V.L., L. Van Parijs, A. Biuckians, X.X. Zheng, T.B. Strom and A.K. Abbas, Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity*, 1997. 6(4): p. 411-7.
54. Barlow, J.L., S.H. Wong, S.J. Ballantyne, H.E. Jolin and A.N. McKenzie, Tim1 and Tim3 are not essential for experimental allergic asthma. *Clin Exp Allergy*, 2011. 41(7): p. 1012-21.
55. Wong, S.H., J.L. Barlow, S. Nabarro, P.G. Fallon and A.N. McKenzie, Tim-1 is induced on germinal centre B cells through B-cell receptor signalling but is not essential for the germinal centre response. *Immunology*, 2010. 131(1): p. 77-88.
56. Bouaziz, J.D., K. Yanaba and T.F. Tedder, Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol Rev*, 2008. 224: p. 201-14.
57. Degauque, N., C. Mariat, J. Kenny, D. Zhang, W. Gao, M.D. Vu, S. Alexopoulos, M. Oukka, D.T. Umetsu, R.H. DeKruyff, V. Kuchroo, X.X. Zheng and T.B. Strom, Immunostimulatory Tim-1-specific antibody deprograms Tregs and prevents transplant tolerance in mice. *J Clin Invest*, 2008. 118(2): p. 735-41.
58. Ueno, T., A. Habicht, M.R. Clarkson, M.J. Albin, K. Yamaura, O. Boenisch, J. Popoola, Y. Wang, H. Yagita, H. Akiba, M.J. Ansari, J. Yang, L.A. Turka, D.M. Rothstein, R.F. Padera, N. Najafian and M.H. Sayegh, The emerging role of T cell Ig mucin 1 in alloimmune responses in an experimental mouse transplant model. *J Clin Invest*, 2008. 118(2): p. 742-51.
59. Xiao, L., Z.R. Fu, F. Liu, L.D. Zhang, X.M. Shi, X.Y. Shen, Z.J. Ni, H. Fu, R.D. Li, X.T. Cao, G.S. Ding and Q.X. Wang, Suppression of allograft rejection by Tim-1-Fc through cross-linking with a novel Tim-1 binding partner on T cells. *PLoS One*, 2011. 6(7): p. e21697.
60. Han, W.K., V. Bailly, R. Abichandani, R. Thadhani and J.V. Bonventre, Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int*, 2002. 62(1): p. 237-44.
61. Vila, M.R., G.G. Kaplan, D. Feigelstock, M. Nadal, J. Morote, R. Porta, J. Bellmunt and A. Meseguer, Hepatitis A virus receptor blocks cell differentiation and is overexpressed in clear cell renal cell carcinoma. *Kidney Int*, 2004. 65(5): p. 1761-73.
62. Ichimura, T., J.V. Bonventre, V. Bailly, H. Wei, C.A. Hession, R.L. Cate and M. Sanicola, 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*, 1998. 273(7): p. 4135-42.
63. Kuehn, E.W., K.M. Park, S. Somlo and J.V. Bonventre, Kidney injury molecule-1 expression in murine polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. 283(6): p. F1326-36.
64. Cuadros, T., E. Trilla, M.R. Vila, I. de Torres, J. Vilardell, N.B. Messaoud, M. Salcedo, E. Sarro, J. Lopez-Hellin, A. Blanco, C. Mir, Y.C.S. Ramon, E. Itarte, J. Morote and A. Meseguer, 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*, 2013.
65. Han, W.K., A. Alinani, C.L. Wu, D. Michaelson, M. Loda, F.J. McGovern, R. Thadhani and J.V. Bonventre, Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol*, 2005. 16(4): p. 1126-34.

66. Zhang, Z., B.D. Humphreys and J.V. Bonventre, Shedding of the urinary biomarker kidney injury molecule-1 (KIM-1) is regulated by MAP kinases and juxtamembrane region. *J Am Soc Nephrol*, 2007. 18(10): p. 2704-14.
67. Bonventre, J.V. and L. Yang, Kidney injury molecule-1. *Curr Opin Crit Care*, 2010. 16(6): p. 556-61.
68. Vaidya, V.S., G.M. Ford, S.S. Waikar, Y. Wang, M.B. Clement, V. Ramirez, W.E. Glaab, S.P. Troth, F.D. Sistare, W.C. Prozialeck, J.R. Edwards, N.A. Bobadilla, S.C. Mefferd and J.V. Bonventre, A rapid urine test for early detection of kidney injury. *Kidney Int*, 2009. 76(1): p. 108-14.
69. Chertow, G.M., D.J. Goldstein-Fuchs, J.M. Lazarus and G.A. Kaysen, Prealbumin, mortality, and cause-specific hospitalization in hemodialysis patients. *Kidney Int*, 2005. 68(6): p. 2794-800.
70. Ichimura, T. and S. Mou, Kidney injury molecule-1 in acute kidney injury and renal repair: a review. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 2008. 6(5): p. 533-8.
71. Ichimura, T., C.C. Hung, S.A. Yang, J.L. Stevens and J.V. Bonventre, Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. 286(3): p. F552-63.
72. Sheridan, A.M. and J.V. Bonventre, Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2000. 9(4): p. 427-34.
73. Liu, Y. and J. Yang, Hepatocyte growth factor: new arsenal in the fights against renal fibrosis? *Kidney Int*, 2006. 70(2): p. 238-40.
74. Lim, A.I., S.C. Tang, K.N. Lai and J.C. Leung, Kidney injury molecule-1: more than just an injury marker of tubular epithelial cells? *J Cell Physiol*, 2013. 228(5): p. 917-24.
75. Mizui, M., T. Shikina, H. Arase, K. Suzuki, T. Yasui, P.D. Rennert, A. Kumanogoh and H. Kikutani, Bimodal regulation of T cell-mediated immune responses by TIM-4. *Int Immunol*, 2008. 20(5): p. 695-708.
76. Wong, K., P.A. Valdez, C. Tan, S. Yeh, J.A. Hongo and W. Ouyang, Phosphatidylserine receptor Tim-4 is essential for the maintenance of the homeostatic state of resident peritoneal macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(19): p. 8712-7.
77. Rodriguez-Manzanet, R., J.H. Meyers, S. Balasubramanian, J. Slavik, N. Kassam, V. Dardalhon, E.A. Greenfield, A.C. Anderson, R.A. Sobel, D.A. Hafler, T.B. Strom and V.K. Kuchroo, TIM-4 expressed on APCs induces T cell expansion and survival. *J Immunol*, 2008. 180(7): p. 4706-13.
78. Cao, W., M. Ryan, D. Buckley, R. O'Connor and M.R. Clarkson, Tim-4 inhibition of T-cell activation and T helper type 17 differentiation requires both the immunoglobulin V and mucin domains and occurs via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Immunology*, 2011. 133(2): p. 179-89.
79. Freeman, G.J., J.M. Casasnovas, D.T. Umetsu and R.H. DeKruyff, TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*, 2010. 235(1): p. 172-89.
80. Rodriguez-Manzanet, R., R. DeKruyff, V.K. Kuchroo and D.T. Umetsu, The costimulatory role of TIM molecules. *Immunol Rev*, 2009. 229(1): p. 259-70.
81. Ravichandran, K.S. and U. Lorenz, Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(12): p. 964-74.
82. Schulze, C., L.E. Munoz, S. Franz, K. Sarter, R.A. Chaurio, U.S. Gaipl and M. Herrmann, Clearance deficiency--a potential link between infections and autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 2008. 8(1): p. 5-8.

83. Yang, P.C., Z. Xing, C.M. Berin, J.D. Soderholm, B.S. Feng, L. Wu and C. Yeh, TIM-4 expressed by mucosal dendritic cells plays a critical role in food antigen-specific Th2 differentiation and intestinal allergy. *Gastroenterology*, 2007. 133(5): p. 1522-33.
84. Akbari, O., G.J. Freeman, E.H. Meyer, E.A. Greenfield, T.T. Chang, A.H. Sharpe, G. Berry, R.H. DeKruyff and D.T. Umetsu, Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med*, 2002. 8(9): p. 1024-32.
85. del Rio, M.L., J.I. Rodriguez-Barbosa, E. Kremmer and R. Forster, CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*, 2007. 178(11): p. 6861-6.
86. Tsitoura, D.C., R.H. DeKruyff, J.R. Lamb and D.T. Umetsu, Intranasal exposure to protein antigen induces immunological tolerance mediated by functionally disabled CD4+ T cells. *J Immunol*, 1999. 163(5): p. 2592-600.
87. Albacker, L.A., S. Yu, D. Bedoret, W.L. Lee, S.E. Umetsu, S. Monahan, G.J. Freeman, D.T. Umetsu and R.H. Dekruyff, TIM-4, expressed by medullary macrophages, regulates respiratory tolerance by mediating phagocytosis of antigen-specific T cells. *Mucosal Immunol*, 2013. 6(3): p. 580-90.
88. Lim, A.I., L.Y. Chan, K.N. Lai, S.C. Tang, C.W. Chow, M.F. Lam and J.C. Leung, Distinct role of matrix metalloproteinase-3 in kidney injury molecule-1 shedding by kidney proximal tubular epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012. 44(6): p. 1040-50.
89. Hanayama, R., M. Tanaka, K. Miwa, A. Shinohara, A. Iwamatsu and S. Nagata, Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*, 2002. 417(6885): p. 182-7.
90. Blobel, C.P., ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. 6(1): p. 32-43.
91. Hooper, N.M., E.H. Karran and A.J. Turner, Membrane protein secretases. *Biochem J*, 1997. 321 ( Pt 2): p. 265-79.
92. Black, R.A., C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March and D.P. Cerretti, A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 1997. 385(6618): p. 729-33.
93. Peschon, J.J., J.L. Slack, P. Reddy, K.L. Stocking, S.W. Sunnarborg, D.C. Lee, W.E. Russell, B.J. Castner, R.S. Johnson, J.N. Fitzner, R.W. Boyce, N. Nelson, C.J. Kozlosky, M.F. Wolfson, C.T. Rauch, D.P. Cerretti, R.J. Paxton, C.J. March and R.A. Black, An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, 1998. 282(5392): p. 1281-4.
94. Feehan, C., K. Darlak, J. Kahn, B. Walcheck, A.F. Spatola and T.K. Kishimoto, Shedding of the lymphocyte L-selectin adhesion molecule is inhibited by a hydroxamic acid-based protease inhibitor. Identification with an L-selectin-alkaline phosphatase reporter. *J Biol Chem*, 1996. 271(12): p. 7019-24.
95. Tsakadze, N.L., S.D. Sithu, U. Sen, W.R. English, G. Murphy and S.E. D'Souza, Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J Biol Chem*, 2006. 281(6): p. 3157-64.

96. Mullberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P.C. Heinrich and S. Rose-John, The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol*, 1993. 23(2): p. 473-80.
97. Rose-John, S. and P.C. Heinrich, Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J*, 1994. 300 ( Pt 2): p. 281-90.
98. Gomis-Ruth, F.X., Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol*, 2003. 24(2): p. 157-202.
99. Bode, W., F.X. Gomis-Ruth and W. Stockler, Astacins, serralysins, 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*, 1993. 331(1-2): p. 134-40.
100. Blobel, C.P. and J.M. White, Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain. *Curr Opin Cell Biol*, 1992. 4(5): p. 760-5.
101. Seals, D.F. and S.A. Courtneidge, The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*, 2003. 17(1): p. 7-30.
102. Gonzales, P.E., A. Solomon, A.B. Miller, M.A. Leesnitzer, I. Sagi and M.E. Milla, Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain. *J Biol Chem*, 2004. 279(30): p. 31638-45.
103. Leonard, J.D., F. Lin and M.E. Milla, Chaperone-like properties of the prodomain of TNFalpha-converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch. *Biochem J*, 2005. 387(Pt 3): p. 797-805.
104. Endres, K., A. Anders, E. Kojro, S. Gilbert, F. Fahrenholz and R. Postina, 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*, 2003. 270(11): p. 2386-93.
105. Lum, L., M.S. Reid and C.P. Blobel, Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J Biol Chem*, 1998. 273(40): p. 26236-47.
106. Moss, M.L., M. Bomar, Q. Liu, H. Sage, P. Dempsey, P.M. Lenhart, P.A. Gillispie, A. Stoeck, D. Wildeboer, J.W. Bartsch, R. Palmisano and P. Zhou, The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J Biol Chem*, 2007. 282(49): p. 35712-21.
107. Horiuchi, K., S. Le Gall, M. Schulte, T. Yamaguchi, K. Reiss, G. Murphy, Y. Toyama, D. Hartmann, P. Saftig and C.P. Blobel, Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Mol Biol Cell*, 2007. 18(1): p. 176-88.
108. Nagano, O., D. Murakami, D. Hartmann, B. De Strooper, P. Saftig, T. Iwatsubo, M. Nakajima, M. Shinohara and H. Saya, Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *J Cell Biol*, 2004. 165(6): p. 893-902.
109. Abel, S., C. Hundhausen, R. Mentlein, A. Schulte, T.A. Berkhouit, N. Broadway, D. Hartmann, R. Sedlacek, S. Dietrich, B. Muetze, B. Schuster, K.J. Kallen, P. Saftig, S. Rose-John and A. Ludwig, 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*, 2004. 172(10): p. 6362-72.
110. Huovila, A.P., A.J. Turner, M. Pelto-Huikko, I. Karkkainen and R.M. Ortiz, Sheding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci*, 2005. 30(7): p. 413-22.

111. Koenen, R.R., J. Pruessmeyer, O. Soehnlein, L. Fraemohs, A. Zernecke, N. Schwarz, K. Reiss, A. Sarabi, L. Lindbom, T.M. Hackeng, C. Weber and A. Ludwig, Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood*, 2009. 113(19): p. 4799-809.
112. Amour, A., P.M. Slocombe, A. Webster, M. Butler, C.G. Knight, B.J. Smith, P.E. Stephens, C. Shelley, M. Hutton, V. Knauper, A.J. Docherty and G. Murphy, TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett*, 1998. 435(1): p. 39-44.
113. Amour, A., C.G. Knight, A. Webster, P.M. Slocombe, P.E. Stephens, V. Knauper, A.J. Docherty and G. Murphy, The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett*, 2000. 473(3): p. 275-9.
114. Ludwig, A., C. Hundhausen, M.H. Lambert, N. Broadway, R.C. Andrews, D.M. Bickett, M.A. Leesnitzer and J.D. Becherer, 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*, 2005. 8(2): p. 161-71.
115. Hundhausen, C., D. Misztela, T.A. Berkhout, N. Broadway, P. Saftig, D. Hartmann, F. Fahrenholz, R. Postina, V. Matthews, K.-J. Kallen, S. Rose-John and A. Ludwig, The disintegrin-like metalloproteinase ADAM 10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*, 2003. 102: p. 1186-1195.
116. Chantry, A., N.A. Gregson and P. Glynn, A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J Biol Chem*, 1989. 264(36): p. 21603-7.
117. Howard, L. and P. Glynn, Membrane-associated metalloproteinase recognized by characteristic cleavage of myelin basic protein: assay and isolation. *Methods Enzymol*, 1995. 248: p. 388-95.
118. Slack, B.E., L.K. Ma and C.C. Seah, Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem J*, 2001. 357(Pt 3): p. 787-94.
119. Allinson, T.M., E.T. Parkin, A.J. Turner and N.M. Hooper, ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res*, 2003. 74(3): p. 342-52.
120. Postina, R., A. Schroeder, I. Dewachter, J. Bohl, U. Schmitt, E. Kojro, C. Prinzen, K. Endres, C. Hiemke, M. Blessing, P. Flamez, A. Dequenne, E. Godaux, F. van Leuven and F. Fahrenholz, A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*, 2004. 113(10): p. 1456-64.
121. Pan, D. and G.M. Rubin, Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell*, 1997. 90(2): p. 271-80.
122. Six, E., D. Ndiaye, Y. Laabi, C. Brou, N. Gupta-Rossi, A. Israel and F. Logeat, The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(13): p. 7638-43.
123. Sahin, U., G. Weskamp, K. Kelly, H.M. Zhou, S. Higashiyama, J. Peschon, D. Hartmann, P. Saftig and C.P. Blobel, Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol*, 2004. 164(5): p. 769-79.

124. Kirkin, V., N. Cahuzac, F. Guardiola-Serrano, S. Huault, K. Luckeath, E. Friedmann, N. Novac, W.S. Wels, B. Martoglio, A.O. Hueber and M. Zornig, The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. *Cell Death Differ*, 2007. 14(9): p. 1678-87.
125. Maretzky, T., K. Reiss, A. Ludwig, J. Buchholz, F. Scholz, E. Proksch, B. de Strooper, D. Hartmann and P. Saftig, ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(26): p. 9182-7.
126. Franzke, C.W., K. Tasanen, L. Borradori, V. Huotari and L. Bruckner-Tuderman, Shedding of collagen XVII/BP180: structural motifs influence cleavage from cell surface. *J Biol Chem*, 2004. 279(23): p. 24521-9.
127. Lemieux, G.A., F. Blumenkron, N. Yeung, P. Zhou, J. Williams, A.C. Grammer, R. Petrovich, P.E. Lipsky, M.L. Moss and Z. Werb, The low affinity IgE receptor (CD23) is cleaved by the metalloproteinase ADAM10. *J Biol Chem*, 2007. 282(20): p. 14836-44.
128. Moss, M.L. and F.H. Rasmussen, Fluorescent substrates for the proteinases ADAM17, ADAM10, ADAM8, and ADAM12 useful for high-throughput inhibitor screening. *Anal Biochem*, 2007. 366(2): p. 144-8.
129. Weskamp, G., J.W. Ford, J. Sturgill, S. Martin, A.J. Docherty, S. Swendeman, N. Broadway, D. Hartmann, P. Saftig, S. Umland, A. Sehara-Fujisawa, R.A. Black, A. Ludwig, J.D. Becherer, D.H. Conrad and C.P. Blobel, ADAM10 is a principal 'sheddase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. *Nat Immunol*, 2006. 7(12): p. 1293-8.
130. Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, A. Lena Illert, K. von Figura and P. Saftig, The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet*, 2002. 11(21): p. 2615-24.
131. Arima, T., H. Enokida, H. Kubo, I. Kagara, R. Matsuda, K. Toki, H. Nishimura, T. Chiyomaru, S. Tatarano, T. Idesako, K. Nishiyama and M. Nakagawa, Nuclear translocation of ADAM-10 contributes to the pathogenesis and progression of human prostate cancer. *Cancer Sci*, 2007. 98(11): p. 1720-6.
132. McCulloch, D.R., M. Harvey and A.C. Herington, The expression of the ADAMs proteases in prostate cancer cell lines and their regulation by dihydrotestosterone. *Mol Cell Endocrinol*, 2000. 167(1-2): p. 11-21.
133. Pruessmeyer, J. and A. Ludwig, The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 2009. 20(2): p. 164-74.
134. Hundhausen, C., A. Schulte, B. Schulz, M.G. Andrzejewski, N. Schwarz, P. von Hundelshausen, U. Winter, K. Paliga, K. Reiss, P. Saftig, C. Weber and A. Ludwig, Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. *J Immunol*, 2007. 178(12): p. 8064-72.
135. Sanderson, M.P., S.N. Erickson, P.J. Gough, K.J. Garton, P.T. Wille, E.W. Raines, A.J. Dunbar and P.J. Dempsey, ADAM10 mediates ectodomain shedding of the betacellulin precursor activated by p-aminophenylmercuric acetate and extracellular calcium influx. *J Biol Chem*, 2005. 280(3): p. 1826-37.
136. Kojro, E., G. Gimpl, S. Lammich, W. Marz and F. Fahrenholz, Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(10): p. 5815-20.

137. Garbers, C., N. Jänner, A. Chalaris, M.L. Moss, D.M. Floss, D. Meyer, F. Koch-Nolte, S. Rose-John and J. Scheller, Species specificity of ADAM10 and ADAM7 in IL-6 transsignaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6R shedding. *J Biol Chem*, 2011. 286(17): p. 14804-11.
138. Gu, B., L.J. Bendall and J.S. Wiley, Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood*, 1998. 92(3): p. 946-51.
139. Horiuchi, K., T. Kimura, T. Miyamoto, H. Takaishi, Y. Okada, Y. Toyama and C.P. Blobel, Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J Immunol*, 2007. 179(5): p. 2686-9.
140. Condon, T.P., S. Flournoy, G.J. Sawyer, B.F. Baker, T.K. Kishimoto and C.F. Bennett, ADAM17 but not ADAM10 mediates tumor necrosis factor-alpha and L-selectin shedding from leukocyte membranes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2001. 11(2): p. 107-16.
141. Hafezi-Moghadam, A., K.L. Thomas, A.J. Prorock, Y. Huo and K. Ley, L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *J Exp Med*, 2001. 193(7): p. 863-72.
142. Chalaris, A., B. Rabe, K. Paliga, H. Lange, T. Laskay, C.A. Fielding, S.A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller, Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood*, 2007. 110(6): p. 1748-55.
143. Matthews, V., B. Schuster, S. Schutze, I. Bussmeyer, A. Ludwig, C. Hundhausen, T. Sadowski, P. Saftig, D. Hartmann, K.J. Kallen and S. Rose-John, Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem*, 2003. 278(40): p. 38829-39.
144. Scheller, J., A. Chalaris, C. Garbers and S. Rose-John, ADAM17: a molecular switch controlling inflammatory and regenerative responses. *Trends Immunol*, 2011. 32(8): p. 380-7.
145. Chalaris, A., N. Adam, C. Sina, P. Rosenstiel, J. Lehmann-Koch, P. Schirmacher, D. Hartmann, J. Cichy, O. Gavrilova, S. Schreiber, T. Jostock, V. Matthews, R. Hasler, C. Becker, M.F. Neurath, K. Reiss, P. Saftig, J. Scheller and S. Rose-John, Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med*, 2010. 207(8): p. 1617-24.
146. Borrell-Pages, M., F. Rojo, J. Albanell, J. Baselga and J. Arribas, TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors. *EMBO J*, 2003. 22(5): p. 1114-24.
147. Santiago-Josefat, B., C. Esselens, J.J. Bech-Serra and J. Arribas, Post-transcriptional up-regulation of ADAM17 upon epidermal growth factor receptor activation and in breast tumors. *J Biol Chem*, 2007. 282(11): p. 8325-31.
148. Izumi, Y., M. Hirata, H. Hasuwa, R. Iwamoto, T. Umata, K. Miyado, Y. Tamai, T. Kurisaki, A. Sehara-Fujisawa, S. Ohno and E. Mekada, A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J*, 1998. 17(24): p. 7260-72.
149. Diaz-Rodriguez, E., J.C. Montero, A. Esparis-Ogando, L. Yuste and A. Pandiella, Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(6): p. 2031-44.

150. Fan, H., C.W. Turck and R. Derynck, Characterization of growth factor-induced serine phosphorylation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme and of an alternatively translated polypeptide. *J Biol Chem*, 2003. 278(20): p. 18617-27.
151. Xu, P. and R. Derynck, Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Mol Cell*, 2010. 37(4): p. 551-66.
152. Dusterhoft, S., S. Jung, C.W. Hung, A. Tholey, F.D. Sonnichsen, J. Grotzinger and I. Lorenzen, Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase. *J Am Chem Soc*, 2013. 135(15): p. 5776-81.
153. Willems, S.H., C.J. Tape, P.L. Stanley, N.A. Taylor, I.G. Mills, D.E. Neal, J. McCafferty and G. Murphy, Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *Biochem J*, 2010. 428(3): p. 439-50.
154. Fray, M.J., R.P. Dickinson, J.P. Huggins and N.L. Occleston, A potent, selective inhibitor of matrix metalloproteinase-3 for the topical treatment of chronic dermal ulcers. *J Med Chem*, 2003. 46(16): p. 3514-25.
155. Le Gall, S.M., P. Bobe, K. Reiss, K. Horiuchi, X.D. Niu, D. Lundell, D.R. Gibb, D. Conrad, P. Saftig and C.P. Blobel, 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*, 2009. 20(6): p. 1785-94.
156. Reiss, K., T. Maretzky, I.G. Haas, M. Schulte, A. Ludwig, M. Frank and P. Saftig, Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gamma-protocadherin C3 modulates cell-cell adhesion. *J Biol Chem*, 2006. 281(31): p. 21735-44.
157. Verreck, F.A., T. de Boer, D.M. Langenberg, M.A. Hoeve, M. Kramer, E. Vaisberg, R. Kastelein, A. Kolk, R. de Waal-Malefyt and T.H. Ottenhoff, Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(13): p. 4560-5.
158. Chung, H.S., K.S. Park, S.K. Cha, I.D. Kong and J.W. Lee, ATP-induced  $[Ca(2+)](i)$  changes and depolarization in GH3 cells. *Br J Pharmacol*, 2000. 130(8): p. 1843-52.
159. Guo, L., T. Takino, Y. Endo, T. Domoto and H. Sato, Shedding of kidney injury molecule-1 by membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *J Biochem*, 2012. 152(5): p. 425-32.
160. Caescu, C.I., G.R. Jeschke and B.E. Turk, Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem J*, 2009. 424(1): p. 79-88.
161. Dang, M., N. Armbruster, M.A. Miller, E. Cermenio, M. Hartmann, G.W. Bell, D.E. Root, D.A. Lauffenburger, H.F. Lodish and A. Herrlich, Regulated ADAM17-dependent EGF family ligand release by substrate-selecting signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(24): p. 9776-81.
162. Ivetic, A. and A.J. Ridley, The telling tail of L-selectin. *Biochem Soc Trans*, 2004. 32(Pt 6): p. 1118-21.
163. Mullberg, J., W. Oberthur, F. Lottspeich, E. Mehl, E. Dittrich, L. Graeve, P.C. Heinrich and S. Rose-John, The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J Immunol*, 1994. 152(10): p. 4958-68.

164. He, M., H. Kubo, K. Morimoto, N. Fujino, T. Suzuki, T. Takahasi, M. Yamada, M. Yamaya, T. Maekawa, Y. Yamamoto and H. Yamamoto, Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells. *EMBO Rep*, 2011. 12(4): p. 358-64.
165. Elliott, J.I., A. Surprenant, F.M. Marelli-Berg, J.C. Cooper, R.L. Cassady-Cain, C. Wooding, K. Linton, D.R. Alexander and C.F. Higgins, Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat Cell Biol*, 2005. 7(8): p. 808-16.
166. Fischer, K., S. Voelkl, J. Berger, R. Andreesen, T. Pomorski and A. Mackensen, Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8+ T cells. *Blood*, 2006. 108(13): p. 4094-101.
167. Borisenko, G.G., T. Matsura, S.X. Liu, V.A. Tyurin, J. Jianfei, F.B. Serinkan and V.E. Kagan, Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells--existence of a threshold. *Arch Biochem Biophys*, 2003. 413(1): p. 41-52.
168. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000. 100(1): p. 57-70.
169. Sporn, M.B. and A.B. Roberts, Autocrine growth factors and cancer. *Nature*, 1985. 313(6005): p. 745-7.
170. Franovic, A., I. Robert, K. Smith, G. Kurban, A. Pause, L. Gunaratnam and S. Lee, Multiple acquired renal carcinoma tumor capabilities abolished upon silencing of ADAM17. *Cancer Res*, 2006. 66(16): p. 8083-90.
171. Mesri, M., G. Smithson, A. Ghatpande, A. Chapoval, S. Shenoy, F. Boldog, C. Hackett, C.E. Pena, C. Burgess, A. Bendele, R.A. Shimkets and G.C. Starling, Inhibition of in vitro and in vivo T cell responses by recombinant human Tim-1 extracellular domain proteins. *Int Immunol*, 2006. 18(3): p. 473-84.

## 9 Anhang

### 9.1 Plasmidkarten und schematische Darstellungen der Klonierung

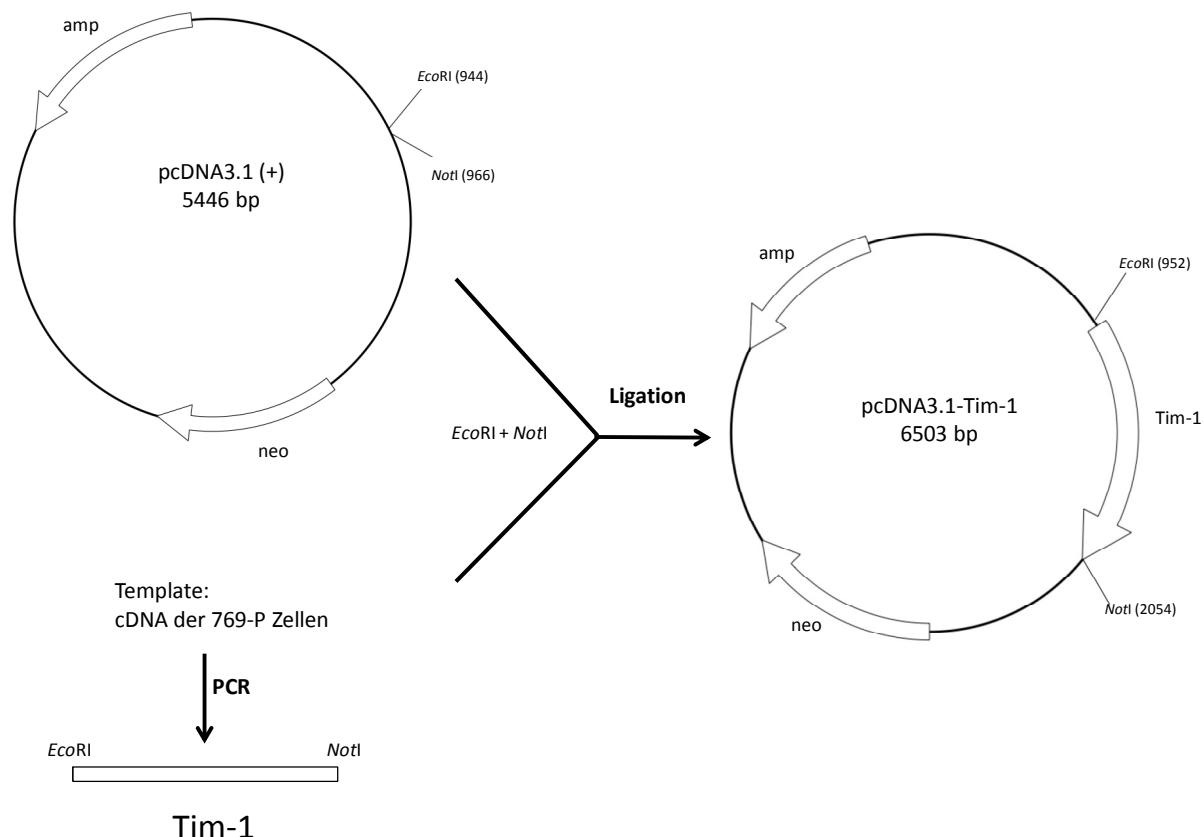


Abb. 9.1.1 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-Tim-1.

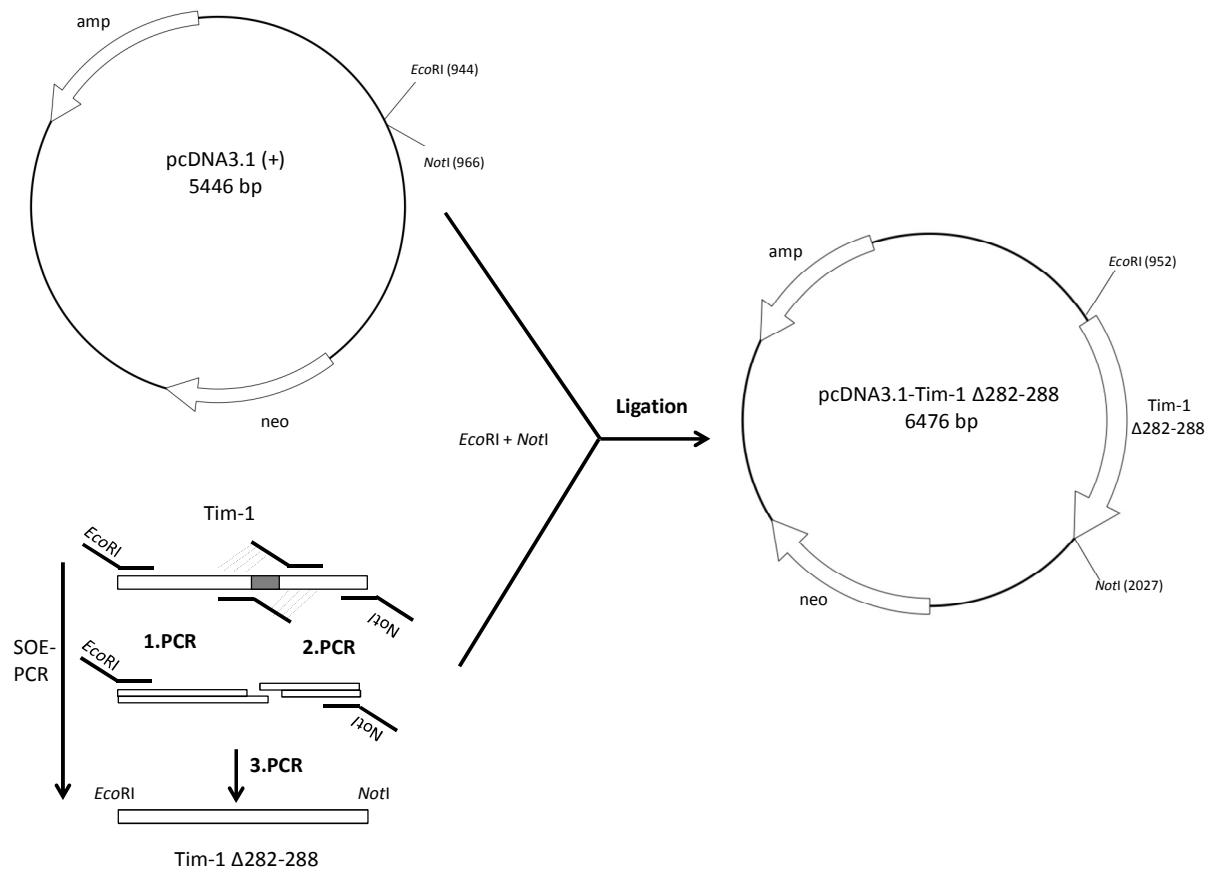


Abb. 9.1.2 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-Tim-1 Δ282-288.

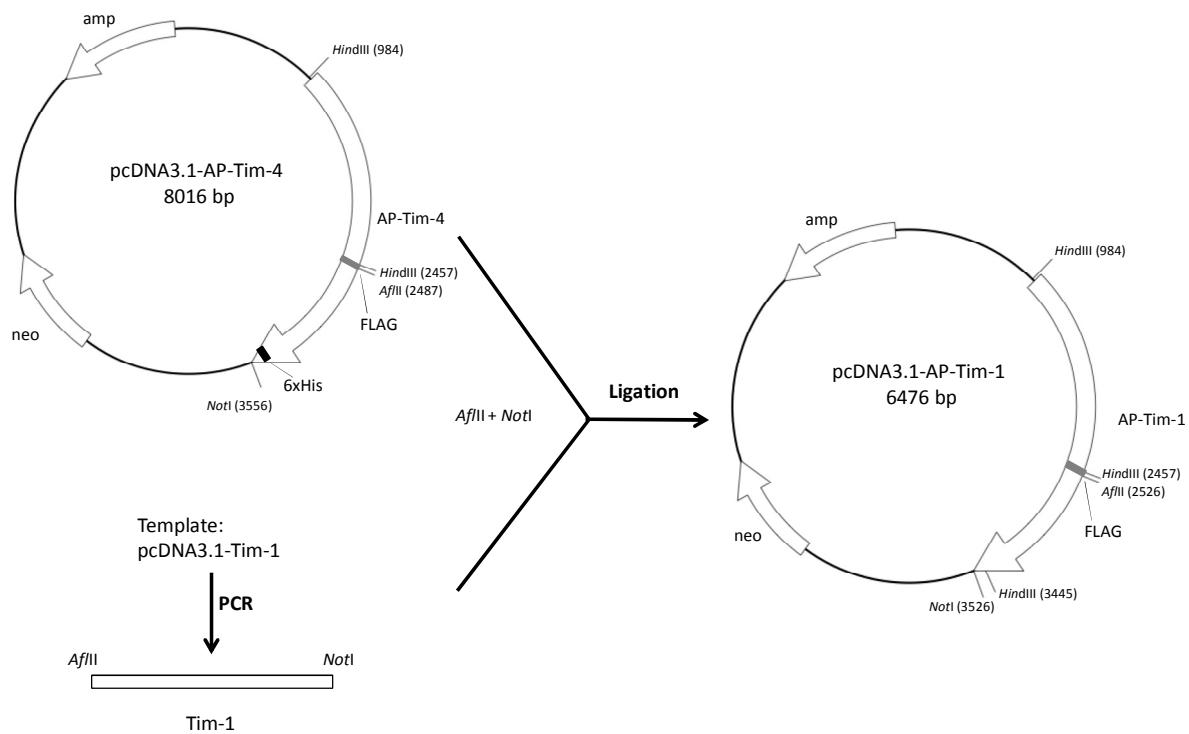
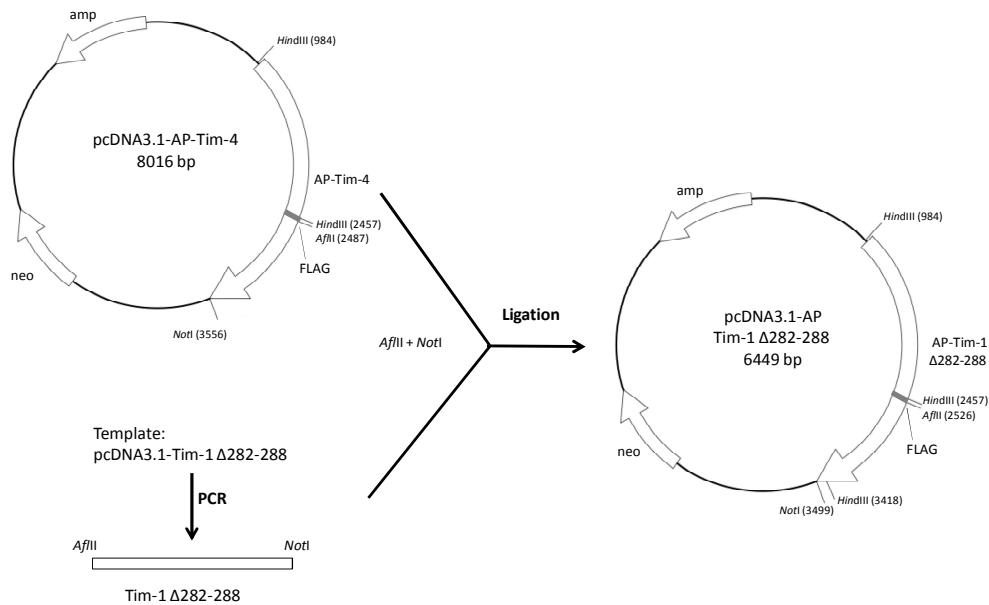
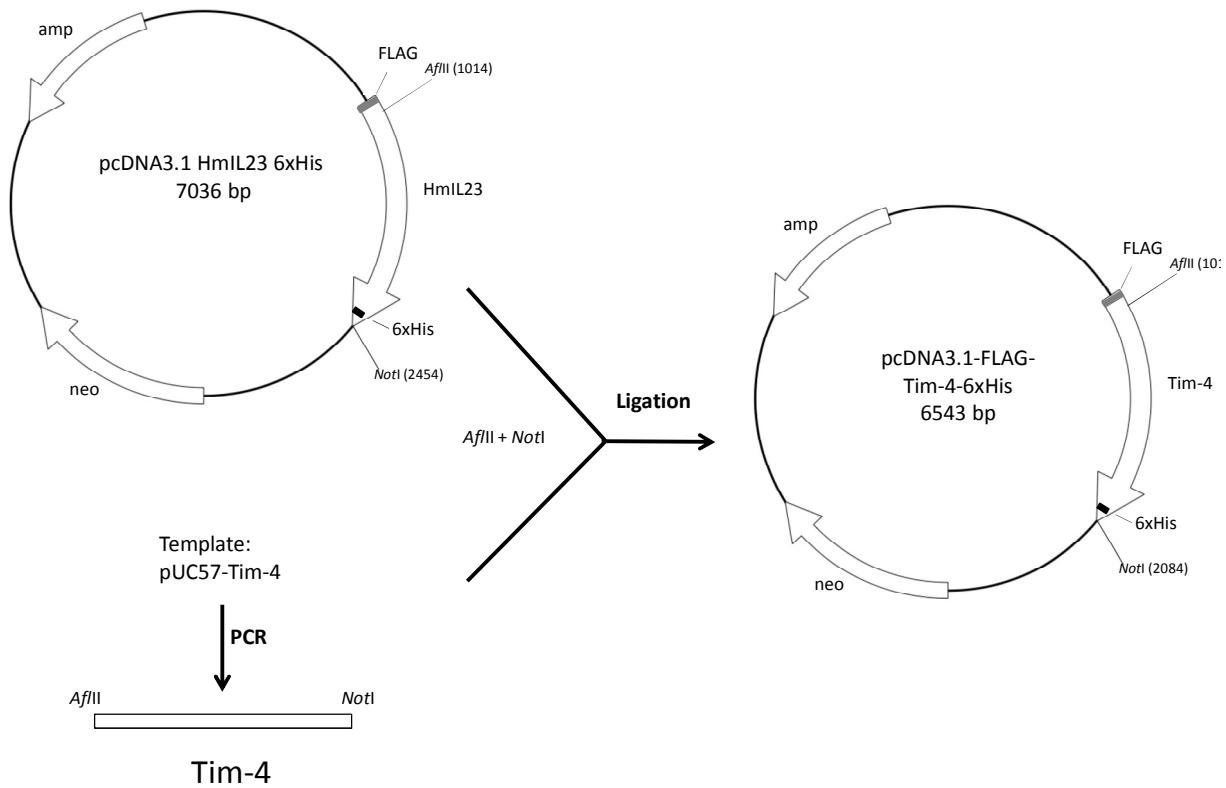


Abb. 9.1.3 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-AP-Tim-1.



**Abb. 9.1.4 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-AP-Tim-1 Δ282-288.**



**Abb. 9.1.5 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-FLAG-Tim-4-6xHis.**

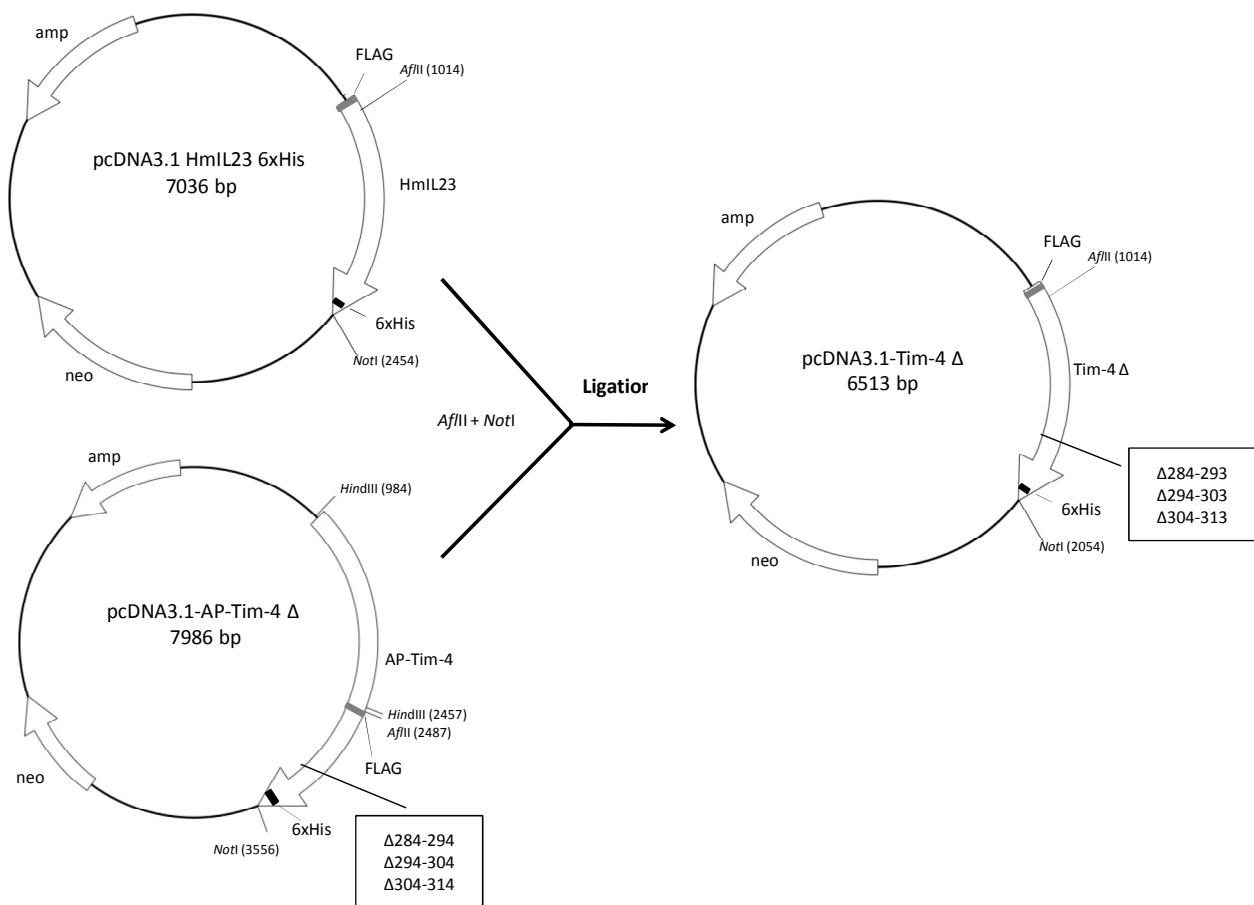


Abb. 9.1.6 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-Tim-4 Deletionsmutanten.

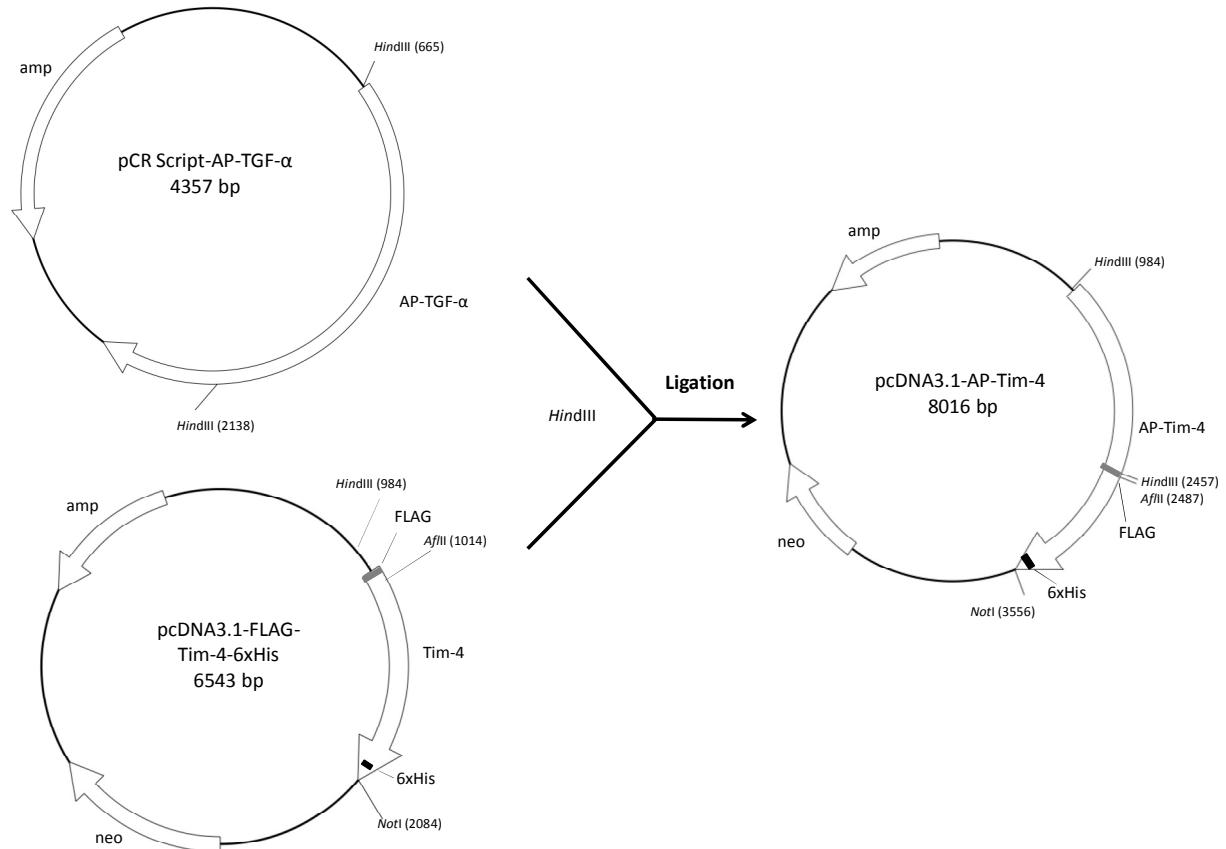


Abb. 9.1.7 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-AP-Tim-4.

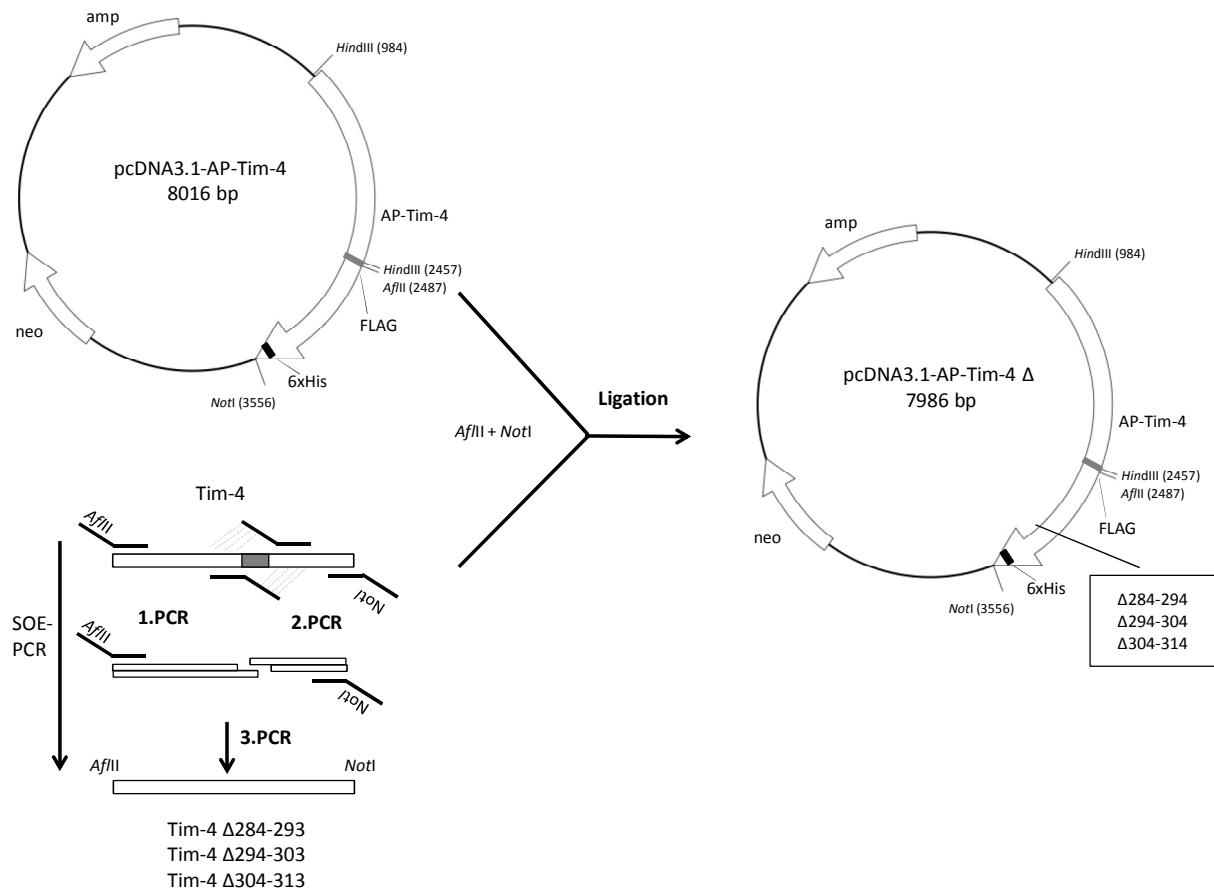


Abb. 9.1.8 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-AP-Tim-4 Deletionsmutanten.

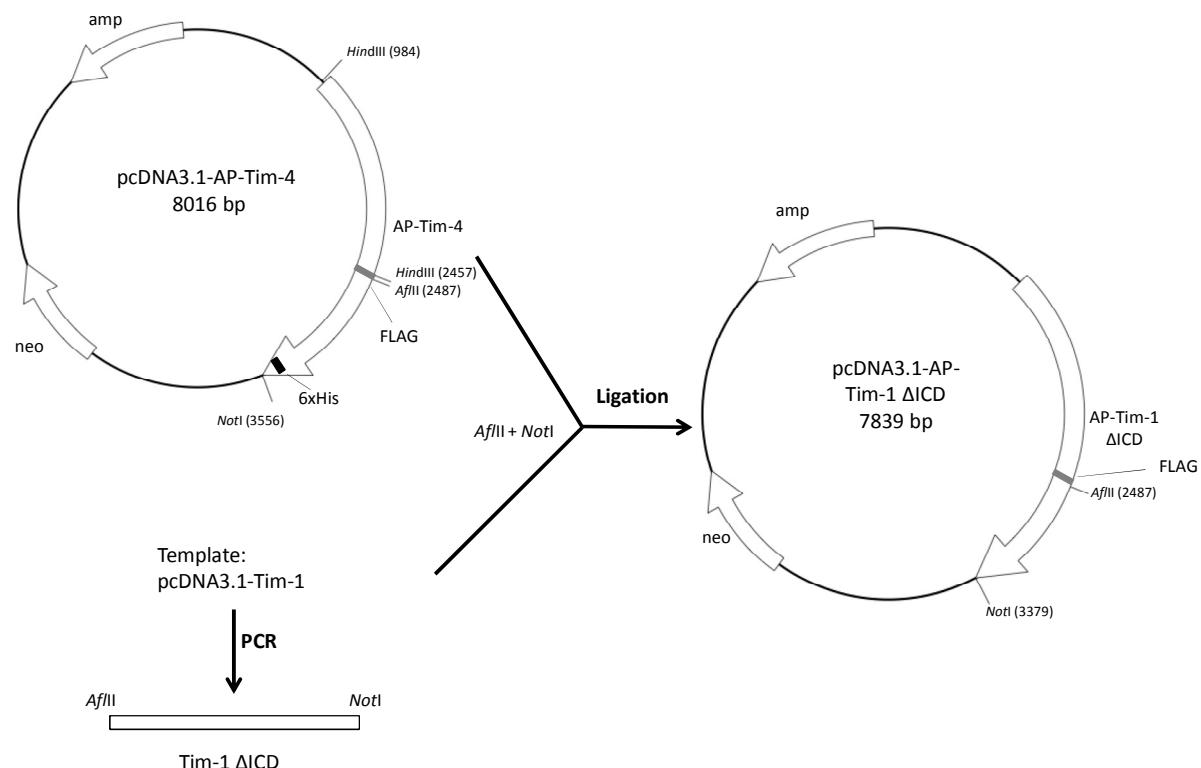


Abb. 9.1.9 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-AP-Tim-1 ΔICD.

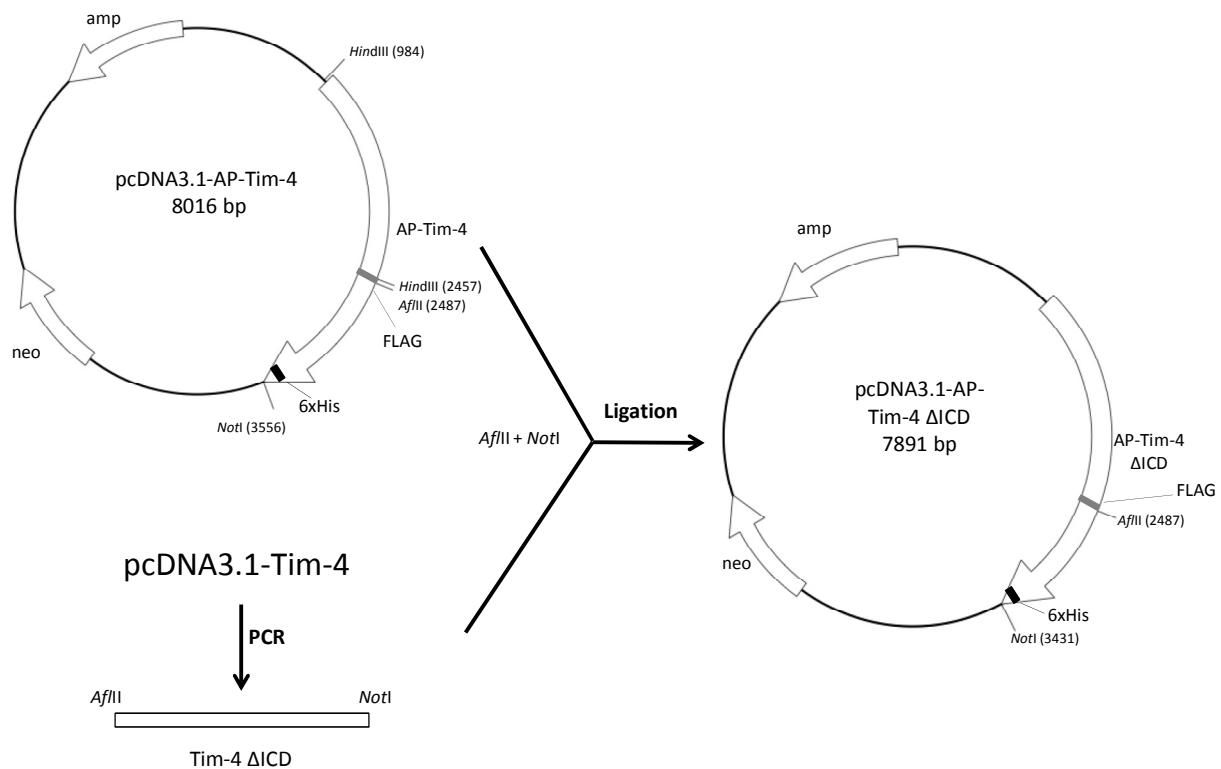


Abb. 9.1.10 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-AP-Tim-4 ΔICD.

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.1 Schematische Darstellung der Struktur der Tim-Proteine .....	2
Abb. 1.7.1 ADAM-vermitteltes <i>Ectodomain Shedding</i> eines transmembranen Proteins resultierend in der Freisetzung einer löslichen Variante .....	16
Abb. 4.2.1 Antigenerkennung der antikörperhaltigen Hybridomazellkulturüberstände im ELISA und Western Blot.....	49
Abb. 4.2.2 Immunfluoreszenzfärbung mit T27-2 (anti-Tim-4 Antikörper) .....	50
Abb. 4.3.1 Oberflächenexpression von Tim-1 und Tim-4 auf transient transfizierten HEK293 Zellen.....	51
Abb. 4.3.2 Induziertes <i>Shedding</i> von Tim-1 und Tim-4 in transient transfizierten HEK293 Zellen .....	52
Abb. 4.4.1 Induziertes <i>Shedding</i> von AP-Tim-1 und AP-Tim-4 Fusionsproteinen in transient transfizierten HEK293 Zellen.....	54
Abb. 4.4.2 Induziertes <i>Shedding</i> von AP-Tim-1 und AP-Tim-4 Fusionsproteinen wird durch die geringen Konzentrationen der eingesetzten Inhibitoren gehemmt.....	56
Abb. 4.4.3 Induziertes <i>Shedding</i> der AP-Tim-1 und AP-Tim-4 Fusionsproteine in transient transfizierten MEFs .....	58
Abb. 4.5.1 Expression und <i>Shedding</i> von AP-Tim-1-ΔICD und AP-Tim-4-ΔICD Mutanten in transient transfizierten HEK293 Zellen .....	59
Abb. 4.6.1 Schematische Darstellung der Tim-1 Δ282-288 Mutante .....	59
Abb. 4.6.2 Expression und <i>Shedding</i> der Tim-1 Mutante Δ282-288 in transient transfizierten HEK293 Zellen.....	60
Abb. 4.6.3 Schematische Darstellung der Tim-4 Deletionsmutanten .....	61
Abb. 4.6.4 Expression und <i>Shedding</i> der AP-Tim-4 Deletionsmutanten in transient transfizierten HEK293 Zellen.....	62
Abb. 4.6.5 Expression und <i>Shedding</i> von Tim-4 Deletionsmutanten in transient transfizierten HEK293 Zellen.....	63
Abb. 4.7.1 Induziertes <i>Shedding</i> von endogenem Tim-1 in 769-P Zellen.....	64
Abb. 4.7.2 Expression von ADAM10 und ADAM17 und Induziertes <i>Shedding</i> in 769-P Zellen defizient für ADAM10 und / oder ADAM17 mittels siRNA in 769-P Zellen.....	65
Abb. 4.8.1 MMP-3 ist nicht an PMA und Ionomycin induziertem <i>Shedding</i> von Tim-1 beteiligt.....	66
Abb. 4.9.1 Expression von endogenem Tim-4 auf <i>in vitro</i> differenzierten Makrophagen .....	68
Abb. 4.9.2 <i>Shedding</i> von Tim-4 auf <i>in vitro</i> differenzierten Makrophagen .....	69
Abb. 4.10.1 Lokalisation von endogenem Tim-4 auf <i>in vitro</i> differenzierten Makrophagen .....	71
Abb. 4.10.2 Translokation von Tim-4 nach Stimulation auf <i>in vitro</i> differenzierten Makrophagen .....	72
Abb. 4.11.1 Bindung der löslichen Tim-1 und Tim-4 Proteine an Phosphatidylserin.....	74
Abb. 4.12.1 PMA-Stimulation induziert Invasion von 769-P Zellen. ....	76
Abb. 9.1.1 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-Tim-1.....	102
Abb. 9.1.2 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-Tim-1 Δ282-288. ....	103
Abb. 9.1.3 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-AP-Tim-1. ....	103
Abb. 9.1.4 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-AP-Tim-1 Δ282-288.....	104
Abb. 9.1.5 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-FLAG-Tim-4-6xHis. ....	104
Abb. 9.1.6 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-Tim-4 Deletionsmutanten.....	105
Abb. 9.1.7 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-AP-Tim-4. ....	105
Abb. 9.1.8 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-AP-Tim-4 Deletionsmutanten.....	106
Abb. 9.1.9 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-AP-Tim-1 ΔICD. ....	107
Abb. 9.1.10 Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1-AP-Tim-4 ΔICD. ....	107

## 9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Pufferzusammensetzung für Polyacrylamidgele ( <i>Western Blot</i> ) .....	24
Tabelle 2.2 Sequenzen der verwendeten Primer .....	27
Tabelle 2.3 Antikörper.....	28

## 9.4 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADAM	<i>A Desintegrin and Metalloproteinase</i>
AGMK	<i>African Green Monkey Kidney cells</i>
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
B <sub>regs</sub>	regulatorische B-Zellen
BzATP	Benzoyladenosintriphosphat
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDS	<i>Coding DNA Sequence</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary cells</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	<i>Dendritic Cell</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dsDNA	Doppelstrang-DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBOV	Ebolavirus
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EGTA	<i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i> )
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
GI	GI254023X, ADAM10 Inhibitor

GW	GW280264X, ADAM10 und ADAM17 Inhibitor
HAV	Hepatitis A Virus
HAVCR-1	Hepatitis A Virus Zellulärer Rezeptor 1
HB-EGF	<i>Heparin-Binding EGF-like growth factor</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
ICD	Intrazelluläre Domäne
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IgV	Immunoglobulindomäne
IL-4/6/10	Interleukin-4/6/10
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
KIM-1	<i>Kidney Injury Molecule 1</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LMIR5	<i>Leukocyte Mono-Ig-like Receptor 5</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MA	Marimastat
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MARV	Marburgvirus
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MFG-E8	<i>Milk Fat Globule-EGF factor 8</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MI	MMP-3 Inhibitor
MILIBS	<i>Metal Ion-dependent Ligand Binding Site</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor for Activation of T-cells</i>
NKT	<i>Natural Killer T cells</i>
NUR77	<i>NUR response element transcription factor 77</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>

PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Protein-Disulfidisomerase
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
proA10	ADAM10 Pro-Domäne
PS	Phosphatidylserin
PTEC	<i>Proximal Tubular Epithelial Cell</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation End Products</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOE-PCR	<i>Splicing by Overlap Extension PCR</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TACE	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math> Converting Enzyme</i>
Tapr	<i>T-cell and Airway Phenotype Regulator</i>
TGF- $\alpha$	<i>Transforming Growth Factor <math>\alpha</math></i>
Th1	Typ1-T-Helferzellen
Th2	Typ2-T-Helferzellen
Tim	<i>T cell Immunoglobulin and Mucin domain</i>
Tim-1/4-Fc	Tim-1 / 4 fusioniert mit der Fc-Region eines humanen IgG <sub>1</sub>
TIMP	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
T <sub>regs</sub>	regulatorischen T-Zellen
WGA-FITC	<i>Fluorescein Wheat Germ Agglutinin</i>

## 9.5 Publikationen

- Schweigert, O.**, C. Dewitz, K. Moller-Hackbarth, A. Trad, C. Garbers, S. Rose-John, and J. Scheller. 2014. Soluble T cell immunoglobulin and mucin domain (TIM)-1 and -4 generated by A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM)-10 and -17 bind to phosphatidylserine. *Biochim Biophys Acta*. 1843:275-287.
- Dewitz, C., K. Moller-Hackbarth, **O. Schweigert**, K. Reiss, A. Chalaris, J. Scheller, and S. Rose-John. 2014. T-cell immunoglobulin and mucin domain 2 (TIM-2) is a target of ADAM10-mediated ectodomain shedding. *FEBS J.* 281:157-174.
- Moller-Hackbarth, K., C. Dewitz, **O. Schweigert**, A. Trad, C. Garbers, S. Rose-John, and J. Scheller. 2013. A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) 10 and ADAM17 Are Major Sheddases of T Cell Immunoglobulin and Mucin Domain 3 (Tim-3). *J Biol Chem*. 288:34529-34544.
- Braun, O.**, C. Dewitz, K. Moller-Hackbarth, J. Scheller, T. Schiffelholz, P.C. Baier, and S. Rose-John. 2013. Effects of blockade of peripheral interleukin-6 trans-signaling on hippocampus-dependent and independent memory in mice. *J Interferon Cytokine Res*. 33:254-260.
- Willenbrock, S., **O. Braun**, J. Baumgart, S. Lange, C. Junghanss, A. Heisterkamp, I. Nolte, J. Bullerdiek, and H. Murua Escobar. 2012. TNF-alpha induced secretion of HMGB1 from non-immune canine mammary epithelial cells (MTH53A). *Cytokine*. 57:210-220.

## 9.6 Lebenslauf

Name: Olga Schweigert geb. Braun

Geburtstag: 29. 08. 1981

Geburtsort: Kzylorda (Kasachstan)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

08/2009 – 03/2014 Promotion im Biochemischen Institut der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts Universität Kiel bei Prof. Dr. Rose-John

**Titel: „Molekulare Grundlagen der proteolytischen Spaltung von Tim-1 und Tim-4 durch ADAM-Proteasen“**

08/2007 – 10/2008 Diplomarbeit im Institut für Humangenetik der Universität Bremen bei Prof. Dr. Jorn Bullerdiek

**Titel: „Herstellung von HMGB1-Expressionsvektoren und Femtosekundenlaser basierte Transfektion“ (Note 1,0)**

09/2003 – 08/2007 Studium der Biologie an der Carl von Ossietzky Universität in Oldenburg (Oldenburg).

Hauptfach: Genetik; Nebenfächer: Biochemie und Zellbiologie

**Abschluss: Diplom (Note 1,3)**

08/1999 – 06/2003 Emil-Krause-Gymnasium, Hamburg.

**Abschluss: Abitur (Note 2,3)**

## 9.7 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Stefan Rose-John und Prof. Dr. Jürgen Scheller für die Bereitstellung des Themas und für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit am Institut der Biochemie durchführen zu können, sowie für die hervorragende Betreuung und Unterstützung.

Prof. Dr. Thomas Roeder möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser externen Promotion danken.

Bei Prof. Dr. Björn Rabe, Dr. Athena Chalaris-Rissmann und Dr. Christoph Garbers möchte ich mich herzlich für die kompetente Ratschläge und erstklassige Hilfsbereitschaft bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Katja Möller-Hackbarth und Dr. Christin Dewitz für die bemerkenswerte Zusammenarbeit bedanken. Mein Herzlicher Dank gilt Eva-Maria Wagener für ihre Unterstützung und die unterhaltenden Gespräche.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie danke ich für die spontane Hilfe bei der Suche nach Lösungswegen und bei den unterschiedlichen Problemen im Labor-Alltag. Mein besonderer Dank gilt hier vor allem Jessica Schneider für die technische und persönliche Unterstützung sowie Renate Thun für die unbeirrte Ermutigung. Vielen Dank an Katharina Knittler, Karen Bartsch, Steffen Riethmüller und Dr. Janina Wolf für zwar kurze aber schöne Zeit zusammen und für die exzellente Hilfe bei den Korrekturen und Bewerbungen.

Vielen, vielen Dank an Anna Zaslawski und Dr. Maria Stevanović für die unterstützende und ermunternde Worte und die herrlichen Feierabende. Vor allem möchte ich Timo Effenberger für die zuverlässige Unterstützung und für seine geduldige Präsenz als Ansprechpartner bei allen möglichen Problemen und Schwierigkeiten danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Meinem Mann Konstantin Schweigert für seine unermüdliche Unterstützung, seine Liebe, Motivation und für die wunderbare Begleitung durch mein ganzes Leben.

## 9.8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Olga Schweigert, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig 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.

Kiel, März 2014

Olga Schweigert