

Regulation der ADP-Ribosyltransferase ARTC2.2 durch Nukleotid-induzierte Proteolyse

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften
Universität Hamburg

vorgelegt von
Stephan Menzel
aus Hamburg

Hamburg, April 2014

Erstgutachter

Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE),
Martinistr. 52, 20246 Hamburg

Zweitgutachter

Prof. Dr. Wolfgang Streit
Biozentrum Klein Flottbek
Ohnhorstr. 18, 22609 Hamburg

Tag der Disputation: 11.07.2014

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Friedrich Nolte für dieses interessante Thema sowie die hervorragende und intensive Betreuung und die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf Kongressen im In- und Ausland zu präsentieren. Ebenfalls vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Wolfgang Streit für das Interesse an diesem Thema und die Übernahme des Koreferates dieser Arbeit.

Meinen Kollegen am Institut für Immunologie möchte ich sehr für die schöne Zeit und all die Unterstützung danken. Besonderen Dank an Fabienne Seyfried, die mich zu Beginn an die Hand genommen hat und die gesamte Zeit eine große Unterstützung war sowie an Welbeck Danquah und Björn Rissiek für die Einarbeitung am FACS und die Bereitschaft, ihr fachliches Wissen jederzeit mit mir zu teilen.

Vielen Dank an alle Kooperationspartner, deren Ergebnisse in diese Arbeit mit aufgenommen wurden:

Prof. Dr. Andreas Tholey, Dr. Thomas Jakoby und Dr. Tomas Koudelka aus dem Institut für experimentelle Medizin der CAU Kiel für die massenspektrometrischen Untersuchungen zur Bestimmung der Spaltstelle der ARTC2.2 (Abb. 4.1.5) und der ADP-Ribosylierungsstelle von IFN- γ (Abb. 4.2.3),

PD. Dr. Catherine Meyer-Schwesinger aus der III. Medizinischen Klinik des UKE für die Analyse zur Induktion des Immunoproteasoms durch IFN- γ (Abb. 4.2.6),

Marion Nissen und Joanna Schmid für die Produktion und Aufreinigung der gespaltenen ARTC2.2 für die Bestimmung der Spaltstelle (Abb. 4.1.5),

Björn Rissiek für die Analysen zur STAT1-Phosphorylierung (Abb. 4.2.5) sowie der Firma Ablynx für die Immunisierung der Lamas (Abb. 4.3.1).

Dem SFB877 und der DFG möchte ich für die finanzielle Unterstützung und die Möglichkeiten der Weiterbildung und Präsentation meiner Ergebnisse danken.

Mein privater Dank geht an meine Familie, insbesondere an meine zukünftige Frau Josefine Piper und unsere kleine Marlene, die mir beide so viel Liebe und Energie geben und mir in der Zeit des Schreibens auch die langen Tage verziehen und somit diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Ein Teil der hier präsentierten Ergebnisse wurde bereits publiziert oder ist zur Publikation vorbereitet:

Menzel, S., Rissiek, B., Haag, F., Goldbaum, F. A. & Koch-Nolte, F. (2013).

The art of blocking ADP-ribosyltransferases (ARTs): nanobodies as experimental and therapeutic tools to block mammalian and toxin ARTs.

The FEBS Journal, 280(15), 3543–3550.

Menzel, S., Mikciewicz, M., Koudelka, T., Jakoby, T., Bannas, P., Schwarz, N., Nissen, M., Haag, F., Meyer-Schwesinger, C., Tholey, A. & Koch-Nolte, F. (2014).

Shedding of ARTC2.2 from T cells regulates interferon-gamma signaling by reversible ADP-ribosylation.

zur Publikation vorbereitet

Kongressbeiträge:

The three-dimensional structure of human arginine ADP-ribosylhydrolase ARH1

Vortrag, PARP2010 (Zürich, 2010)

Extracellular nucleotides can activate TACE via the purinergic P2X7 receptor - new tools for modulating TACE mediated ectodomain-shedding

Poster, Proteolysis and Pathophysiology (Kiel, 2011)

Extracellular NAD⁺ and ATP induce shedding of the ecto-domain of the ART2 ADP-Ribosyltransferase from T-cells

Vortrag, Parpregio2012 (Aachen, 2012)

Extracellular NAD⁺ and ATP induce shedding of the ecto-domain of the ART2 ADP-ribosyltransferase from T cells

Poster, Protease World in Health & Disease (Kiel, 2012)

ADAM protease activation by extracellular NAD and ATP

Poster, SFB877 Begutachtung (Kiel, 2014)

Zusammenfassung

Die ADP-Ribosyltransferase ARTC2.2 ist ein Ekto-Enzym auf T-Zellen, das die Übertragung der ADP-Ribose-Gruppe von NAD auf Membranproteine katalysiert. Die ARTC2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung öffnet den P2X7-Ionenkanal und induziert membrannahe Proteolyse (*Shedding*) von Oberflächenproteinen durch ADAM-Proteasen. Vorarbeiten unserer Gruppe zeigten, dass ARTC2.2 nach Behandlung von T-Zellen mit Phorbolestern proteolytisch von der Zellmembran abgestoßen wird. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ARTC2.2 auch durch Nukleotid-induziertes *Shedding* freigesetzt werden kann. Hierfür wurde der Verlust von ARTC2.2 nach Behandlung der Zellen mit NAD und verschiedenen Inhibitoren untersucht. Es zeigte sich ein NAD-induzierter Verlust von ARTC2.2 von der Zelloberfläche in Abhängigkeit von der Aktivität von ARTC2.2, P2X7 und ADAM-Proteasen. Die ARTC2.2 konnte nach *Shedding* aus dem Überstand aufgereinigt und F239/S240 als Spaltstelle massenspektrometrisch bestimmt werden.

Mittels radioaktiver Markierung von Zielproteinen nach Inkubation mit ³²P-NAD wurde gezeigt, dass die ARTC2.2 nach *Shedding* (sARTC2.2) enzymatisch aktiv ist und eine veränderte Substratspezifität, von Membranproteinen hin zu sekretorischen Proteinen, aufweist. sARTC2.2 ADP-ribosyliert einige Zytokine - darunter bevorzugt Interferon- γ (IFN- γ). Die ADP-Ribosylierung von IFN- γ wurde näher untersucht und Arginin 128 als ADP-Ribosylierungsstelle bestimmt. Assays zur IFN- γ -vermittelten Induktion der STAT1-Phosphorylierung und der Bildung des Immunoproteasoms zeigten, dass die ADP-Ribosylierung IFN- γ inhibiert und ferner, dass diese Inhibition durch de-ADP-Ribosylierung mit der ADP-Ribosyl-Hydrolase 1 reversibel ist.

Da ADAM17 als induzierbares *Shedding*-Enzym gilt, wurden ADAM17-spezifische Antikörper als experimentelle Werkzeuge hergestellt. Hierzu wurden einerseits ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper (K133) generiert, andererseits aus der Lymphozyten-RNA zweier immunisierter Lamas Phagemidbibliotheken kloniert und spezifisch ADAM17-bindende Nanobodies über die Phagen-Display-Technologie selektioniert. Nanobody-Fc-Fusionsproteine (Nb-Fc) wurden kloniert, produziert und charakterisiert. Zwei Nb-Fcs (ST127 und ST161) zeigen hohe Affinitäten für ADAM17. K133, ST127 und ST161 sind in ELISA, Immunfluoreszenz sowie Western-Blot-Analysen einsetzbar. ST127 und ST161 erkennen spezifisch die katalytische Domäne bzw. die Prodomäne. Diese Antikörper stellen wertvolle Werkzeuge für die weitere Analyse der ADAM17 dar.

abstract

The ADP-ribosyltransferase ARTC2.2 is an ecto-enzyme on the cell surface of T cells that catalyzes the transfer of ADP-ribose from NAD to cell surface proteins. ARTC2.2-mediated ADP-ribosylation activates the P2X7 ion channel and induces ADAM protease-mediated shedding of membrane proteins. As previously shown by our group, ARTC2.2 is released from the cell surface of T cells upon stimulation with phorbol esters. To determine whether ARTC2.2 is also shed via nucleotide-induced ADAM activation, cells were treated with NAD and different inhibitors. The results show that NAD induces ARTC2.2-, P2X7- and ADAM-dependent cleavage of ARTC2.2 from the cell surface. Shed ARTC2.2 (sARTC2.2) was purified from the supernatant of nucleotide treated cells. Mass spectrometry identified F238/S240 as the cleavage site of ARTC2.2.

Radioactive labeling of target proteins after treatment with ³²P-NAD revealed that sARTC2.2 is enzymatically active and has an altered substrate specificity, now preferring secreted proteins over membrane proteins. sARTC2.2 can ADP-ribosylate a number of cytokines with preference for interferon- γ (IFN- γ). ADP-ribosylation of IFN- γ was analyzed further and arginine 128 - located in the functionally important C-terminal region - was identified as the primary ADP-ribosylation site. In assays of IFN- γ -induced STAT1 phosphorylation and assembly of the immunoproteasome it was shown that ADP-ribosylation inhibits IFN- γ and that this inhibition could be restored by de-ADP-ribosylation catalyzed by the ADP-ribosyl hydrolase 1.

ADAM17 is the major inducible sheddase. ADAM17-specific antibodies were developed as new experimental tools. Firstly, a polyclonal rabbit antibody - K133 - was generated. Secondly, nanobodies were generated by cloning phage display libraries from lymphocyte RNA of immunized llamas and selection of specific phages by panning on immobilized ADAM17. Nanobody-Fc fusion proteins (Nb-Fc) were cloned, produced and characterized. Two Nb-Fcs - ST127 and ST161 - show high affinities for ADAM17. K133, ST127 and ST161 can be used in immunofluorescence, ELISA and Western-blot analyses. ST127 and ST161 recognize epitopes on the ADAM17 catalytic domain and prodomain, respectively. These nanobodies provide useful tools for further analyses of ADAM17.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	ARTC2.2: eine membranständige ADP-Ribosyltransferase	10
1.2	P2X7: ein Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal	15
1.3	Interferon- γ : ein Leit-Zytokin der T-Zell-Polarisierung	19
1.4	ADAM17: eine membranständige Metalloprotease	22
1.5	Nanobodies: einzigartige Einzel-Domänen-Antikörper aus Lamas	27
1.6	Ziele der Arbeit	31
2	Materialien	32
2.1	Laborgeräte	32
2.2	Verbrauchsmaterialien	33
2.3	Reagenzsysteme (Kits)	33
2.4	Chemikalien	34
2.5	Medien	35
2.6	Puffer	36
2.7	Antikörper	37
2.8	Enzyme	38
2.9	Mauslinien	38
2.10	Zytokine	38
2.11	Inhibitoren	39
2.12	DNA- und Protein-Standards	39
2.13	Oligonukleotide	39
2.14	Plasmide	40
2.15	Pro- und Eukaryotische Zellen	40
3	Methoden	41
3.1	Molekularbiologische Methoden	41
3.1.1	Quantifizierung von Nukleinsäuren	41
3.1.2	Reverse Transkription (RT) und Polymerase Kettenreaktion (PCR)	41
3.1.3	DNA-Sequenzierung	42
3.1.4	Agarose-Gelelektrophorese und Gelaufreinigung	42
3.1.5	Restriktionsverdau von DNA	43
3.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten	43
3.1.7	Transformation kompetenter Bakterien	43
3.1.8	Kultivierung von Bakterien	44
3.1.9	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien	44
3.2	Phagen-Display-Technologie	45

3.2.1	Klonierung des VHH-Immunrepertoires	46
3.2.2	Produktion der Phagenbibliotheken	47
3.2.3	Selektion	49
3.2.4	Reinfektion und Amplifikation selektionierter Phagen	49
3.3	Proteinbiochemische Methoden	50
3.3.1	Produktion von Nanobody-Fc-Fusionsproteinen	50
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung	51
3.3.3	ADP-Ribosylierung und de-ADP-Ribosylierung von IFN- γ	52
3.3.4	Assays zur enzymatischen Markierung mit ^{32}P -NAD	53
3.3.5	Fluorometrische Bestimmung der ADAM17-Inhibition	56
3.4	Zellbiologische Methoden	57
3.4.1	Zellkultur	57
3.4.2	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	57
3.4.3	Nukleotid-induziertes Shedding und Aufreinigung von löslicher ARTC2.2	58
3.5	Immunologische Methoden	59
3.5.1	Durchflusszytometrie (FACS)	59
3.5.2	Analysen zum Verlust von CD62L und ARTC2.2 von der Zelloberfläche	59
3.5.3	Analyse der Bindung des pAK K133 an ADAM17-transfizierten Zellen	60
3.5.4	Analyse der STAT1-Phosphorylierung in Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit IFN- γ	60
3.5.5	Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM)	61
3.5.6	ELISA-Untersuchungen (enzyme-linked immunosorbent assay)	62
3.5.7	Western-Blot und Immunodetektion	62
3.5.8	Western-Blot Analyse der gebundenen ADAM17-Domänen	63
3.5.9	Induktion des Immunoproteasoms durch IFN- γ	63
3.6	Massenspektrometrie (MS)	64
3.6.1	Bestimmung der Spaltstelle von ARTC2.2	65
3.6.2	Bestimmung der ADP-Ribosylierungsstelle von IFN- γ	66
4	Ergebnisse	67
4.1	Regulation der ADP-Ribosyltransferase ARTC2.2 durch Nukleotid-induzierte Proteolyse (Shedding)	68
4.1.1	Bei der Präparation freigesetztes NAD führt zum Verlust von CD62L und ARTC2.2 von der Zelloberfläche	69
4.1.2	ARTC2.2, P2X7 und eine ADAM-Protease sind an NAD-induziertem Shedding von ARTC2.2 und CD62L beteiligt	71
4.1.3	ARTC2.2 wird von der Zelloberfläche transfizierter Zellen gespalten	73
4.1.4	Die Spaltstelle der ARTC2.2 liegt bei F239/S240 - drei Aminosäuren vor der Membranverankerung	74

4.1.5	Durch Shedding freigesetzte ARTC2.2 (sARTC2.2) ADP-ribosyliert sezernierte Proteine, aber nicht Membranproteine	76
4.2	sARTC2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung von Interferon- γ (IFN- γ)	78
4.2.1	sARTC2.2 ADP-ribosyliert einige Zytokine, bevorzugt IFN- γ	78
4.2.2	Die durch sARTC2.2 katalysierte ADP-Ribosylierung von IFN- γ ist reversibel	79
4.2.3	IFN- γ wird an R128 ADP-ribosyliert	81
4.2.4	Bindung an den Interferon- γ -Rezeptor verhindert die ADP-Ribosylierung von IFN- γ durch sARTC2.2	83
4.2.5	ADP-Ribosylierung inhibiert die Funktion von IFN- γ	84
4.3	Herstellung und Charakterisierung ADAM17-spezifischer Antikörper	87
4.3.1	Immunisierung des Kaninchens K133 und der Lamas 540 und 541	87
4.3.2	Selektion der ADAM17-spezifischen Nanobodies ST127 und ST161	92
4.3.3	ST127, ST161 und K133 erkennen unterschiedliche Domänen von ADAM17	98
5	Diskussion	103
5.1	Regulation der ADP-Ribosyltransferase ARTC2.2 durch Nukleotid-induzierte Proteolyse	104
5.2	Funktionelle Konsequenzen der ADP-Ribosylierung von Interferon- γ	110
5.3	Herstellung und Charakterisierung ADAM17-spezifischer Antikörper	115
5.4	Schlussfolgerungen und Ausblick	118
6	Anhang	121
6.1	Plasmidkarten	121
6.2	Sequenzen	122
6.2.1	Sequenzen der anti-ADAM17-Antikörper	122
6.2.2	Alignment von ADAM17-Sequenzen aus Mensch, Maus und Lama	123
6.2.3	Sequenzen der verwendeten ADAM17-Expressions-Konstrukte	124
6.2.4	Sequenzen der rekombinanten ADAM17-Proteine	125
6.2.5	Sequenz der verwendeten ARTC2.2	125
6.3	Abkürzungsverzeichnis	126
6.4	Literaturverzeichnis	129

1 Einleitung

1.1 ARTC2.2: eine membranständige ADP-Ribosyltransferase

Die ARTC2.2 ist ein Ekto-Enzym auf murinen T-Zellen, das die ADP-Ribosylierung verschiedener Zelloberflächenproteine katalysiert und eine wichtige Rolle in der T-Zell-Homöostase spielt (Koch-Nolte *et al*, 1996; Adriouch *et al*, 2007).

ADP-Ribosylierung ist eine posttranslationale Modifikation, in der eine ADP-Ribosegruppe von β -Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) auf ein Zielprotein übertragen wird. Für einen besseren Lesefluss wird die Schreibweise „NAD“ anstelle von „NAD⁺“ verwendet. Die 540 Da große und mehrfach negativ geladene ADP-Ribosegruppe verändert die lokalen sterischen und elektrostatischen Eigenschaften des Proteins und führt oft zu dessen Funktionsverlust (Laing *et al*, 2010) (**Abb.1.1**).

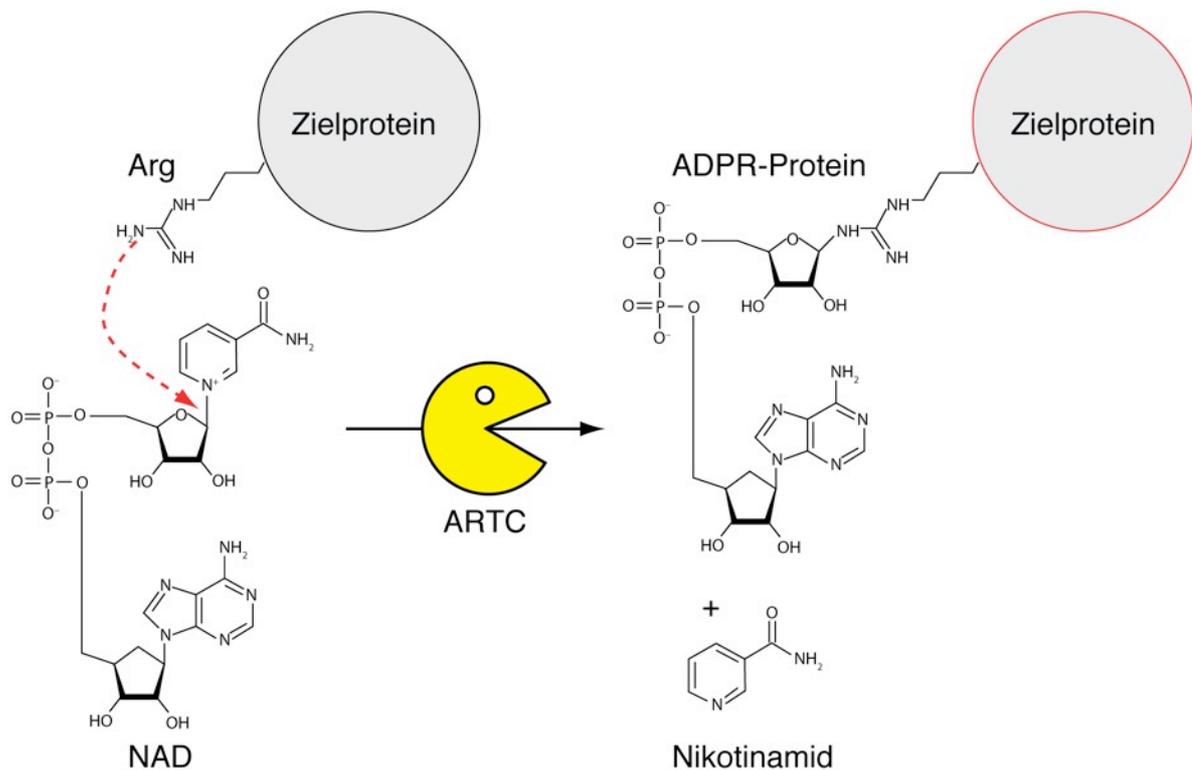


Abb. 1.1: Die ARTC-katalysierte ADP-Ribosylierungsreaktion.

Die Familie der ARTC-Ekto-Enzyme katalysiert die ADP-Ribosylierungsreaktion, bei der die ADP-Ribosegruppe von β -Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) auf ein Zielmolekül übertragen wird. Die energiereiche Bindung zwischen Nikotinamid und ADP-Ribose wird getrennt und die ADP-Ribose auf ein Stickstoffatom der Guanidino-Gruppe eines Arginins des Zielproteins übertragen. Als Reaktionsprodukte entstehen das ADP-ribosylierte Zielprotein, das häufig in seiner Funktion verändert ist (rot umrandet), und Nikotinamid.

ADP-Ribosylierung wurde zunächst als Pathomechanismus des Diphtherietoxins beschrieben, bei der das Toxin den Elongationsfaktor 2 an Diphthamid 715 ADP-ribosyliert und so die Proteinbiosynthese inhibiert (Collier & Cole, 1969). Es folgte die Entdeckung einer großen Anzahl weiterer bakterieller Toxine, die über diesen Mechanismus wirken (Holbourn *et al*, 2006). Das Cholera toxin und das Pertussistoxin ADP-ribosylieren Arginin 187 in der Alpha-Untereinheit von G-Proteinen (Gill & Meren, 1978; Sekura *et al*, 1983), das C2-Toxin aus *Clostridium botulinum* sowie SpvB aus *Salmonella enterica* Arginin 177 in Aktin (Aktories *et al*, 1986; Tezcan-Merdol *et al*, 2001; Menzel *et al*, 2013) (**Abb.1.2**). Jede dieser Reaktionen hat einen Funktionsverlust des Zielmoleküls zur Folge.

In Säugetieren sind zwei Familien ADP-ribosylierender Enzyme charakterisiert. Nach ihrer Struktur und ihrem katalytischen Zentrum werden ARTD- und ARTC-ADP-Ribosyltransferasen unterschieden (Hottiger *et al*, 2010). Die ARTD-ADP-Ribosyltransferasen besitzen ein für die enzymatische Aktivität verantwortliches Motiv aus den drei Aminosäuren H-Y-E (oder eine Variante hiervon). Das D in ARTD steht hierbei für die Ähnlichkeit zu dem Diphtherietoxin, das zuerst charakterisierte Enzym mit diesem Motiv. Diese Familie besteht aus 18 Mitgliedern, ARTD1-18 (Hottiger *et al*, 2010). Das bekannteste Mitglied dieser Familie ist die ARTD1 (früher Poly-ADP-Ribose-Polymerase, PARP1 genannt), die lange, verzweigte Ketten von poly-ADP-Ribose auf Histone und andere nukleäre Proteine überträgt und eine wichtige Funktion in der zellulären Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche besitzt (Pears *et al*, 2012). Die Familie der ARTDs ist in ihrer Funktionalität sehr heterogen; Einige Mitglieder katalysieren die poly-ADP-Ribosylierung, andere übertragen wenige (oligo-ADP-Ribosyltransferasen) oder nur eine ADP-Ribose-Gruppe (mono-ADP-Ribosyltransferasen) an ihr Zielmolekül, und einige sind möglicherweise enzymatisch inaktiv (Hassa & Hottiger, 2007; Hottiger *et al*, 2010).

Die Gruppe der ARTCs, benannt nach den strukturell verwandten C2- und C3-Toxinen verschiedener *Clostridien*-Stämme, ist durch das Motiv aus den drei Aminosäuren R-S-E definiert. ARTCs sind Ekto-Enzyme, die als GPI-verankerte Proteine auf der Zelloberfläche (ARTC1-4) oder als sekretiertes Protein (ARTC5) exprimiert werden (Koch-Nolte *et al*, 2008). Die ARTC Enzyme sind mono-ADP-Ribosyltransferasen und katalysieren die kovalente Verknüpfung einer ADP-Ribose-Gruppe auf ein Arginin des Zielproteins (Seman *et al*, 2004; Koch-Nolte *et al*, 2006; 2008; Laing *et al*, 2010). Im Menschen liegt die ARTC2 als Pseudogen vor (Haag *et al*, 1994), in der Maus in zwei funktionellen Varianten, die von benachbarten Genen

kodiert sind: ARTC2.1 und ARTC2.2 (Koch-Nolte *et al.*, 1996). Die ARTC-Proteine sind in ihrer dreidimensionalen Struktur eng verwandt mit einer Gruppe von Toxinen (u. a. SpvB aus *S. enterica* und C2 aus *C. botulinum*), die ebenfalls das R-S-E Motiv enthalten (Mueller-Dieckmann *et al.*, 2002; Vogelsgesang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 1995; Visschedyk *et al.*, 2010). In **Abb. 1.2** sind die ARTDs und ihr verwandtes Diphtherietoxin grün umrandet und die ARTCs und die R-S-E-Toxine schwarz umrandet dargestellt.

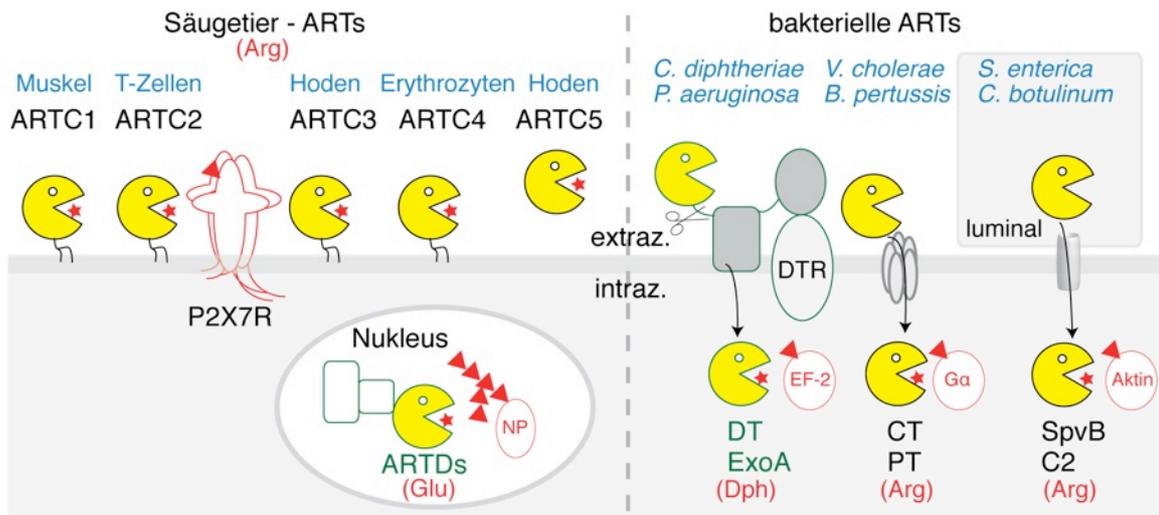


Abb. 1.2: ADP-Ribosyltransferasen aus Säugetieren und Bakterien.

In Säugetieren gibt es fünf Ekto-ADP-Ribosyltransferasen, die als GPI-verankerte Proteine auf der Zelloberfläche (ARTC1-4) oder als sekretorisches Protein (ARTC5) exprimiert werden. Sie sind strukturell eng verwandt mit einigen bakteriellen Toxinen. Im Zellkern von Säugetieren wird eine weitere Gruppe von ADP-Ribosyltransferasen exprimiert, die ARTDs, welche strukturell eng mit dem Diphtherietoxin verwandt sind. Die Zellen bzw. die Bakterien, in denen die ARTCs bzw. Toxine exprimiert werden sind blau dargestellt. Die Akzeptoraminosäuren sowie die Zielproteine der ARTs sind rot dargestellt. NP: nukleäre Proteine, EF-2: Elongationsfaktor 2. Die ARTDs und das verwandte Diphtherietoxin wurden in grüner Schrift und mit grüner Umrandung hervorgehoben. DT: Diphtherietoxin, DTR: Diphtherietoxin-Rezeptor, ExoA: Exotoxin A, CT: Cholera toxin, PT: Pertussis toxin, SpvB: *Salmonella enterica* Virulenzplasmid Faktor B, C2: *Clostridium* Toxin 2

Die ADP-Ribosylierung ist eine reversible Reaktion, die von ADP-Ribosyl-Hydrolasen (ARHs) rückgängig gemacht werden kann (Oka *et al.*, 2006; Koch-Nolte *et al.*, 2008). Es konnte z. B. in stickstofffixierenden Bakterien wie *Rhodospirillum rubrum* ein wichtiger Regulationskreislauf des Schlüsselenzyms der Stickstofffixierung Dinitrogenase-Reduktase gezeigt werden. ADP-Ribosylierung durch Dinitrogenase-Reduktase-ADP-Ribosyltransferase (DRAT) inaktiviert die Dinitrogenase-Reduktase und de-ADP-Ribosylierung durch Dinitrogenase-Reduktase aktivierende Glycohydrolase (DRAG) reaktiviert die Dinitrogenase-Reduktase (Pope *et al.*, 1986; Ludden, 1994; Berthold *et al.*, 2009). Im humanen Genom sind drei ARHs codiert (Koch-Nolte *et al.*, 2008). Die Sequenzen sowie die dreidimensionalen Strukturen der

ARHs 1 und 3 sind eng verwandt mit der Struktur der DRAG (Li *et al*, 2009; Mueller-Dieckmann *et al*, 2006; Kernstock *et al*, 2009; Berthold *et al*, 2009).

Die physiologische Bedeutung der mono-ADP-Ribosylierung in Säugetieren ist erst wenig erforscht. Beim Menschen wurde z. B. die ADP-Ribosylierung des Defensins HNP-1 durch humane ARTC1 in der Bronchoalveolarflüssigkeit von Rauchern beobachtet (Paone *et al*, 2002; 2006).

Die ARTC2 wurde ursprünglich als T-Zell-Differenzierungs-Antigen RT6 auf T-Zellen von Ratten und Mäusen entdeckt (Thiele *et al*, 1986) und erst später als ADP-Ribosyltransferase charakterisiert (Koch-Nolte *et al*, 1996). Die 3D-Struktur der ARTC2 der Ratte konnte in Kokristallisation mit dem Substrat NAD aufgeklärt werden und zeigt eine tiefe Bindungstasche, in der das typische R-S-E-Motiv lokalisiert ist (Mueller-Dieckmann *et al*, 2002). Die 3D-Struktur erinnert an „Pac-Man“ und wird daher in schematischen Abbildungen so dargestellt (**Abb. 1.3**).

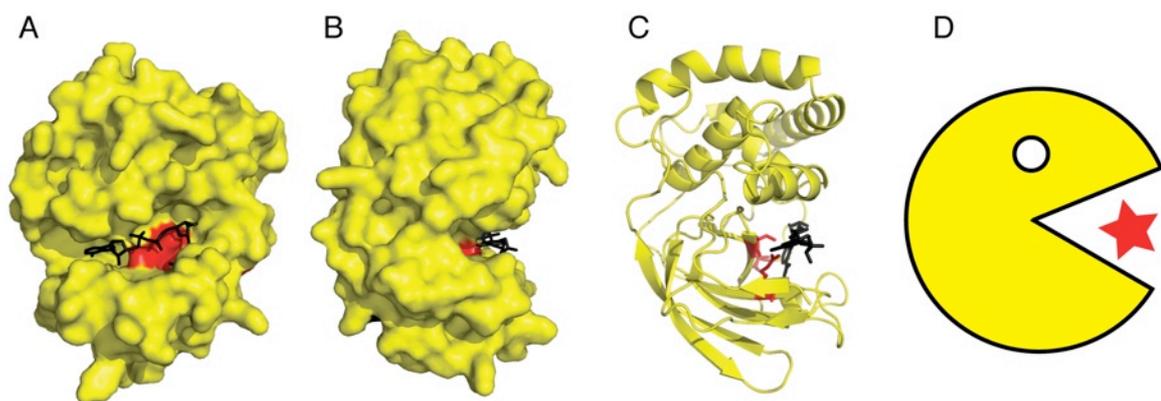


Abb. 1.3: Die Struktur der ADP-Ribosyltransferase ARTC2.2.

Die 3D-Struktur der ARTC2.2 aus der Ratte (PDB-id: 1og3) zeigt die Bindung des Substrates NAD in einer tiefen Bindungstasche (A-C). Die Aminosäuren des charakteristischen R-S-E Motivs sind rot hervorgehoben, NAD schwarz. **(A)** Die frontale Ansicht zeigt die Breite der katalytischen Tasche und die Lage des NAD. **(B)** Die Seitenansicht zeigt die Tiefe der Bindungstasche. **(C)** Die Darstellung als Cartoon zeigt den Aufbau der Sekundär- und Tertiärstruktur: der obere Teil besteht aus fünf α -Helices, während der untere Bereich von β -Faltblättern gebildet wird. **(D)** Als Vereinfachung der Darstellung dient das Symbol des Pacman, der die 3D-Struktur nachbildet.

Die ADP-Ribosyltransferase ARTC2 ist in der Maus in zwei allelen Varianten vorhanden; während ARTC2.1 nur unter reduzierenden Bedingungen aktiv ist (Hara *et al*, 1999) und u. a. auf Makrophagen exprimiert wird (Hong *et al*, 2007), ist die ARTC2.2 konstitutiv aktiv und wird primär auf T-Zellen exprimiert (Koch-Nolte *et al*, 1996; 1999; 2008). Beide werden als GPI-verankerte Membranproteine exprimiert und zeigen promiskuitive ADP-Ribosylierung von verschiedenen Membranproteinen (Bannas *et al*, 2005; Hong *et al*, 2007).

Es wurden verschiedene Membranproteine, wie LFA-1 (Nemoto *et al*, 1996b), CD8 β (Lischke *et al*, 2013), CD27, CD43, CD44 und CD45 (Okamoto *et al*, 1998) als Zielproteine für die ARTC2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung identifiziert. Hierbei wird die Funktion der Zielproteine häufig verändert (Laing *et al*, 2010). So inhibiert die ADP-Ribosylierung des Intergrin LFA-1 dessen homotypische Bindung in der Zelladhäsion (Krebs *et al*, 2003; Tominaga *et al*, 1993; Nemoto *et al*, 1996b), die ADP-Ribosylierung von CD8 β inhibiert die Ick-vermittelte Signaltransduktion (Lischke *et al*, 2013).

Ein weiteres Zielprotein der ARTC2.2 ist der ligandengesteuerte, nicht selektive Ionenkanal P2X7 (Seman *et al*, 2003; Adriouch *et al*, 2008; Schwarz *et al*, 2009) (**Abschnitt 1.2**). ADP-Ribosylierung von P2X7 an R125 führt nicht zu einer Inaktivierung, sondern zu einer Aktivierung von P2X7, bedingt durch die kovalente Verknüpfung der ADP-Ribose-Gruppe an eine Stelle des P2X7 nahe der Bindungsstelle seines Liganden Adenosintriphosphat (ATP) (Adriouch *et al*, 2008). Da sich ADP-Ribose und ATP strukturell ähneln, wird angenommen, dass die ADP-Ribose-Gruppe als kovalent verknüpfter Ligand dienen und so eine dauerhafte Öffnung des Ionenkanals bewirken kann (Adriouch *et al*, 2008; Schwarz *et al*, 2009). Die Öffnung des P2X7-Ionenkanals hat unter anderem die Aktivierung von ADAM-Proteasen zur Folge, die einige Zielproteine von der Zelloberfläche spalten (Gu *et al*, 1998). Eine dauerhafte Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ADP-Ribosylierung führt bei T-Zellen zum NAD-induzierten Zelltod, der vermutlich eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Entzündungsreaktionen spielt (Seman *et al*, 2003; Koch-Nolte *et al*, 2006).

Die Regulation der ARTC2.2 kann über unterschiedliche Wege erfolgen. Es wurde gezeigt, dass die ARTC2.2 mit cholesterinreichen Bereichen der Zellmembran, sogenannten *lipid rafts*, assoziiert ist und dadurch auf andere *raft*-assoziierte Proteine fokussiert wird (Bannas *et al*, 2005). Eine weitere Regulationsmöglichkeit ist die proteolytische Freisetzung von der Zelloberfläche. So wurde von unserer Gruppe gezeigt, dass ARTC2.2 nach Stimulation von T-Zellen mit dem Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder einem T-Zell-Rezeptor kreuzvernetzenden Antikörper von der Zelloberfläche gespalten wird (Kahl *et al*, 2000). Bisher ist jedoch unklar, ob auch die Aktivierung von P2X7 durch ARTC2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung die membrannahere Proteolyse der ARTC2.2 auslösen kann, und welche funktionellen Konsequenzen dies auf die Zielspezifität der ARTC2.2 hat. Diese Fragestellungen sollen in dieser Arbeit untersucht werden.

1.2 P2X7: ein Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal

Der P2X7-Rezeptor ist ein nicht selektiver, homotrimerer Ionenkanal, der eine wichtige Rolle bei der Aktivierung membrannaher Proteolyse (*Shedding*) spielt. Die Aktivierung von P2X7 erfolgt durch extrazelluläre Nukleotide und resultiert in dem Einstrom von Ca^{2+} , dem Ausstrom von K^{+} , der Externalisierung von Phosphatidylserin und einer Aktivierung von ADAM-Proteasen (Seman *et al*, 2003; Pupovac *et al*, 2013; Gu *et al*, 1998; Suzuki *et al*, 2004). In **Abb. 1.4** ist die Struktur des P2X7 dargestellt - modelliert auf die 3D-Struktur des nächsten Verwandten, P2X4 (Hattori & Gouaux, 2012). P2X7 kann entweder durch seinen löslichen Liganden ATP oder durch ADP-Ribosylierung an R125 aktiviert werden (Adriouch *et al*, 2008).

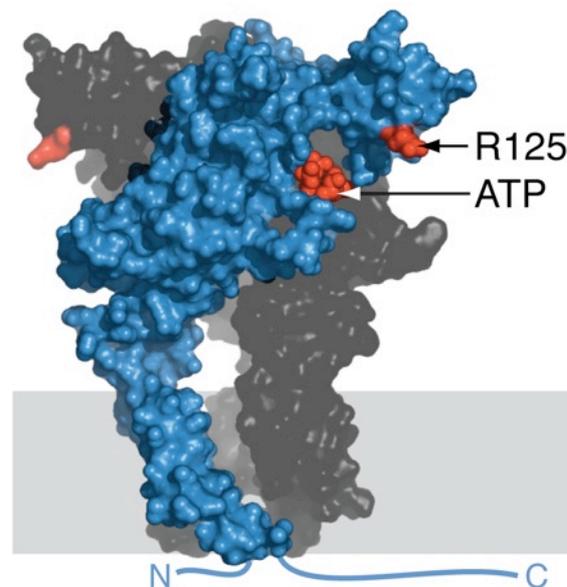


Abb. 1.4: Die Struktur des Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals P2X7.

Die 3D-Struktur des P2X7 zeigt eine homotrimeren Struktur des Ionenkanals. Eine Untereinheit wurde blau hervorgehoben. P2X7 kann entweder durch die Bindung des löslichen Liganden ATP (rot in einer der drei, aus benachbarten Untereinheiten gebildeten, Ligandenbindungstaschen dargestellt) oder durch ADP-Ribosylierung an Arginin 125 (rot, in zwei Untereinheiten sichtbar) aktiviert werden. P2X7 besitzt einen langen C-terminalen zytosolischen Bereich, der nicht in der Kristallstruktur aufgelöst wurde. Die Sequenz von P2X7 wurde auf die publizierte Struktur des eng verwandten Ionenkanals P2X4 in seiner offenen, ATP-gebundenen Konformation modelliert (PDB-id: 4dw1). Der graue Balken symbolisiert die Plasmamembran.

NAD und ATP sind ubiquitäre Metabolite des Energie-Zellstoffwechsels und liegen intrazellulär in hohen Konzentrationen von 0,3-3 mM (NAD) und 1-10 mM (ATP) vor (Koch-Nolte *et al*, 2011). Sie können in verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen von Zellen freigesetzt werden und dienen als

Alarmsignale (Haag *et al*, 2007; Adriouch *et al*, 2012; 2007; Hubert *et al*, 2010; Scheuplein *et al*, 2009; la Sala *et al*, 2003; Zolkiewska, 2005; Junger, 2011). Drei Mechanismen der Nukleotid-Freisetzung werden postuliert: Freisetzung durch die lytische Zellmembran sterbender Zellen (Scheuplein *et al*, 2009), Exozytose von Nukleotid-haltigen Granula (Schwiebert & Zsembery, 2003) und Diffusion durch Membrankanäle (Schenk *et al*, 2008; Bruzzone *et al*, 2001) (Haag *et al*, 2007; Adriouch *et al*, 2012).

NAD und ATP werden im Extrazellularraum von verschiedenen Enzymen und Rezeptoren abgebaut bzw. gebunden. NAD kann von den NAD-Glykohydrolasen CD38 und CD157 sowie von Phosphodiesterasen abgebaut werden, die sowohl auf der Zellmembran als auch in biologischen Flüssigkeiten zu finden sind (Haag *et al*, 2007) (Cockayne *et al*, 1998). ATP wird über Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen wie CD39 und Ekto-5'-Nukleotidasen wie CD73 sukzessive zu Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP) und Adenosin abgebaut. Die Abbauprodukte von NAD und ATP wirken ihrerseits als Signalmoleküle auf unterschiedliche Rezeptoren (Haag *et al*, 2007; Guse, 2000; Burnstock, 2007).

Extrazelluläres NAD dient ferner als Substrat für die Familie der Ekto-ADP-Ribosyltransferasen (Koch-Nolte *et al*, 2008; 2001; Laing *et al*, 2010) (**Abschnitt 1.1**).

ATP kann von Nukleotidrezeptoren gebunden werden (Burnstock & Verkhratsky, 2009). Diese Purinrezeptoren werden nach ihrer Struktur und Funktion in P2X- und P2Y-Rezeptoren aufgeteilt: P2Y-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte, sieben Transmembrandomänen umfassende Rezeptoren; P2X-Rezeptoren sind homo- oder heterotrimere Ionenkanäle (Burnstock, 2007).

P2X7 unterscheidet sich von den anderen Mitgliedern der P2X-Familie (P2X1-P2X6) durch eine vergleichsweise geringe Aminosäuresequenzhomologie (North, 2002) und durch einen langen C-terminalen intrazellulären Bereich, der für die Signaltransduktion und Porenbildung wichtig ist (Adriouch *et al*, 2002). Des Weiteren benötigt P2X7 10- bis 100-fach höhere Konzentrationen ATP zur Aktivierung (North, 2002; Adriouch *et al*, 2012). P2X7 wird hauptsächlich in Makrophagen und T-Zellen exprimiert (North, 2002; Yip *et al*, 2009). Die Aktivierung von T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor resultiert in einem Ausstrom von ATP über Pannexin-Poren und andere Kanäle (Yip *et al*, 2009; Schenk *et al*, 2008; Junger, 2011). Dieses ATP kann den P2X7-Rezeptor autokrin aktivieren und so zu dem für die T-Zell-Reifung wichtigen Einstrom von Kalziumionen führen (Junger, 2011). Die P2X7-Aktivierung induziert ihrerseits die Bildung von Pannexin-Poren und so einen weiteren Ausstrom von ATP,

das ebenfalls autokrin oder parakrin wirken kann (Corriden & Insel, 2010; Junger, 2011). Eine anhaltend starke Aktivierung von P2X7 führt zur Exposition von Phosphatidylserin und zum Zelltod (Surprenant *et al*, 1996; Seman *et al*, 2003; Haag *et al*, 2007).

In Mäusen wurde gezeigt, dass P2X7 außer über die nicht-kovalente Bindung seines Liganden ATP auch durch kovalente ADP-Ribosylierung an R125 durch die Ekto-ADP-Ribosyltransferase ARTC2.2 aktiviert werden kann (Seman *et al*, 2003; Adriouch *et al*, 2008; Schwarz *et al*, 2009). Wie bereits in **Abschnitt 1.1** erläutert, wird angenommen, dass aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von ADP-Ribose und ATP sowie der Nähe der ADP-Ribosylierungsstelle zur Ligandenbindungstasche die ADP-Ribose-Gruppe als kovalent verknüpfter Ligand dienen und so eine dauerhafte Öffnung des Ionenkanals bewirken kann (Adriouch *et al*, 2008; Schwarz *et al*, 2009). Für die Aktivierung durch ADP-Ribosylierung werden für NAD mit 1-10 μM deutlich geringere Konzentrationen benötigt als für ATP (Seman *et al*, 2003). Im Serum liegt NAD zwar mit 0,1-0,5 μM (Haag *et al*, 2007) in Konzentrationen vor, die nicht ausreichen, um P2X7 zu aktivieren, in Zelllysaten ist jedoch genug NAD vorhanden, um über ARTC2.2 und P2X7 den NAD-vermittelten Zelltod (*NAD induced cell death*, NICD) von T-Zellen zu induzieren (Seman *et al*, 2003). Besonders anfällig für NICD sind regulatorische T-Zellen. Durch Injektion von NAD in Mäuse und daraus resultierender Depletion regulatorischer T-Zellen konnte das Tumorstadium *in vivo* reduziert werden (Hubert *et al*, 2010). Schon bei der Präparation primärer T-Zellen aus der Maus wird genug NAD freigesetzt, um NICD auszulösen (Rissiek *et al*, 2014). Eine weitere Konsequenz der Aktivierung von P2X7 ist die membrannahe Proteolyse (*Shedding*) von immunologisch wichtigen Zelloberflächenproteinen, wie z. B. TNF α , CD62L und CD27, durch ADAM-Proteasen (Gu *et al*, 1998; Moon *et al*, 2006; Suzuki *et al*, 2004). ADAM10 und ADAM17 sind für einen Großteil des *Sheddings* verantwortlich (Murphy, 2008) (**Abb. 1.5**). Die Substratspezifitäten von ADAM10 und ADAM17 können sich teilweise überlappen oder ergänzen (Murphy, 2008; Scheller *et al*, 2011; Le Gall *et al*, 2009). Auf T-Zellen ist sowohl die Aktivität von ADAM10 als auch von ADAM17 induzierbar (Ebsen *et al*, 2013), sodass hier beide Proteasen für das P2X7-vermittelte *Shedding* in Frage kommen (Gu *et al*, 1998) (Suzuki *et al*, 2004; Seman *et al*, 2003; Le Gall *et al*, 2010; Pupovac *et al*, 2013) (**Abschnitt 1.4**).

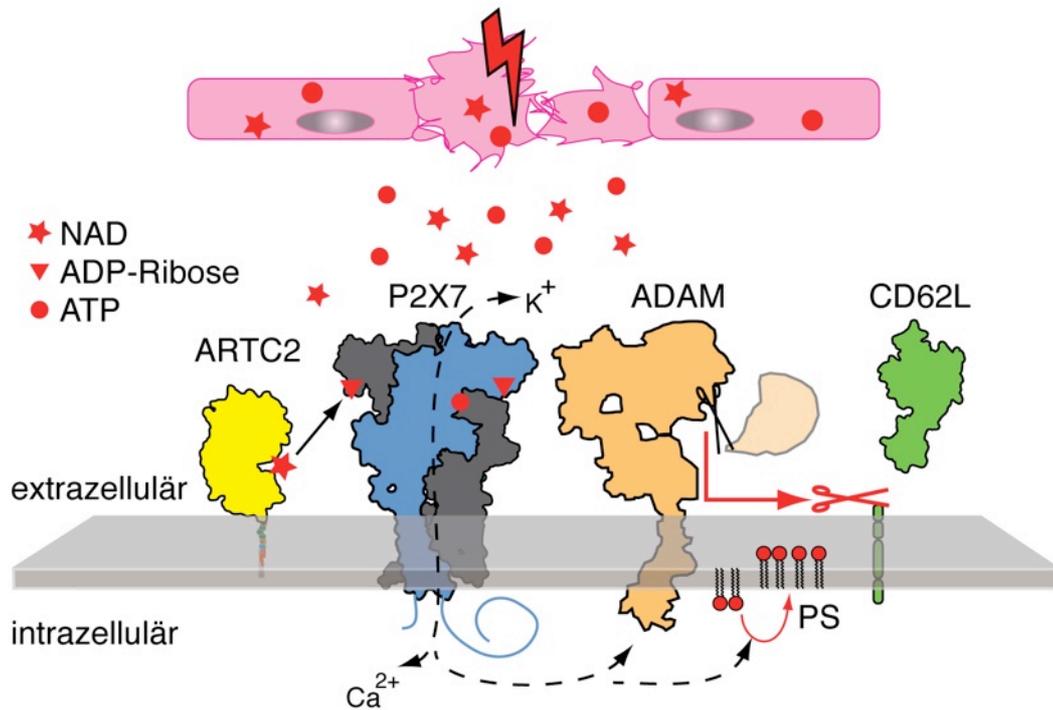


Abb. 1.5: Der ARTC2.2-P2X7-ADAM-Signalweg.

Schematische Darstellung des Signalweges der Nukleotid-induzierten membrannahen Proteolyse. In inflammatorischen Prozessen werden Nukleotide wie NAD (roter Stern) und ATP (roter Kreis) freigesetzt und können den Purinrezeptor P2X7 aktivieren. Diese Aktivierung kann entweder durch Bindung des Liganden ATP oder durch ARTC2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung induziert werden. Eine Öffnung des P2X7-Ionenkanals bewirkt einen Einstrom von Kalziumionen, die Exposition von Phosphatidylserin und aktiviert die Oberflächenproteasen ADAM10 und ADAM17. Diese setzen CD62L und andere Membranproteine proteolytisch von der Zelloberfläche frei. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass auch ARTC2.2 selbst über diesen Signalweg von der Zelloberfläche freigesetzt wird.

In dieser Arbeit werden die über ARTC2.2, P2X7 und ADAM-Aktivierung induzierte membrannahen Proteolyse von ARTC2.2 und die daraus resultierenden Folgen für die ARTC2.2-Aktivität, ihre Substratspezifität und die Aktivität ihrer Zielproteine behandelt.

1.3 Interferon- γ : ein Leit-Zytokin der T-Zell-Polarisierung

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass Interferon- γ (IFN- γ) ein Ziel für die ARTC2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung ist und dass diese ADP-Ribosylierung die Signalfunktion von IFN- γ inhibiert.

Interferone sind Zytokine, die nach ihrer Fähigkeit, mit der Replikation von Viren zu interferieren, benannt wurden (Isaacs & Lindenmann, 1957). Interferone werden nach ihrer Rezeptorspezifität und Sequenzhomologie in zwei Gruppen aufgeteilt. Typ-1-Interferone wie Interferon- α und Interferon- β werden durch virale Infektionen induziert (Schroder *et al*, 2004).

Interferon- γ , ein Typ-2-Interferon, wird als dimeres Glykoprotein von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen produziert (Darnell *et al*, 1994). IFN- γ wirkt über die Bindung an den IFN- γ -Rezeptor (IFNGR), der sich aus je zwei Molekülen IFNGR1 und IFNGR2 zusammensetzt (Schroder *et al*, 2004; Walter *et al*, 1995; Thiel *et al*, 2000; Randal & Kossiakoff, 2001). Die Bindung von IFN- γ an den Rezeptor bewirkt eine intrazelluläre Signaltransduktion über die Januskinasen JAK1 und JAK2, die die Phosphorylierung von STAT1 katalysieren (Darnell *et al*, 1994; Darnell, 1997). Phosphoryliertes STAT1 wandert über Importin $\alpha 5$ in den Nukleus ein und induziert über die Bindung an die IFN- γ -Aktivierungsstelle (*IFN- γ activation site*, GAS) die Transkription der Zielgene (Darnell *et al*, 1994; Nardozzi *et al*, 2010) (**Abb. 1.6 A**). IFN- γ wurde wegen seiner stimulierenden Wirkung auf Makrophagen ursprünglich auch *macrophage-activating factor* genannt (Gray & Goeddel, 1982; Roberts & Vasil, 1982). IFN- γ induziert in Makrophagen antimikrobielle und anti-Tumor-Mechanismen sowie die verstärkte Expression der Antigen-präsentierenden MHC-Moleküle (Rauch *et al*, 2013; Abbas *et al*, 1996; Schroder *et al*, 2004). IFN- γ wirkt jedoch auch auf andere Zellen des Immunsystems und auf Gewebezellen wie Podozyten (**Abb. 1.6 B**).

Bei B-Zellen bewirkt IFN- γ einen Antikörper-Klassenwechsel zu IgG2a, sodass gesteigerte, antikörpervermittelte Komplement-Aktivierung und Phagozytose erfolgen können (Abbas *et al*, 1996; Schroder *et al*, 2004). IFN- γ bewirkt bei anderen Zellen, z. B. in Makrophagen und Podozyten, die Induktion des Immunoproteasoms, sodass vermehrt Peptide erzeugt und über MHC präsentiert werden (Mosmann & Coffman, 1989; Szabo *et al*, 2003; Schroder *et al*, 2004; Seifert *et al*, 2010). Auf Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) sowie T-Zellen induziert IFN- γ autokrin eine verstärkte Produktion und Sekretion von IFN- γ und eine Suppression von IL-4 (Frasca *et al*,

1985; Abbas *et al*, 1996). Dies führt zur Polarisierung von T-Zellen hin zu Typ1-T-Helferzellen (Th1) und weg von Typ2-T-Helferzellen (Th2), (Mosmann & Coffman, 1989; Abbas *et al*, 1996; Bradley *et al*, 1996) (**Abb. 1.6 B**). Das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Immunantworten ist entscheidend für die Kontrolle von Pathogenen, Tumorzellen, inflammatorischen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen (Abbas *et al*, 1996; Bradley *et al*, 1996; Rauch *et al*, 2013).

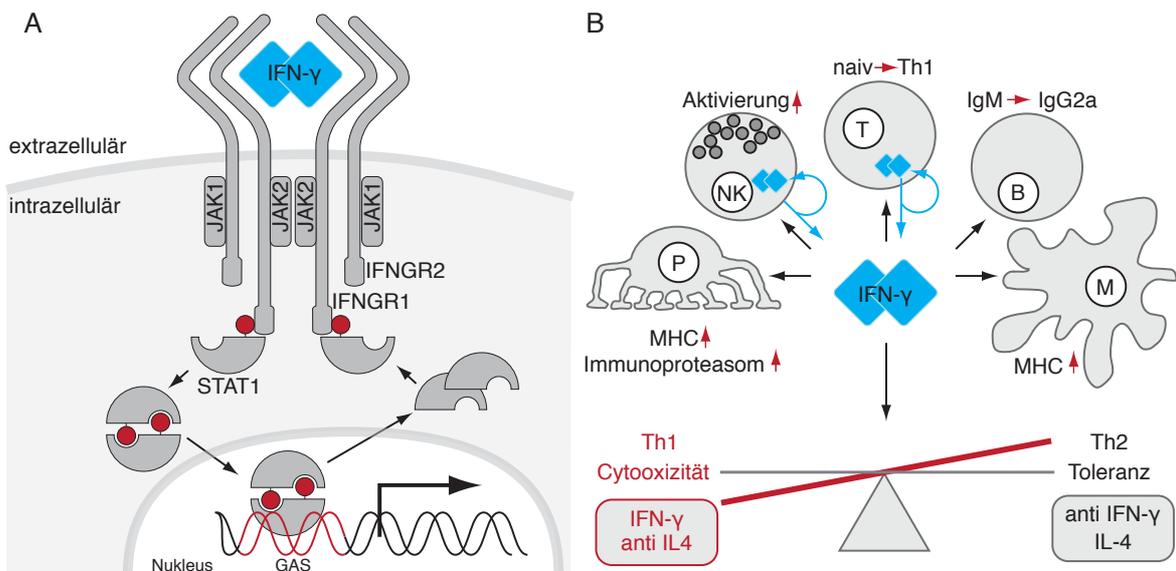


Abb. 1.6: Wirkung von Interferon- γ .

(A) IFN- γ ist ein Homodimer, dass von je zwei Molekülen seiner Rezeptoren IFNGR1 und IFNGR2 gebunden wird. Die direkte Bindung erfolgt über den IFNGR1; die Funktion des IFNGR2 liegt in der Signaltransduktion. Die Bindung von IFN- γ induziert über JAK1 und JAK2 die Phosphorylierung (rot ausgefüllte Kreise) von STAT1. Dies führt zur Dimerisierung von STAT1 und Translokation in den Zellkern, wo der STAT1-Dimer an die IFN- γ -Aktivierungsstelle (GAS) bindet und die Transkription von Zielgenen reguliert. (B) IFN- γ wird von NK-Zellen und T-Zellen produziert (blaue Pfeile) und wirkt auf verschiedene Zellen. Bei NK-Zellen und T-Zellen induziert es autokrin die weitere Produktion von IFN- γ . T-Zellen werden zu Th1-Zellen polarisiert. In B-Zellen induziert IFN- γ einen Klassenwechsel zu IgG2a. Makrophagen werden aktiviert und exprimieren vermehrt MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche. In vielen anderen Zellen, z. B. Podozyten, wird neben der verstärkten Expression von MHC-Molekülen das Immunoproteasom induziert, das Peptide generiert, die über MHC präsentiert werden können.

Eine Th1-Polarisierung wird induziert von IL-12 und IFN- γ und resultiert in der Produktion von IFN- γ , IL-2 und TNF α . Die Th1-Immunantwort ist proinflammatorisch und durch hohe zytotoxische Aktivitäten und zellvermittelte Immunität über Makrophagen, zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen charakterisiert. Die Th1-Immunantwort richtet sich insbesondere gegen intrazelluläre Pathogene, aber auch gegen Tumore (Mosmann & Coffman, 1989; Abbas *et al*, 1996). Eine starke Aktivierung der Th1-Achse ist mit Überempfindlichkeitsreaktionen des Typs IV wie Kontaktdermatitis, Morbus Crohn oder Diabetes mellitus Typ1 assoziiert (Abbas *et al*, 1996; Schroder *et al*, 2004; Rauch *et al*, 2013; Blom & Poulsen, 2013). Eine Th2-

Polarisierung wird durch IL-4 induziert und resultiert in der Produktion von IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Die Th2-Immunreaktion ist antiinflammatorisch und durch eine humorale Immunantwort charakterisiert, die über IgE-Antikörper und Mastzellaktivierung gegen extrazelluläre Pathogene wirkt. Th2-Zellen spielen u. a. eine wichtige Rolle bei Allergien (Mosmann & Coffman, 1989; Abbas *et al*, 1996; Rauch *et al*, 2013; Blom & Poulsen, 2013). Zur *in-vitro*-Polarisierung von Th1- und Th2-Zellen wird eine Kombination aus Zytokinen und gegensätzlich wirkenden Inhibitoren eingesetzt. So werden für eine Th1-Polarisierung IFN- γ und ein IL-4-neutralisierender Antikörper, für eine Th2-Polarisierung IL-4 und ein IFN- γ -neutralisierender Antikörper eingesetzt (Blom & Poulsen, 2013).

Die Inhibition von IFN- γ verschiebt das immunologische Gleichgewicht zugunsten von Th2 und wirkt somit antiinflammatorisch (Schroder *et al*, 2004; Rauch *et al*, 2013). So vermindert die Antikörper-basierte Inhibition von IFN- γ die Fähigkeiten des Immunsystems intrazelluläre Pathogene abzuwehren (Belosevic *et al*, 1989). Auf der anderen Seite wird die antiinflammatorische Wirkung der IFN- γ -inhibierenden Antikörper auch in klinischen Studien getestet um die autoimmunologisch bedingte chronisch-entzündliche Darmerkrankung Morbus Crohn zu behandeln (Hommes *et al*, 2006). In verschiedenen Mausmodellen zur Kolitis wurden positive Effekte von IFN- γ -inhibierenden Antikörpern nachgewiesen (Obermeier *et al*, 1999; Hans *et al*, 2000; Powrie *et al*, 1994).

1.4 ADAM17: eine membranständige Metalloprotease

ADAM17 ist eines der Schlüsselenzyme der induzierten membranannalen Proteolyse (*Shedding*). Die Aktivität von ADAM17 kann durch verschiedene Signale, wie z. B. T-Zell-Rezeptor-Stimulierung, der Behandlung von Zellen mit Phorbolestern wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder extrazelluläre Nukleotide induziert werden (Gu *et al*, 1998; Suzuki *et al*, 2004; Seman *et al*, 2003; Le Gall *et al*, 2010) und führt zur Spaltung einiger immunologischer Schlüsselproteine von der Zellmembran (Scheller *et al*, 2011; Bahia & Silakari, 2010; Murphy, 2008).

Die Familie der *a disintegrin and metalloproteases* (ADAMs) besteht im Menschen aus 21 und in der Maus aus 24 Mitgliedern. Hiervon wurde für 13 Mitglieder eine katalytische Aktivität nachgewiesen, die die Konsensussequenz HExGHxxGxxHD in der katalytischen Domäne aufweisen (Brocker *et al*, 2009). Es wurde gezeigt, dass ADAM-Proteasen in Fertilisation und Entwicklung (Peschon *et al*, 1998; Blobel, 2005; Gelling *et al*, 2008) sowie in neoplastischen (Murphy, 2008), inflammatorischen (Scheller *et al*, 2011) und neurodegenerativen (Lichtenthaler, 2011) Erkrankungen von besonderer Bedeutung sind. ADAM-Proteasen sind auf der Zelloberfläche für das *Shedding* der Ekto-Domänen ihrer Zielproteine verantwortlich. Es wird geschätzt, dass bis zu 10 % der Oberflächenproteine durch *Shedding* abgespalten werden können (Fong *et al*, 2011; Scheller *et al*, 2011). Diese Art der Proteolyse kann Zytokine und Zytokin-Rezeptoren freisetzen, die als lösliche Proteine wichtige regulatorische Aufgaben erfüllen (Murphy, 2008; Scheller *et al*, 2011). Es wurde ebenfalls das *Shedding* von Enzymen und eine daraus resultierende Änderung der enzymatischen Aktivität beschrieben (English *et al*, 2012).

Unter den ADAM-Proteasen sind ADAM10 und ADAM17 jene mit der größten Vielfalt an Substraten (Scheller *et al*, 2011). Für CD62L, TNF α und andere Substrate konnte gezeigt werden, dass ADAM10 teilweise den Funktionsverlust von ADAM17 kompensieren kann (Le Gall *et al*, 2009; Garbers *et al*, 2011; Peschon *et al*, 1998).

ADAM17 ist aus mehreren Domänen aufgebaut: die Prodomäne (Pro) wirkt inhibitorisch und wird bei der Reifung zur murenen Form durch eine Furin-Protease abgespalten; die katalytische Domäne (Kat) vermittelt die proteolytische Aktivität, die Disintergrindomäne (Dis) und Membran-Proximale-Domäne (MPD) sind wichtig für die Substratspezifität und Regulation, die Transmembrandomäne (TM) sorgt für die Membranverankerung und die zytosolische Domäne (Zyt) erfüllt regulatorische Funktionen (Reddy *et al*, 2000) (**Abb. 1.7 A**). Ursprünglich wurde ADAM17 als TNF α -

Konvertase (*TNF α converting enzyme*, TACE) identifiziert (Peschon *et al*, 1998). TNF α wird als membranständiger Präkursor exprimiert und stellt nach *Shedding* eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine dar (Moss *et al*, 1997; Black *et al*, 1997). ADAM17 ist nicht nur für die Freisetzung von TNF α verantwortlich, sondern spaltet auch die TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 und eine Reihe weiterer Liganden und Rezeptoren dieser Familie (ERBB4, CD40 und TRAIL) und ist somit ein wichtiger Regulator in inflammatorischen Reaktionen (Canault *et al*, 2006; Murphy, 2008; Scheller *et al*, 2011). Weitere Membranproteine, die von ADAM17 gespalten werden (Murphy, 2008; Scheller *et al*, 2011; Horiuchi, 2013), sind Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren wie HBEGF, TGF α und ERBB4 (Zhou *et al*, 2005; Murphy, 2008) sowie CD62L (L-Selektin) (Smalley & Ley, 2005; Peschon *et al*, 1998). CD62L-*Shedding* vermindert die Einwanderung von T-Zellen in die Lymphknoten und fördert die transendotheliale Migration neutrophiler Granulozyten (Smalley & Ley, 2005). Die Vielfalt an potentiellen ADAM17-Substraten spiegelt sich in einer vergleichsweise geringen Spezifität der Spaltstellen in den Zielproteinen wider (Tucher *et al*, 2014) (**Abb 1.7 C**).

ADAM17 ist in ruhenden Zellen kaum auf der Zellmembran, sondern primär im Golgi-Apparat und in perinukleären Vesikeln lokalisiert, und zeigt eine geringe basale Aktivität (Murphy, 2008; Gooz *et al*, 2012). Die Aktivierung von ADAM17 kann auf unterschiedliche Weise erfolgen (**Abb 1.7 B**). Exogene Stimuli sind z. B. der Phorbol-ester PMA (Blobel, 2005; Murphy, 2008), bakterielle, porenformende Toxine wie das Hemolysin aus *E. coli* (Walev *et al*, 1996), oder die Quervernetzung des T-Zell-Rezeptors mit einem Antikörper (Li *et al*, 2007; Briso *et al*, 2008). Endogene Stimuli für die Aktivierung von ADAM17 beinhalten die Aktivierung von P2X7 (Le Gall *et al*, 2009), die Bindung von Liganden an Rezeptoren der EGFR-Familie oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Murphy, 2008), Aktivierung von MAP-Kinasen und der Proteinkinase C (PKC) (Yamashita *et al*, 2014) sowie Apoptose (Chalaris *et al*, 2007). Ebenso komplex wie die Zielprotein-Spezifität und die Aktivierungsmöglichkeiten ist die Regulation der ADAM17 (**Abb 1.7 B**). Für den Transport vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) in den Golgi-Apparat wird iRhom2, ein nicht aktives Mitglied der Rhomboid-Proteasen, benötigt (Adrain *et al*, 2012; McIlwain *et al*, 2012; Maretzky *et al*, 2013). Im Golgi-Apparat wird die inhibitorische Prodomäne durch eine Furin-Protease abgespalten (Srour *et al*, 2003) und die Bindung zu iRhom2 aufgegeben (Adrain *et al*, 2012). Nach Aktivierung gelangt ADAM17 über bisher noch nicht genau charakterisierte Mechanismen an die Zelloberfläche und reichert sich dort in

cholesterinreichen Bereichen, sog. *lipid rafts* an, sodass eine räumliche Regulation der Zielproteine gewährleistet wird (Tellier *et al*, 2006). Die Regulation der ADAM17 auf der Zelloberfläche kann über posttranslationale Modifikation oder Bindung von Inhibitoren bzw. Regulatoren erfolgen. So kann eine Proteindisulfidisomerase (PDI) eine Umstellung der Disulfidbrücken induzieren und ADAM17 somit inaktivieren (Bass & Edwards, 2010; Willems *et al*, 2010; Düsterhöft *et al*, 2013). TIMP-3 kann als löslicher endogener Inhibitor an die katalytische Domäne von ADAM17 binden (Amour *et al*, 1998).

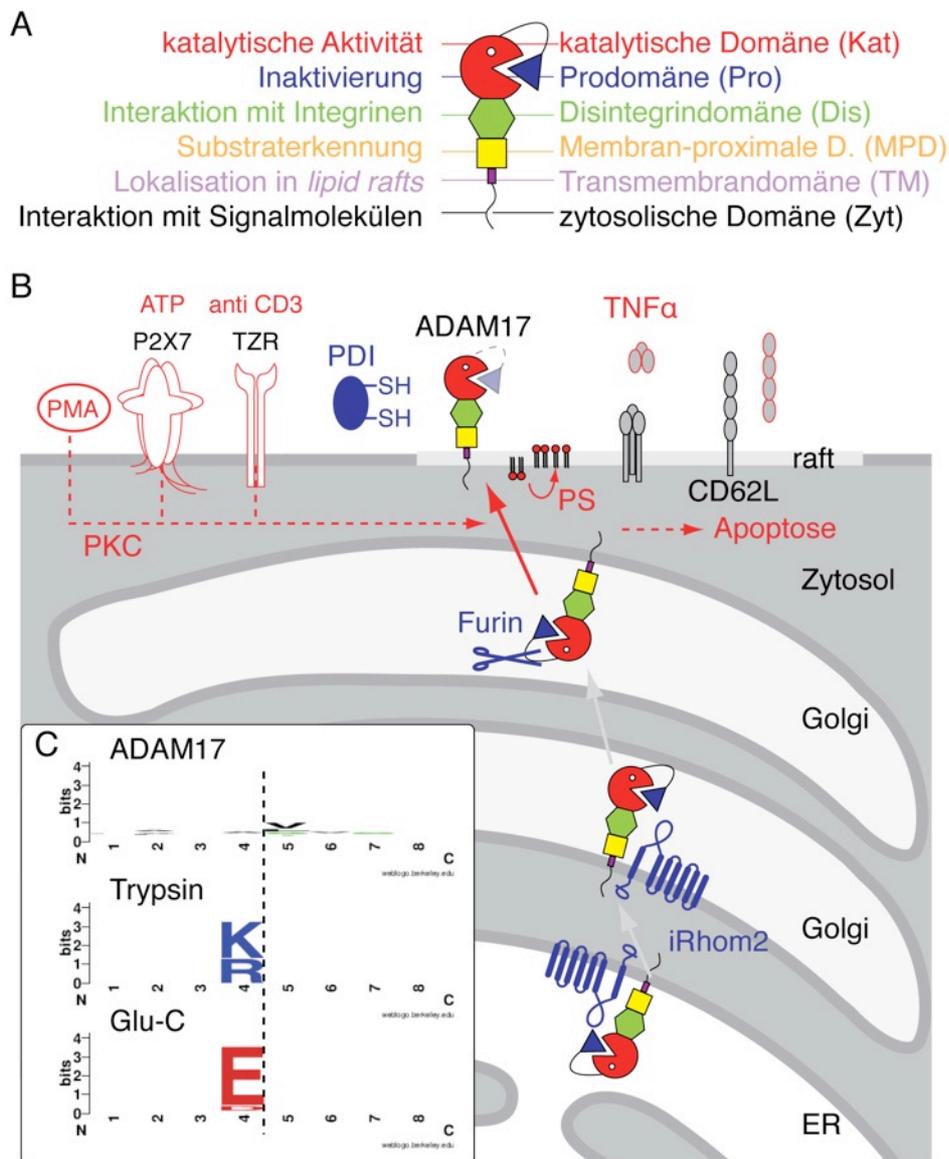


Abb. 1.7: Domänenstruktur, Regulationsmechanismen und Substratspezifität von ADAM17.

(A) ADAM17 ist ein Multidomänenprotein mit einer inhibitorischen Prodomäne (blau), der katalytischen Domäne (rot), den regulatorischen Domänen Disintegrindomäne (grün) und membran-proximale Domäne (gelb), der Transmembrandomäne (violett) und der zytosolischen Domäne (schwarz). **(B)** ADAM17 wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Für den Export vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) in den Golgi-Apparat benötigt ADAM17 die Bindung von iRhom2. Im ER wird die inhibitorische Prodomäne von einer Furin-Protease geschnitten. Nach Aktivierung durch z. B. extrazelluläre Nukleotide über P2X7 oder den Phorbol ester PMA, transloziert ADAM17 auf die Zelloberfläche. ADAM17 assoziiert mit cholesterinreichen Bereichen der Zellmembran (*lipid rafts*) und kann über eine Proteindisulfid isomerase (PDI) inaktiviert werden. Die Aktivierung von ADAM17 kann über unterschiedliche Stimuli erfolgen: über Phorbol ester (PMA), den P2X7-Ionenkanal oder den T-Zell-Rezeptor (TCR). ADAM17 spaltet nach Aktivierung Zielproteine wie TNF α und CD62L von der Zelloberfläche. **(C)** Im Vergleich zu den Proteasen Trypsin und Glu-C, die klar definierte Spaltmotive erkennen, kann ADAM17 unterschiedliche Sequenzen spalten. ADAM17 zeigt dabei eine geringe Präferenz für die Aminosäuren Valin, Leucin und Serin in der Position 5, der ersten N-terminalen Position nach der Spaltstelle. Informationen zu den Spaltstellen wurden der MEROPS-Datenbank entnommen.

ADAM17 wird mit inflammatorischen Krankheiten wie dem TNF α -induzierten septischen Schock, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Psoriasis und Lungenentzündung (Horiuchi *et al*, 2007; Cesaro *et al*, 2009; Moriyama *et al*, 2004; Trifilieff *et al*, 2002), aber auch mit neoplastischen Erkrankungen wie Brust-, Eierstock- und Darmkrebs assoziiert (Lendeckel *et al*, 2005; Zhou *et al*, 2005; Tanaka *et al*, 2005) (Blanchot-Jossic *et al*, 2005; Gooz, 2010; Murphy, 2008).

Für die Inhibition von ADAM17 wurden verschiedene Substanzen entwickelt: niedermolekulare Inhibitoren wie GW280264X (Hundhausen *et al*, 2003), TAPI (Mohler *et al*, 1994) und GI254023X (Hundhausen *et al*, 2003), zeigen unterschiedliche Spezifitäten. GW280264X blockiert sowohl ADAM17 als auch ADAM10, TAPI inhibiert diverse Metalloproteasen und GI254023X ist ca. 100-fach wirksamer gegenüber ADAM10 als gegen ADAM17 (Hundhausen *et al*, 2003). Ein inhibitorischer Antikörper, D1A12, wurde als scFv aus einer humanen naiven Phagen-Display-Bibliothek an ADAM17 selektioniert, und zeigt *in vitro* eine spezifische Inhibition von humanem ADAM17 (Tape *et al*, 2011). Ob die Inhibition von ADAM17 für therapeutische Anwendungen sinnvoll ist, wird aufgrund der essentiellen Funktionen von ADAM17 und der möglichen kompensatorischen Effekte durch andere Metalloproteasen kritisch betrachtet (Rose-John, 2013; Horiuchi, 2013).

Für die weitere Charakterisierung der Aktivierung, Regulation, Substratspezifität und Lokalisierung von ADAM17 sind spezifische Antikörper wichtige Werkzeuge, die vor allem gegen murine ADAM17 bisher nicht ausreichend vorhanden sind. In dieser Arbeit wurden daher neue ADAM17-spezifische Antikörper generiert und charakterisiert. Dafür wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt: zum einen wurde ein Kaninchen immunisiert um einen polyspezifischen polyklonalen Antikörper zu erhalten, zum anderen wurden zwei Lamas immunisiert, um rekombinant produzierbare monoklonale Antikörper (**Abschnitt 1.5**) zu erhalten.

1.5 Nanobodies: einzigartige Einzel-Domänen-Antikörper aus Lamas

Antikörper sind wichtige Werkzeuge, sowohl in der Forschung als auch für medizinische Anwendungen. Konventionelle Antikörper bestehen aus je zwei schweren und zwei leichten Ketten, die beide an der Antigenbindung beteiligt sind. Die Bindungsstelle des Antigens ist dabei meist flach oder konkav. *Camelidae*, wie Lamas, Kamele, Alpakas und Dromedare, produzieren zusätzlich zu diesen konventionellen Antikörpern eine weitere Klasse von Antikörpern, die nur aus schweren Ketten aufgebaut sind, sog. Schwere-Ketten-Antikörper (heavy chain antibodies, hcAbs) (Hamers-Casterman *et al*, 1993). Diesen Antikörpern fehlt die leichte Kette sowie die CH1-Domäne der schweren Ketten, sodass hcAbs mit nur sechs Immunglobulin-Domänen und ca. 90 kD deutlich kleiner sind als konventionelle Antikörper mit 12 Domänen und ca. 150 kD (**Abb. 1.7 A**). Im Serum der *Camelidae* machen diese Schwere-Ketten-Antikörper bis zu 45 % der Antikörper aus (Hamers-Casterman *et al*, 1993; van der Linden *et al*, 2000). Die variable Domäne der schweren Kette wird in diesen Antikörpern VHH (*variable domain of the heavy chain of heavy chain antibodies*) oder Nanobody genannt, und ist allein für die Antigenbindung verantwortlich (Holliger & Hudson, 2005; Muyldermans, 2013) (**Abb. 1.7 A**). Mutationen in der *Framework*-Region 2 der VHHs zu hydrophilen Aminosäuren erklären die hohe Stabilität und gute Löslichkeit rekombinanter VHH Domänen (Nguyen *et al*, 2002) (**Abb. 1.7 C**). Es sind zwei Isotypen von Schwere-Ketten-Antikörpern bekannt, die längere oder kürzere *Hinge*-Regionen zwischen VHH und CH2 Domäne enthalten, (*long hinge* hcAb bzw. *short hinge* hcAb) (Hamers-Casterman *et al*, 1993). hcAbs zeigen im Vergleich zu konventionellen Antikörpern häufig eine deutlich verlängerte CDR3 (*complementarity determining region 3*) (Desmyter *et al*, 2001; Koch-Nolte *et al*, 2007).

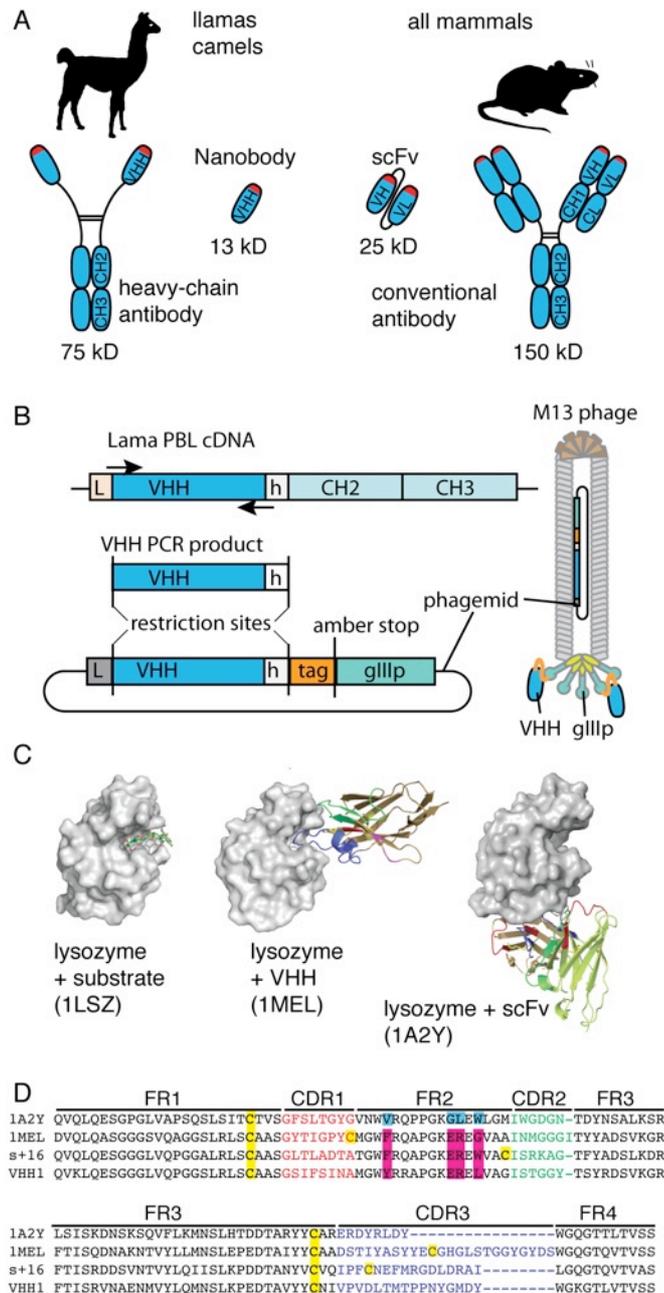


Abb. 1.8: Strukturelle Besonderheiten von Nanobodies.

(A) Schwere-Ketten-Antikörpern aus Lamas fehlt die leichte Kette und die CH1-Domäne der schweren Kette. Das Antigen-bindende Paratop (rot) wird durch eine einzelne Domäne (VHH / Nanobody) gebildet. Nanobodies sind stabil und gut löslich. VH- und VL-Domänen konventioneller Antikörper sind i.d.R. nur als Fusionsproteine, verbunden mit einem Linker, als scFv (*single chain variable fragments*) stabil. (B) Die für Nanobodies kodierende Region kann aus der RNA von Lymphozyten aus immunisierten Lamas PCR-amplifiziert und in einen Phagemid-Vektor kloniert werden. Spezifische Phagen können mittels Phagen-Display-Technologie an immobilisiertem Antigen selektioniert werden. (C) Nanobodies haben die besondere Fähigkeit, aufgrund einer verlängerten CDR3-Region in tiefe Bindungstaschen von Enzymen (hier: Lysozym) zu binden und diese zu inhibieren. Konventionelle Antikörper binden meist flache Epitope außerhalb des aktiven Zentrums. (D) Aminosäuresequenzalignment von einer konventionellen VH gegen Lysozym (pdb-id: 1a2y), dem Lysozym-inhibierenden Nanobody Cablys3 (pdb-id: 1mel), dem ARTC2.2-inhibierenden Nanobody s+16a und dem SpvB-inhibierenden Nanobody VHH5. Die Löslichkeit der Nanobodies wird durch die hydrophilen Aminosäuren in der Framework-Region 2 (FR2) gewährleistet (pink). Die CDR-Regionen sind farbig kodiert: CDR1: rot, CDR2: grün, CDR3: blau. Disulfidbrücken sind gelb dargestellt, (Abbildung aus (Menzel *et al*, 2013)).

Aus konventionellen Antikörpern ist die kleinste Einheit, die zur Antigenbindung fähig ist, ein Fusionsprotein aus variabler Domäne der schweren Kette (VH) und variabler Domäne der leichten Kette (VL) zu einem Einzelketten-Variablen-Fragment (*single chain variable fragment*, scFv) (Huston *et al*, 1991). Schwere-Ketten-Antikörper besitzen eine Antigenbindungsstelle, die von nur einer Domäne, der VHH, gebildet wird. Diese Domäne wird auch Nanobody genannt, da sie nur wenige Nanometer groß ist und mit einer Masse von 15 kD die kleinste natürliche Antigen-bindende Einheit darstellt (Muyldermans *et al*, 1994). Da Nanobodies aus nur einer Domäne bestehen, sind sie vergleichsweise einfach aus dem Blut immunisierter Lamas zu klonieren. Hierzu kann aus den peripheren Blutlymphozyten die RNA präpariert und nach reverser Transkription aus der cDNA mit VHH-spezifischen Primern das Immunrepertoire an Nanobodies als Bibliothek in einen Vektor kloniert werden (Muyldermans, 2013; Wesolowski *et al*, 2009). Dies ist im Fall der Nanobodies deutlich einfacher als für scFvs, da in den scFvs die VH- und VL-Gene separat amplifiziert und nachfolgend mit einem Linker verknüpft werden. Hierbei werden zufällige Kombinationen von VH- und VL-Domänen produziert, die kein physiologisches Äquivalent haben (Tang *et al*, 1996; Huston *et al*, 1991). Die amplifizierten Nanobodies entsprechen den nativen, durch Affinitätsreifung entstandenen Antigen-Bindungsdomänen (Muyldermans, 2013). Spezifisch bindende Nanobodies lassen sich über die Phagen-Display-Technologie selektieren (Pardon *et al*, 2014; Koh *et al*, 2010; Wesolowski *et al*, 2009; Muyldermans, 2013). Des Weiteren lassen sich Nanobodies als einzelne, lösliche Domänen in pro- und eukaryotischen Zellen mit hohen Ausbeuten produzieren und haben eine hohe thermische und chemische Stabilität (Dumoulin *et al*, 2002; Muyldermans, 2013). Die in Nanobodies verlängerte CDR3 ermöglicht oft eine Bindung in tiefe Bindungstaschen des Antigens (Desmyter *et al*, 1996; De Genst *et al*, 2006) (**Abb. 1.8 C**). So konnten gegen verschiedene Enzyme inhibitorische Nanobodies generiert werden (Menzel *et al*, 2013; Desmyter *et al*, 1996; Stijlemans *et al*, 2004; Conrath *et al*, 2001; Oyen *et al*, 2011; Koch-Nolte *et al*, 1999). Zum Beispiel kann die Inhibition der ADP-Ribosyltransferase ARTC2.2 durch den Nanobody s+16a *in vivo* T-Zellen vor Nukleotid-induziertem Zelltod schützen (Koch-Nolte *et al*, 2007; Rissiek *et al*, 2014).

Nanobodies zeigen eine geringe Immunogenität (Cortez-Retamozo *et al*, 2004; Baral *et al*, 2006). Zur Zeit befinden sich mehrere Nanobodies in klinischen Studien, die u.

a. gegen den von-Willebrand-Faktor (Holz, 2012), IL-6 (Sarker *et al*, 2013), oder TNF α (Vandenbroucke *et al*, 2010) gerichtet sind.

In innovativen Anwendungen werden weitere positive Eigenschaften der Nanobodies genutzt. Durch Fusionierung an die Fc-Domänen eines konventionellen Antiköpers wird eine Verlängerung der *in-vivo*-Halbwertszeit, eine Erhöhung der Avidität oder die Induktion Antikörper-abhängiger Zytotoxizität erreicht (Bell *et al*, 2010); durch Fusionierung mehrerer Nanobodies aneinander werden kleine multivalente bzw. multispezifische Antikörper erzeugt. Der in klinischen Studien eingesetzte anti-TNF α Nanobody ATN-103 (Ablynx) ist ein trimeres Konstrukt aus zwei TNF α -spezifischen Nanobodies und einem Nanobody gegen Albumin, der die *in-vivo*-Halbwertszeit erhöht (Kratz & Elsadek, 2012; Tijink *et al*, 2008). Die gute Gewebepenetration macht Nanobodies zu guten Werkzeugen für die *in-vivo*-Bildgebung (Chakravarty *et al*, 2014; Bannas *et al*, 2014). Andere Applikationen sind die intrazelluläre Visualisierung bestimmter Zielproteine in lebenden Zellen durch Transfektion mit einem Fusionsprotein aus Nanobody und einem fluoreszierenden Protein, sog. Chromobodies (Rothbauer *et al*, 2006; Zolghadr *et al*, 2012), die intrazelluläre Inhibition von Toxinen (Thanongsaksrikul & Chaicumpa, 2011), die Stabilisierung von Bindungspartnern für die Röntgenstrukturaufklärung (Pardon *et al*, 2014; Baranova *et al*, 2012; Plazinska *et al*, 2013; Rasmussen *et al*, 2011) sowie der Transport von Proteinen in Zellen (Emmerson *et al*, 2011) und durch die Blut-Hirn-Schranke (Li *et al*, 2012).

Ein Ziel dieser Arbeit war die Generierung spezifischer Nanobodies gegen ADAM17. Hierfür wurden zwei Lamas immunisiert, das Nanobody-Repertoire kloniert, spezifische Nanobodies mittels Phagen-Display-Technologie selektioniert und hinsichtlich ihrer Bindungs-Epitope, Affinitäten und Einsatzmöglichkeiten charakterisiert.

1.6 Ziele der Arbeit

In Vorarbeiten war gezeigt worden, dass ARTC2.2 nach Behandlung von T-Zellen mit Phorbolestern oder durch Kreuzvernetzung des T-Zell-Rezeptors proteolytisch von der Zellmembran abgestoßen wird. Ferner war bekannt, dass extrazelluläre Nukleotide über ARTC2.2 und den P2X7-Rezeptor membrannahe Proteolyse induzieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Hypothese, dass ARTC2.2 selbst durch Nukleotid-induzierte Proteolyse freigesetzt und reguliert werden kann, geprüft werden. Dabei sollte geklärt werden, an welcher Position ARTC2.2 gespalten wird und ob die proteolytische Freisetzung die Enzymaktivität von ARTC2.2 beeinflusst. Nachdem gezeigt wurde, dass ARTC2.2 nach Abstoßung von der Zellmembran bevorzugt IFN- γ ADP-ribosyliert, stellte sich die Frage, an welcher Position IFN- γ ADP-ribosyliert wird und welche Konsequenzen dies für die Funktion von IFN- γ hat. Weil ADAM17 als induzierbares *Shedding*-Enzym gilt, sollten zudem ADAM17-spezifische Antikörper als experimentelle Werkzeuge hergestellt und charakterisiert werden.

2 Materialien

2.1 Laborgeräte

Gerät	Modell	Firma
Analysenwaage	Type 1412	Sartorius
Autoclav	Varioclave	H+P Labortechnik
DNA Gelelektrophorese	40-0708	Peqlab biotechnology
Durchflusszytometer	FACSCanto II	BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop	EVOS	Advanced Microscopy Group
Heizblock	Thermomixer Compact	Eppendorf
Inkubationsschüttler	HT INFORS	Unitron
Inkubator	B6060	Heraeus
Mikrowelle	M 637 EC	Miele
Neubauer Zählkammer		LaborOptik
PCR-Maschine	T3	Biometra
pH-Meter		Mettler
Photometer	Nanodrop 2000c	Peqlab biotechnology
Pipetten	Research-Linie	Eppendorf
Pipettierhilfe		Integra
Plattenleser	Wallac 1441	Perkin-Elmer
	Infinite	Tecan
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Xcell II MiniCell	Invitrogen
Roller		Stuart
Röntgenfilm-Entwickler	Curix60	AGFA
Scanner	CanonScan 9800F	Canon
Spannungsgeräte	BI0105 LVD	Biometra
	Power Pac 200	BioRad
Sterile Werkbänke	BSB4	GELAIR
	HeraSafe	Heraeus
Transilluminator	Type TI 1	Biometra
Vortex		Neolab
Wasserbad	Type 1007	Gesellschaft für Labortechnik
Western-Blot-Apparaturen	Xcell II MiniCell	Invitrogen
Zentrifugen	Rotanta 460 R	Hettich
	5417R	Eppendorf
	5430	Eppendorf
	Biofuge pico	Heraeus

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Name	Firma
Aktivkohlebeutel	Destaining Bags	Amresco
Einwegpipetten steril	versch. Größen	BD Biosciences
Elektroporationsküvetten	Gene pulser 0,1 cm	Bio-Rad
Filme für die Autoradiographie	Amersham Hyperscreen	GE Healthcare
Filme für Western-Blot	Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Filmentwicklerlösung	Entwickler	AGFA
Filmfixierungslösung	Fixierer	AGFA
Gelfiltrationssäulen	PD-10	GE Healthcare
Kulturflaschen	T25, T75	Nunc
Kulturschalen	10cm, 25 cm	Greiner
Mikrotiterplatten 96-well	C8 Starwell Maxisorp, Edge	Nunc
Mikrotiterplatten 96-well	Fluoro-Nunc black	Nunc
Mikrotiterplatten 96-well	V-bottom	Greiner
Parafilm		VWR
Pipettenspitzen, div. Größen	Tipstack	Sarstedt
Polyacrylamid-Gele	Novex BIS-TRIS 12 %	Invitrogen
Polypropylenröhrchen, steril	15 ml, 50 ml	Greiner
Reaktionsgefäße	Safeseal	Sarstedt
Sterilfiltrationsapparaturen	Steriflip, Stericup	Millipore
Ultrazentrifugationsfilter	Amicon Ultra 10000 MWCO	Millipore
Untersuchungshandschuhe	Perform	Aurelia
Zentrifugenröhrchen, steril	15 ml, 50 ml	BD Biosciences

2.3 Reagenzsysteme (Kits)

Material	Name	Firma
Gelextraktion	Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel
PCR-Aufreinigung	Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel
Plasmid-Präparation	QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
	Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
SDS-PAGE-Färbung	Colloidal Blue Staining Kit	Invitrogen

2.4 Chemikalien

Chemikalie	Firma
2xYT	BD/Difco
Agar	BD/Difco
AESBF	Sigma
Agarose	Invitrogen
Aqua ad iniectabilia	Braun
ATP	Sigma
Bacto-Agar	Gibco-BRL
Bacto-Hefeextrakt	Gibco-BRL
Bacto-Trypton	Gibco-BRL
BSA	PAA
Carbenicillin	Serva
DMEM	Gibco
<i>DNA-loading dye 6x</i>	Fermentas
dNTPs	Invitrogen
DTT	Invitrogen
ECL-Reagenz	Amersham
EDTA	Sigma
Ethanol, reinst, getrocknet	Merck
Ethanol, vergällt	Walter CMP GmbH
Ethidiumbromid	Molecular Probes
Firststrand-Buffer	Invitrogen
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Gel-Dry Drying Solution	Invitrogen
GeneRuler 1 kb-DNA-Ladder	Fermentas
G418	Sigma
Hepes, 1 M	Gibco
Hexamere	Invitrogen
Hoechst33342	Hoechst
Jetpei	Polyplus
Kanamycin	Novagen
KOD-Buffer	Novagen
L-Glutamin	Gibco
LB Agar	BD/Difco
LB Broth	BD/Difco
M13K07 Helferphagen	NEB
Magermilchpulver	Roth
MagicMark	Life technologies
Methanol	Walther
MgSO ₄	Novagen
NAD	Sigma
Natriumchlorid	Sigma
Natriumhydrogencarbonat	Sigma
Nicht-essenzielle Aminosäuren, 100x	Gibco
NP-40	Sigma

Chemikalie	Firma
NuPAGE <i>antioxidant</i>	Invitrogen
NuPAGE <i>sample reducing agent</i> , 10x	Invitrogen
NuPAGE SDS-PAGE <i>sample buffer</i> , 4x	Invitrogen
Paraformaldehyd	Merck
PBS	Gibco
PJ-34	ENZO
Pluronic	BASF
RNAseOut	Invitrogen
Roti-safe	Roth
RPMI 1640	Gibco
Schwefelsäure	Merck
SOC-medium	Sigma
Sucrose	Merck
TAE, <i>DNA typing grade</i> , 50x	Invitrogen
Terrific broth	USB Corp
TMB-Substratlösung	Pierce
Triton X-100	Serva
Trypsin, 10x	Invitrogen
Tween-20	ICI-Americas
³² P-NAD	Perkin-Elmer

2.5 Medien

Z

Medium	Zusammensetzung
2xYT	31 g/l in de-ionisiertem Wasser
2xYT-Agar	2xYT, 15 g Agar
2xYT-Carb	2xYT mit 100 µg/ml Carbenicillin
2xYT-Carb-20%Glu	2xYT-Carb mit 20 % Glucose
2xYT-Carb-20%Gly	2xYT-Carb mit 20 % Glycerin
2xYT-Carb-Kana	2xYT-Carb + 50µg/µl Kanamycin
DMEM komplett	500 ml DMEM 5 ml Glutamin 5 ml Natriumpyruvat 5 ml Hepes 5 ml nicht-essenzielle Aminosäuren 25 ml FCS
F17-Transfektionsmedium	Gibco F17 4 mM L-Glutamin 0,1 % Pluronic
F17-Komplettmedium	F17-Transfektionsmedium 1 % FCS 0,5 % G418
F17 feeding medium	F17-Transfektionsmedium 20 % Trypton
LB	25 g/l in de-ionisiertem Wasser
LB Agar	30.5 g/l in de-ionisiertem Wasser

Medium	Zusammensetzung
RPMI komplett	500 ml RPMI-1640 5 ml Glutamin 5 ml Natriumpyruvat 5 ml Hepes 5 ml nicht-essenzielle Aminosäuren 25 ml FCS
SOC-Medium	0,1 % Pluronic 0.5 % Hefeextrakt 2 % Trypton 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose

2.6 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
<i>Puffer für eukaryotische Transfektion</i>	154 mM NaCl (Braun)
<i>Puffer zur Herstellung von Zelllysaten</i>	1 % Triton X-100, 1mM AEBSF in PBS
<i>Puffer für Western-Blot</i>	
Transferpuffer	3,027 g TrisBase + 14,4 g Glycin + 20 % Methanol; pH 8,3
Blotpuffer	5 % Transferpuffer, 10 % Methanol, 0,1 % Antioxidans
TBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3 g TrisBase, pH7,4
Block-Puffer	TBS, 5 % Magermilchpulver (w/v)
Antikörperlösung	1xTBS, 0,5 % Magermilchpulver, 0,1 % Tween 20
Waschpuffer	1xTBS, 0,1 % Tween 20
<i>Puffer für die Affinitätschromatographie</i>	
Elutionspuffer	100 mM Glycin-HCl, pH 3,5 in PBS
Neutralisationspuffer	1 M Tris-HCl, pH 8,0 in PBS
<i>Puffer für ELISA und Phagen Display</i>	
Coating-Puffer	100 mM NaHCO ₃ , pH 8,8
Block-Puffer	5 % BSA in PBS
Waschpuffer	0,01 % Tween in PBS

Puffer	Zusammensetzung
<i>Puffer für die Immunfluoreszenz</i> Block-Puffer	2 % BSA. 3 % Ziegen Serum, 0,5 % NP-40 in PBS
Antikörperlösung	3 % Ziegen Serum, 0,1 % Igepal in PBS
<i>Puffer für die ADAM17-Aktivitätsmessungen</i>	50mM Tris-HCl pH=9,0
<i>Puffer für den STAT1-Assay</i> Peritoneallavage-Puffer	2mM EDTA in PBS
Stimulationsmedium	RPMI komplett, 0-10 U/ml Interferon- γ
Fixierungsmedium	2 % PFA
Permeabilisierungspuffer	Phosflow Perm buffer 3 (BD)
Waschpuffer	1 % FCS in PBS
<i>Puffer für Phagenpräzipitation</i> PEG/NaCl	20 % PEG + 250 mM NaCl in H ₂ O

2.7 Antikörper

Antigen	Klon	Fluorochrom	Firma
ARTC2.2	A106	Alexa 647	AG Koch-Nolte
CD62L	MEL-14	FITC	eBioscience
CD3e	145-2C11	APC	Biolegend
P2X7	RH23A44#16	Alexa 647	AG Koch-Nolte
Kaninchen IgG (H+L)	(polyklonal)	Peroxidase (HRP)	eBioscience
Kaninchen IgG (H+L)	(polyklonal)	PE	Dianova
pSTAT-1	pY701	Alexa 647	BD
ADAM17 (human)	D1A12	-	AG Koch-Nolte
ADAM17	ST127	-	AG Koch-Nolte
ADAM17	ST161	-	AG Koch-Nolte
ADAM17	K133	-	AG Koch-Nolte
β 5i	ab3329	-	Abcam
PA28	#2408	-	cell signalling
Ratten IgG		Peroxidase (HRP)	Jackson
FLAG-Tag	M2	-	Sigma

2.8 Enzyme

Enzym	Firma
<i>Enzyme für Klonierungen</i>	NEB
SfiI	NEB
NcoI	NEB
NotI	NEB
Antarktische Phosphatase	NEB
KOD Hot Start Polymerase	Novagen
SuperscriptIII Reverse Transkriptase	Invitrogen
<i>ADAM17</i>	
human ADAM17 (Kat-Dis-MPD)	RnD Systems
murin ADAM17 (Pro-Kat-Dis)	RnD Systems
human ADAM17 (Kat)	ENZO
<i>ARTC2.2 und ARH1</i>	
murine ARTC2.2 (nach <i>Shedding</i> , DC27.10)	AG Koch-Nolte
humane ARH1 (rek. aus <i>E.coli</i>)	AG Koch-Nolte

2.9 Mauslinien

Linie	Firma
C57bl/6 wt	UKE
BALB/c-ARTC2B6	AG Koch-Nolte

2.10 Zytokine

Zytokin (murin)	Firma
IL-1 alpha	Immunotools
IL-1 beta	Immunotools
IL-2	Immunotools
IL-5	Immunotools
IL-6	Immunotools
IL-12	Peprtech
IL-17	Immunotools
IFN- γ	Immunotools
MCP1	Immunotools
RANTES	Immunotools
TNF α	Immunotools

2.11 Inhibitoren

Inhibitor	Zielenzym	Firma
s+16	ARTC2.2	AG Koch-Nolte
13A7	P2X7	AG Koch-Nolte
GW280264X	ADAM10+17	GlaxoSmithKline
GI254023X	ADAM10(+17)	GlaxoSmithKline
TAPI-2	Metalloproteasen	ENZO
D1A12	human ADAM17	AG Koch-Nolte
PJ-34	PARP-Inhibitor	Enzo

2.12 DNA- und Protein-Standards

Standard	Firma
<i>DNA-Standards</i>	Fermentas
GeneRule, 1kB	Fermentas
SmartLadder	Eurogentec
<i>Protein-Standards</i>	
Novex Sharp pre-stained <i>Supermark</i>	Invitrogen AG Koch-Nolte 100 µg/ml BSA 75 µg/ml IgG 10 µg/ml Lysozym in 1x PBS
MagicMark	Life Technologies

2.13 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Firma
LHFmu	TCGCGGCCCCAGCCGGCCATGGCCGATGTGCAGCTGCAGGMGTCWGGRRGGAGG	Sigma
IgG2b.rev	AGGATTGGGTTGTGGTGCGGCCGCTGGTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG	Sigma
LMB3	CAGGAAACAGCTATGAC	Sigma
fdSeq1	TGAATTTTCTGTATGAGG	Sigma
CMV-fn	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	Sigma
BGH-rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Sigma

2.14 Plasmide

Gen von Interesse	Vektoren	Firma
Nb-Bibliothek	pHEN2 (Phagemid)	AG Goldbaum
mADAM17_nativ	pEGFP	AG Koch-Nolte
hADAM17_CD+Pro_His	pCDNA6	AG Koch-Nolte
mADAM17_CD+Pro_His	pCDNA6	AG Koch-Nolte
mP2X7k	pCDNA3.1	AG Koch-Nolte
mARTC2.2	pASK60	AG Koch-Nolte
mCD62L	pCMV-Sport6	AG Koch-Nolte
eGFP (nukleär)	pCDNA3.1	AG Koch-Nolte
127-Fc	pCSE2.5	AG Koch-Nolte, {Jager: 2013dj}
161-Fc	pCSE2.5	AG Koch-Nolte, {Jager: 2013dj}
D1A12-Fc	pCSE2.5	AG Koch-Nolte, {Jager: 2013dj}
D1A12	pMA-T	Life Technologies / Genent

2.15 Pro- und Eukaryotische Zellen

Zellen	Firma
<i>prokaryotische Zellen</i>	
TG1 <i>E. coli</i>	Lucigen
XL-2 Blue <i>E. coli</i>	Stratagene
<i>eukaryotische Zellen</i>	
DC27.10	AG Koch-Nolte
DC27.10 ARTC2.2	AG Koch-Nolte
HEK	AG Koch-Nolte
CHO	AG Koch-Nolte
HEK-6e	AG Koch-Nolte
Podozyten	AG Meyer-Schwesinger

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration aufgereinigter DNA und RNA wurde durch Spektrophotometrie mittels Nanodrop ermittelt. Hierfür wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt und mit den Faktoren $A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$ für DNA und $A_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/ml}$ für RNA in Konzentrationen umgerechnet. Das Verhältnis der Absorptionen A_{260} / A_{280} wurde verwendet, um die Reinheit zu beurteilen. DNA wurde bei einem Verhältnis von $A_{260} / A_{280} = 1,8 - 2,0$ und RNA bei $A_{260} / A_{280} = 2,0 - 2,2$ als ausreichend rein bewertet.

3.1.2 Reverse Transkription (RT) und Polymerase Kettenreaktion (PCR)

RNA aus peripheren Lama-Blutlymphozyten wurde auf eine Konzentration von 200 ng/ μl eingestellt und je 3,2 μg (= 8 μl) RNA wurden verwendet um sie in komplementäre DNA (cDNA) mit der reversen Transkriptase Superscript III (Invitrogen) umzuschreiben. Hierfür wurden zufällige Hexamere (*random hexamers*) als Primer und RNase-Out zum Schutz der RNA vor Degradation eingesetzt. Zunächst wurde die RNA mit den Hexameren und den dNTPs für 10 min bei 70 °C inkubiert.

Tabelle 3.1: RNA-Hexamer-Inkubation

RNA	16 μl		
RNaseOut	1 μl	70 °C	10'
Random hexamers (50 μM)	3 μl	4 °C	Pause
	20 μl RNA-Mix		

Ein Aliquot dieser Reaktion wurde für eine Qualitätskontrolle mittels Agarosegelelektrophorese abgenommen. Dem Reaktionsansatz wurden anschließend die reverse Transkriptase, die dNTPs und Puffer zugegeben und die RNA in cDNA umgeschrieben.

Tabelle 3.2: reverse Transkription

dNTPs	4 μl	24 °C	10'
Puffer	4 μl	50 °C	20'
DTT	1 μl	95 °C	2'
Superscript III	1 μl	4 °C	Pause
RNA-Mix	10 μl		
	20 μl cDNA		

Zur Herstellung spezifischer DNA-Amplifikate mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde die Polymerase KOD Hot-Start (Novagen) mit den im Kit enthaltenen Puffern und Reagenzien eingesetzt. Es wurde 1 μl cDNA pro PCR-Ansatz als Matritze eingesetzt. Folgende PCR-Reaktionen wurden für die Amplifikation der cDNA verwendet:

Tabelle 3.3: PCR zur Amplifikation von Nanobody-kodierender DNA aus cDNA

cDNA	1 μl	94 °C	2'	39x
Primer LHFmu	2 μl	94 °C	30"	
Primer IgG2b.rev	2 μl	52 °C	20"	
dNTPs	5 μl	70 °C	20"	
KOD-Puffer (10x)	5 μl	72 °C	2'	
MgSO ₄	2 μl	4 °C	Pause	
KOD-Hot-Start Polymerase	1 μl			
H ₂ O	<u>32μl</u>			
	50 μl			

3.1.3 DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von SeqLab durchgeführt. Hierfür wurden 700 ng Plasmid-DNA mit 20 pmol des jeweiligen Primers und de-ionisiertem Wasser in einem Volumen von 7 μl verwendet. Die Auswertung erfolgte mit 4 Peaks (mekentosj).

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese und Gelaufreinigung

DNA-Fragmente wurden mit Agarosegelelektrophorese größenfraktioniert und aufgereinigt. Hierfür wurde 1 % Agarose in 1x TAE Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid versetzt und gegossen. Die Proben wurden mit dem adäquaten Volumen 6x Probenpuffer versetzt und in die Taschen des erkalteten Gels gegeben. Die Gele liefen je nach Größe der Fragmente bei 80 V für ca. 1 h. Die DNA- oder RNA-Banden wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators visualisiert und fotografiert, oder die DNA-Fragmente wurden zur weiteren Verwendung aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Zur Gelaufreinigung wurde das Kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution erfolgte mit 15-50 μl TE-Elutionspuffer oder destilliertem Wasser (vor der Ligation).

3.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA erfolgte mit den jeweils passenden Restriktionsendonukleasen und Puffern von New England Biolabs (NEB). Die Temperaturen und Pufferbedingungen für den Verdau mit zwei Enzymen wurden gemäß den Empfehlungen von NEB gewählt. Die Dephosphorylierung des Vektors erfolgte mit 1 μ l Antarctic Phosphatase und 1 μ l des zugehörigen Puffers (NEB) für 1 h bei 37 °C. Folgende Enzym-Kombinationen, Zeiten und Temperaturen wurden für den Restriktionsverdau verwendet:

Tabelle 3.4: Verdau von DNA mit Endonukleasen

Ziel-DNA	Enzym1	Enzym2	Temperatur	Dauer
VHH-Amplifikat / pHEN2 Zielvektor	SfiI		50 °C	16 h
		NotI	37 °C	2 h
VHH-pHEN2 / pCSE_2.5 Zielvektor	NcoI	NotI	37 °C	4 h

3.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Vor der Ligation wurde der, mit denselben Endonukleasen geschnittene, Zielvektor 1 h bei 37 °C dephosphoryliert und über ein Agarosegel aufgereinigt.

Für die Ligationsreaktionen wurde T4-Ligase und der passende Puffer von NEB verwendet. 100 ng Vektor-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 3:1 (Insert:Vektor) mit angepasster Insert-Menge in einem Reaktionsansatz von 20 μ l für 16 h bei 16 °C ligiert. Als Kontrolle wurden Ligationsansätze ohne Insert angesetzt. Wenn das Verhältnis der gewachsenen Klone nach Transformation von Ligationsansätzen zu Ligationskontrollen mindestens 5:1 betrug, wurden Klone für eine Sequenzanalyse gepickt.

3.1.7 Transformation kompetenter Bakterien

Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Chemisch kompetente Bakterien wurden mittels Hitzeschock transformiert. Hierfür wurden 100 μ l Bakterien aus der Lagerung bei -80 °C entnommen und auf Eis aufgetaut. 1 μ l Plasmid-DNA oder 2 μ l Ligationen wurden zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock von 30 s bei 42 °C wurden die Bakterien weitere 2 min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 900 μ l SOC-Medium bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Von Transformationen mit Plasmid-DNA wurden 10-30 μ l, von Ligationensätzen 50 μ l auf 2xYT-Carb-Agar ausplattiert.

Transformation elektrisch kompetenter Bakterien

Elektrisch kompetente Bakterien wurden mittels Elektroporation transformiert. Hierfür wurden 100 μ l TG1-Bakterien aus der Lagerung bei -80 °C entnommen, auf Eis aufgetaut und in 40 μ l Aliquots aufgeteilt. Je Aliquot wurden 4 μ l Ligationsansatz zugegeben und die Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Küvette wurde in den Elektroporator (Gene-Pulser, Bio-Rad) gesteckt und die Bakterien im Programm EC1 (1800V, 4-5 ms) elektroporiert. Die Zellen wurden anschließend mit 960 μ l SOC-Medium (37 °C) aufgenommen und 1 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. 50 μ l der Ligationsansätze wurden auf 2xYT-Carb-Agar ausplattiert. Bei Ligations-Transformationen wurde der Rest für 1 min bei 4000 rpm zentrifugiert, anschließend in 200 μ l SOC-Medium aufgenommen und ebenfalls auf 2xYT-Carb-Agar ausplattiert.

3.1.8 Kultivierung von Bakterien

Bakterien wurden in LB-Carb oder 2xYT-Carb-Medium kultiviert. Hierfür wurden Einzelklone von Agarplatten gepickt und mit diesen ein passendes Volumen des jeweiligen (mit 100 μ g/ml Carbenicillin versetztem) Medium angeimpft. Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Hauptkulturen wurden mit den Vorkulturen angeimpft und unter denselben Bedingungen weitere 3-6 h inkubiert.

3.1.9 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für Plasmid-Minipräparationen wurden 5 ml Vorkulturen ohne anschließende Hauptkultur verwendet. Plasmid-Maxipräparationen wurden aus 100 ml Hauptkultur (jeweils mit 100 μ g/ml Carbenicillin) angefertigt. Die Präparation erfolgte entsprechend dem Protokoll der Spin Miniprep oder Maxiprep kits (Quiagen).

3.2 Phagen-Display-Technologie

Die Phagen-Display-Technologie ermöglicht die Selektion von Antikörperfragmenten aus naiven Bibliotheken oder Immunbibliotheken durch die Kopplung von Genotyp und Phänotyp der Antikörperfragmente in Form von Phagen (McCafferty *et al*, 1990). Hierzu wird das Immunrepertoire mit passenden Primern für die Antikörperfragmente amplifiziert und in einen Phagemidvektor kloniert. Dieser dient anschließend zur Transformation von *E. coli*. Diese *E. coli* werden mit Helferphagen superinfiziert, sodass neue Phagen gebildet werden können. Dem Helferphagenom fehlt das gIII-Hüllprotein (gIIIp), das für die intakten, virulenten Phagen benötigt wird. Dieses Protein ist - als Fusionsprotein mit dem Antikörperfragment - in dem Phagemidvektor enthalten. Somit können nur die *E. coli*-Zellen, die sowohl ein Phagemid als auch das Helferphagenom enthalten, intakte Phagen produzieren. Die so entstehenden Phagen exprimieren zum einen das Antikörperfragment auf der Oberfläche und können darüber an immobilisiertem Antigen selektioniert werden und zum anderen das Phagemid, über das eine Sequenzanalyse und Klonierung des Antikörperfragments möglich ist. Die Selektion kann z. B. an Zellen, die das Antigen exprimieren oder an der Oberfläche von 96-well-Platten erfolgen (Petropoulos, 2012; Vincke *et al*, 2012).

In dieser Arbeit wurde das Immunrepertoire von immunisierten Lamas in Form der variablen Domänen der Schwere-Ketten-Antikörper (Nanobodies) amplifiziert und in den Phagemidvektor pHEN2 kloniert (**Abb. 3.1**). Die nach Superinfektion der pHEN2.Nanobody-transformierten *E. coli* mit den Helferphagen M13K07 resultierenden Phagen (**Abb. 3.2**) wurden an der Oberfläche von 96-well Multititerplatten selektioniert, an denen rekombinantes ADAM17-Protein immobilisiert wurde. Die eluierten Phagen wurden amplifiziert und in einer zweiten Selektionsrunde an denselben Antigenen auf ADAM17-Binder angereichert (**Abb. 3.3**). Von den eluierten Phagen beider Selektionsrunden wurden einige Phagemide sequenziert und hiervon einige für die Proteinproduktion ausgewählt.

3.2.1 Klonierung des VHH-Immunrepertoires

Nach cDNA-Immunisierung der Lamas mittels GeneGun und Booster-Immunisierungen mittels GeneGun und rekombinatem Protein wurde den Lamas 540 und 541 von der Firma Ablynx in Gent Blut entnommen und RNA präpariert. Die RNA wurde in Ethanol verschickt, anschließend präzipitiert und auf 400 ng/ μ l in deionisiertem Wasser eingestellt. Reverse Transkription und die Amplifikation des VHH-Immunrepertoires erfolgten wie in **Abschnitt 3.1.2** beschrieben. Für die Amplifikation der VHHs wurden die Primer LHFmu und IgG2b.rev verwendet. Die Amplifikate von ca. 500 bp wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die jeweiligen Banden ausgeschnitten und aufgereinigt. Die Amplifikate wurden mit den Restriktions-endonukleasen SfiI und NotI verdaut (**Abschnitt 3.1.5**), über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und mit je 15 μ l eluiert. Ebenso erfolgte der Verdau des Vektors, der anschließend dephosphoryliert wurde (**Abschnitt 3.1.5**). Anschließend wurden Inserts und Vektor in einem molaren Verhältnis von 3:1 (Insert:Vektor) ligiert (**Abschnitt 3.1.6**). Je Lama wurden vier Ligationsansätze (à 20 μ l) mit jeweils 100 ng Vektor und 50 ng Insert angesetzt. Diese wurden je Bibliothek in 20 Transformationsansätzen (mit je 4 μ l Ligationsansatz) verwendet, um TG1-Zellen (Lucigen) zu elektroporieren (**Abschnitt 3.1.7**). Die transformierten Bakterien wurden auf 2xYT-Carb-Agar ausgestrichen und die Anzahl der Klone als Hinweis für die Bibliotheksgröße bestimmt. Die Platten wurden in je 20 ml 2xYT-Carb-Medium mit 20 % Glycerol geschabt, 30 min durch Rollern gleichmäßig suspendiert, bei 4600 rpm für 10 min zentrifugiert, in 2 ml 2xYT-Carb-20%Gly Medium aufgenommen und bei -80 °C als Bakterienbibliothek gelagert. Je 10 μ l der Reaktionen wurden zur Phagenproduktion verwendet.

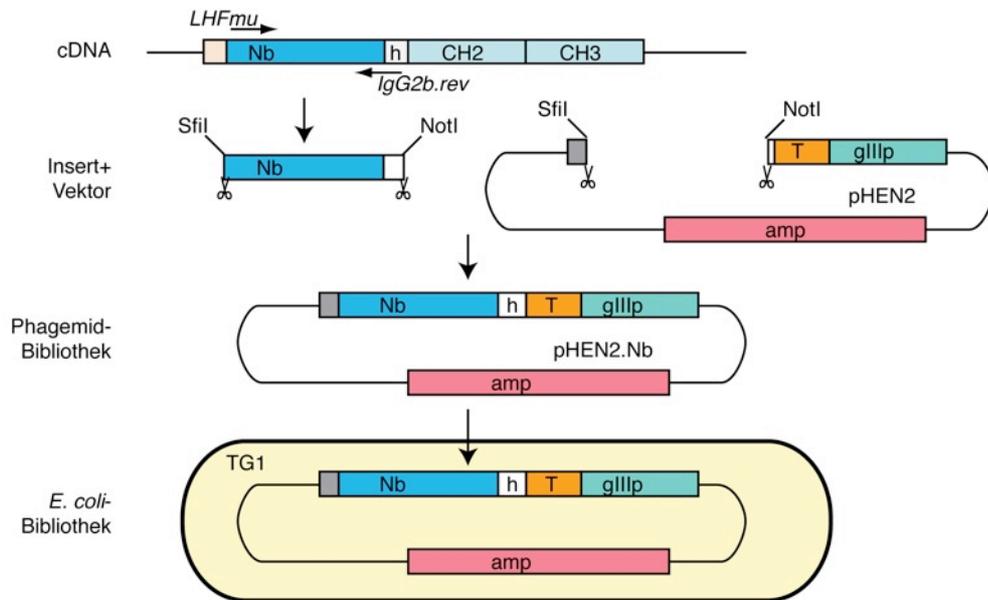


Abb. 3.1: Klonierung der VHH-Phagemid-Bibliotheken.

Nach der reversen Transkription wurden die Nanobodies (Nb) mit den spezifischen Primern LHFmu und IgG2b.rev amplifiziert und nach Gelaufreinigung mit SfiI und NotI geschnitten. Der Phagemidvektor wurde ebenfalls mit SfiI und NotI geschnitten und dephosphoryliert. Nach Gelaufreinigung wurden beide Fragmente im molaren Verhältnis 3:1 (Insert:Vektor) ligiert. Durch Elektroporation in elektrokompente TG1-*E.coli* entstand die *E.coli*-Bibliothek.

3.2.2 Produktion der Phagenbibliotheken

Je 10 μ l der Bakterienbibliotheken wurden in 5 ml 2xYT-Carb-20%Glu bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,5$ bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Vorkultur 10 min bei 4600 rpm zentrifugiert und in 20 ml 2xYT-Carb-20%Glu aufgenommen und bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,5$ kultiviert. 5 ml dieser Kulturen wurden mit je 50 μ l M13K07-Helferphagen superinfiziert und 30 min bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden 10 min bei 4600 rpm zentrifugiert, einmal mit 5 ml 2xYT-Carb gewaschen und anschließend in 50 ml 2xYT-Carb-Kana aufgenommen, um die mit Phagemid und Helferphagen doppelt transfizierten Bakterien zu selektionieren. Die Produktion der Phagen erfolgte bei 30 °C und 220 rpm für 16 h. Zur Ernte der Phagen wurden die von Helferphagen superinfizierten Bakterien durch 10 min Zentrifugation bei 4600 rpm pelletiert und 40 ml des Phagen enthaltenden Überstandes in 10 ml vorgekühlten PEG/NaCl-Puffer zur Präzipitation der Phagen gegeben und durch Invertieren gut gemischt. Nach Inkubation auf Eis für 2 h wurden die präzipitierten Phagen durch Zentrifugation für 10 min bei 4600 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Das Phagen-Pellet wurden in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in das 250 μ l PEG/NaCl vorgelegt wurde. Die Phagen

präzipitierten ein zweites Mal für 30 min auf Eis. Nach Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm wurde der Überstand verworfen und die Phagen erneut in 1 ml PBS aufgenommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung von Zelltrümmern und unlöslichen Phagen wurde für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der phagenhaltige Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt der Zentrifugation und des Überführens des Überstandes auf ein neues Reaktionsgefäß wurde so lange wiederholt, bis makroskopisch keine unlöslichen Bestandteile nach der Zentrifugation sichtbar waren. Die so gereinigten Phagen wurden als Phagenbibliothek bei 4 °C gelagert.

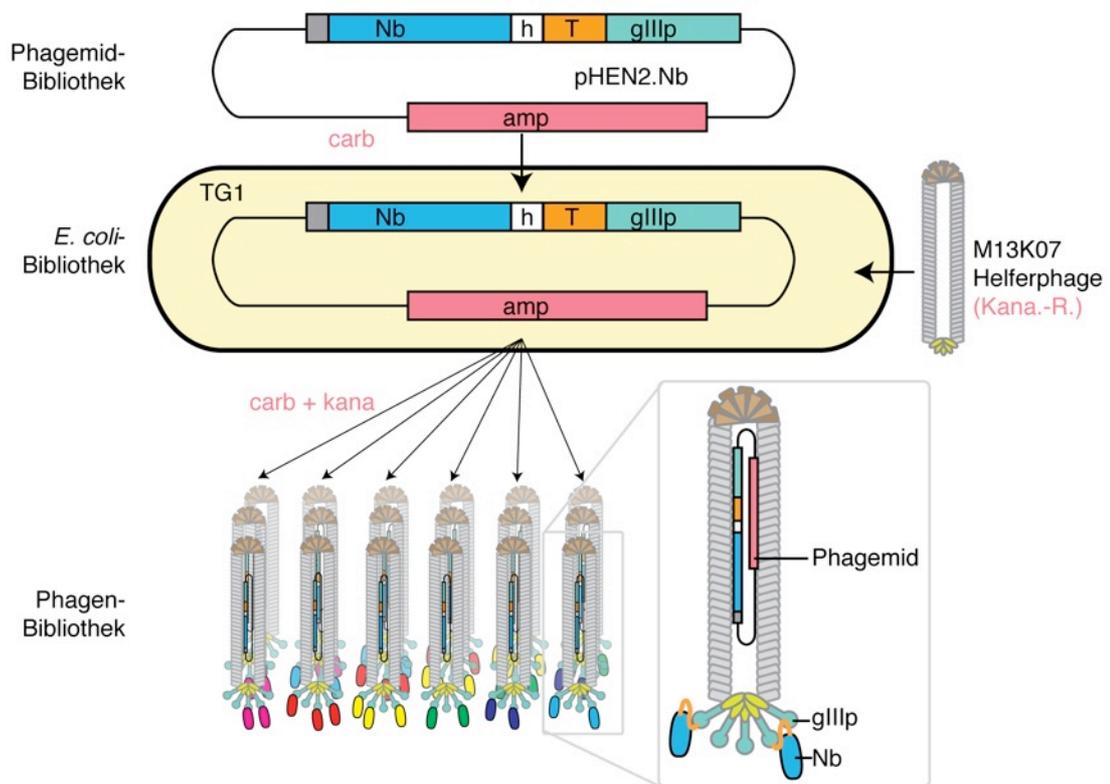


Abb. 3.2: Erstellung der Phagen-Bibliotheken.

Die Bakterienbibliotheken wurden mit Helferphagen superinfiziert und dienen so der Produktion von Phagen, die das klonierte Nanobody-Immurrepertoire als Fusionsproteine ihrer gIII-Proteine auf der Oberfläche exprimieren, während sie je ein Phagemid enthalten, das für die Sequenz der exprimierten VHH kodiert. Die so erreichte Kopplung von Genotyp und Phänotyp ermöglicht die Selektion der Phagen über die Affinitäten der exprimierten Nanobodies an das Zielprotein und die weitere Präparation und Sequenzierung der Nanobody-kodierenden Phagemide. Die Helferphagen kodieren für alle Phagenproteine außer gIIIp und beinhalten eine Kanamycinresistenz, sodass nur die Bakterien, die Phagemid und Helferphagen genom besitzen, überleben und intakte Phagen produzieren können. In rosa sind die jeweiligen Antibiotika-Resistenzen und Selektionsmedien dargestellt. amp: Ampicillinresistenz, vermittelt Resistenz gegen Ampicillin, sowie dessen Derivat Carbenicillin (Carb). kana: Kanamycin, Kana.-R.: Kanamycin-Resistenz, wird von Helferphagen kodiert.

3.2.3 Selektion

Um spezifische Nanobodies mittels Phagen-Display zu selektionieren, wurden die Zielproteine (rekombinante ADAM17) an die Wells von Starwell Maxisorp Platten (Nunc) immobilisiert. Hierfür wurden die Wells mit je 100 ng rekombinantem Protein in Coating-Puffer über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die freien Bindungsstellen wurden anschließend für 2 h mit 200 µl Block-Puffer blockiert, um unspezifische Bindungen der Phagen an die Polystyroloberfläche der Wells zu minimieren. 100 µl der Phagenbibliotheken wurden mit 50 µl Block-Puffer für 2 h bei 4 °C blockiert, um Phagen, die unspezifisch an Milchpulver binden, abzusättigen. Anschließend wurden je Well 100 µl Phagen zugegeben und 1 h bei RT gebunden. Der Überstand wurde verworfen und die Wells wurden gewaschen. Hierfür wurde 50x Waschpuffer (0,05 % TWEEN in PBS) und 50x PBS verwendet. Die Elution der Phagen erfolgte durch 120 µl Trypsin für 15 min bei RT. Die eluierten Phagen wurden abgenommen und das Trypsin mit 12 µl 100 mM AEBSF neutralisiert.

3.2.4 Reinfektion und Amplifikation selektionierter Phagen

Die nach der Selektion putativ mit ADAM17-bindenden Phagen angereicherten Phagenbibliotheken wurden für die Infektion von TG1-*E. coli* verwendet. Hierfür wurden 2,5 ml TG-1-Zellen mit einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,5$ mit 120 µl Phagen transfiziert und 30 min bei 37 °C inkubiert, danach auf 2xYT-Carb-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Klone wurden gezählt und einige Klone gepickt. Die Bakterien wurden von den Platten mit 20 ml 2xYT-Carb-20%Gly geschabt, 30 min suspendiert, bei 4600 rpm für 10 min zentrifugiert und in 2 ml 2xYT-Carb-20%Gly aufgenommen. Diese putativ angereicherten Bakterienbibliotheken wurden bei -80 °C als Bakterienbibliothek gelagert. Die gepickten Klone wurden verwendet um Plasmid-Minipräparationen anzufertigen und die gewonnenen Plasmide zu sequenzieren. Mehrfach gefundene Klone zeigen eine Anreicherung bestimmter Phagen an. Je 10 µl der Reaktionen wurden zur Phagenproduktion verwendet (**Abschnitt 3.2.2**). Die so erhaltenen Phagenbibliotheken wurden für eine weitere Selektionsrunde analog der in den **Abschnitten 3.2.2** und **3.2.3** beschriebenen Selektion verwendet, um eine weitere Anreicherung ADAM17-spezifischer Klone zu erhalten. Die an muriner ADAM17 selektionierten Phagen wurden auch in der zweiten Runde auf Bindung muriner ADAM17 selektioniert, um Spezies-spezifische Binder nicht zu verlieren; gleiches gilt für die Selektion an humaner ADAM17.

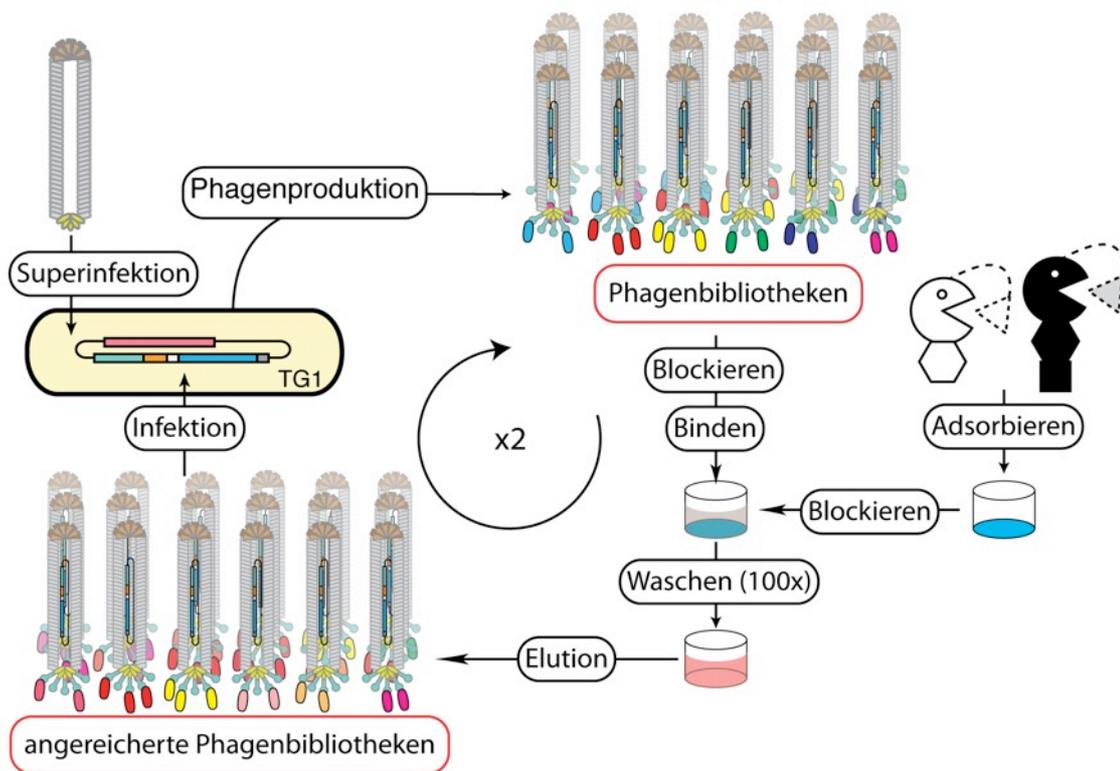


Abb. 3.3: Selektion der Phagenbibliotheken an immobilisiertem ADAM17-Protein.

Für die Phagenbibliotheken wurde rekombinantes ADAM17-Protein an die Oberfläche der Wells von 96-well-Platten gebunden; freie Bindungsstellen wurden mit Block-Puffer abgesättigt. Phagenbibliotheken wurden zur Entfernung unspezifischer Binder mit Block-Puffer vorinkubiert und 1 h bei RT an die Wells gebunden. Es folgten 100 Waschstschritte zur Beseitigung nicht bindender Phagen. Die Elution erfolgte mit Trypsin. Die so angereicherten Phagen wurden zur Infektion von TG-1 *E.coli* verwendet, die nach Superinfektion mit Helferphagen der Phagenproduktion dienten. Die angereicherten Phagenbibliotheken wurden in einer zweiten Selektionsrunde weiter angereichert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Produktion von Nanobody-Fc-Fusionsproteinen

Einige der im Phagemidvektor pHEN2 selektierten Nanobodies wurden sequenziert und hiervon einige angereicherte Klone ausgewählt, um für weitere Analysen als Nanobody-Fc (Nb-Fc)-Fusionsproteine in HEK-6e-Zellen exprimiert zu werden. Hierfür wurden die Nanobodies mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und NotI 4 h bei 37 °C geschnitten und die Fragmente in den ebenfalls NcoI und NotI geschnittenen und dephosphorylierten pCSE2.5-Vektor kloniert (**Abschnitte 3.1.5 -3.1.7**). Der verwendete Vektor beinhaltet die CH2- und CH3-Domänen (Antikörper-Fc-Teil) des Kaninchen-IgGs, sodass Nb-Fcs gebildet werden. Hierdurch wird ein bivalenter Schwere-Ketten-Antikörper nachgebildet, der sich über dieselben

Detektionsmethoden wie der polyklonale Kaninchenantikörper K133, der ebenfalls in dieser Arbeit charakterisiert wird, nachweisen lässt. Nach Ligation und Transformation in XL-2 *E. coli* wurden Plasmid-Minipräparationen angefertigt und die Sequenzen verifiziert. Erfolgreich umklonierte Nanobodies wurden für die Expression als Nb-Fc in HEK-6e-Zellen ausgewählt. Für die Transfektion der HEK-6e-Zellen wurden je 5 µg Plasmid-DNA und eine T25-Zellkulturflasche, die halbkonfluent mit HEK-6e-Zellen bewachsen war, verwendet. Die Zellen wurden mit F17-Transfektionsmedium gewaschen und in 5 ml Transfektionsmedium transfiziert. Als Transfektionsreagenz diente Jetpei (**Abschnitt 3.4.2**). Einen Tag nach Transfektion wurden dem Medium 250 µl Feedingmedium zugegeben. Am sechsten Tag nach Transfektion wurde der Überstand geerntet. Hierzu wurde das Medium abgenommen und 10 min bei 4600 rpm zentrifugiert, um den Überstand von Zellen zu befreien. Der Überstand wurde über einen Steriflip steril filtriert und bei 4 °C gelagert. HEK-6e-Zellen und die verwendeten F17-Medien wurden zusammen entwickelt, um eine hohe Sekretion sowie eine hohe Reinheit der Proteine im Überstand zu erreichen (Jäger *et al*, 2013).

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres Wanderungsverhaltens im elektrischen Feld. Das zugesetzte Natriumlaurylsulfat (*sodium dodecyl sulphate*, SDS) ist ein anionisches Tensid, das sich gleichmäßig an Proteine anlagert und diese so denaturiert. Aufgrund der starken negativen Ladung des SDS wandern die Proteine im elektrischen Feld analog zu ihrem Molekulargewicht, da die elektrische Ladung des Proteins keinen relevanten Einfluss auf die Gesamtladung besitzt. Disulfidbrücken können durch Zugabe von Reduktionsmittel getrennt werden. Die Proteine wandern nach Auftragen in Taschen des Polyacrylamidgels und Anlegen des Stroms (z. B. 200 V) durch eine Matrix aus Polyacrylamid. In dieser Arbeit wurde das Xcell II-MiniCell System mit den NuPAGE Novex Gelen und Puffern von Invitrogen verwendet. Es wurden 12 %ige Polyacrylamidgele verwendet, die 10 oder 12 Taschen für den Probenauftrag besitzen. Den Proben wurde Probenpuffer und 10 % Proben-Reduktionsmittel zugegeben und sie wurden für 10 min bei 70 °C erhitzt. Bis auf eine Ausnahme wurden alle Gele unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. In Abb. 4.1.2 C wurde kein Reduktionsmittel zugegeben, um die Disulfidbrücke des IFN-γ intakt zu lassen und so Informationen über die

Dimerisierung von IFN- γ zu erhalten. Die Proben wurden anschließend für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x MES Laufpuffer für 40 min bei 200 V und 110 mA.

Zur Visualisierung der Proteinbanden im Gel wurde dieses mit dem Novex colloidal blue staining Kit (invitrogen) unter Einhaltung der Herstellerangaben über Nacht gefärbt (Coomassie-Färbung). Die Entfärbung zur Reduktion des Hintergrundes erfolgte für 6-8 h mit einem Aktivkohlebeutel in de-ionisiertem Wasser. Anschließend wurden die Gele in Geltrocknungslösung in Cellulosefolien eingespannt und über Nacht getrocknet. Die Gele wurden entweder für eine anschließende Autoradiographie oder einen Western-Blot verwendet oder sie wurden direkt zur Dokumentation eingescannt. Für Western-Blot-Analysen erfolgte keine Trocknung des Geles und die Coomassie-Färbung erfolgte nach dem Blot.

3.3.3 ADP-Ribosylierung und de-ADP-Ribosylierung von IFN- γ

Die ARTC2.2-katalysierte ADP-Ribosylierung von IFN- γ wurde durch radioaktive Markierung entweder zur quantitativen Produktion von ADPR-IFN- γ oder zum analytischen Vergleich der ADP-Ribosylierungen von IFN- γ zu anderen Proteinen durchgeführt. Die radioaktive Markierung von IFN- γ mit ^{32}P wird in **Abschnitt 3.3.4** besprochen.

Zur quantitativen ADP-Ribosylierung von IFN- γ für funktionelle Assays wurde IFN- γ von Immunotools und ARTC2.2, die von stabil transfizierten Zellen nach Nukleotid-induziertem *Shedding* aufgereinigt wurde (**Abschnitt 3.4.3**), verwendet.

Es wurden 8 μg IFN- γ mit 50 μM NAD und 200 ng ARTC2.2 für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde auf zwei identische Ansätze geteilt und einem Ansatz wurden 4 μg ADP-Ribosyl-Hydrolase 1 (ARH1) zugegeben. Nach weiterer Inkubation von beiden Ansätzen für 1 h bei 37 °C wurde je ein Aliquot der Proben mittels SDS-PAGE analysiert (**Abschnitt 3.2.4**) und der Rest bei -80 °C gelagert. Zur Kontrolle wurde ebenfalls ein Aliquot IFN- γ ohne NAD und ARTC2.2 denselben Inkubationen unterzogen und ebenfalls für die funktionellen Untersuchungen eingefroren.

3.3.4 Assays zur enzymatischen Markierung mit ^{32}P -NAD

Durch radioaktive Markierung können modifizierte Proteine mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden. Diese Methode wurde für die Detektion von Zielproteinen für die ARTC2.2-katalysierte ADP-Ribosylierung verwendet, indem die Proteine bzw. das Proteingemisch mit radioaktivem ^{32}P -NAD und der ADP-Ribosyltransferase ARTC2.2 inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktive Markierung über Autoradiographie des Gels nachgewiesen.

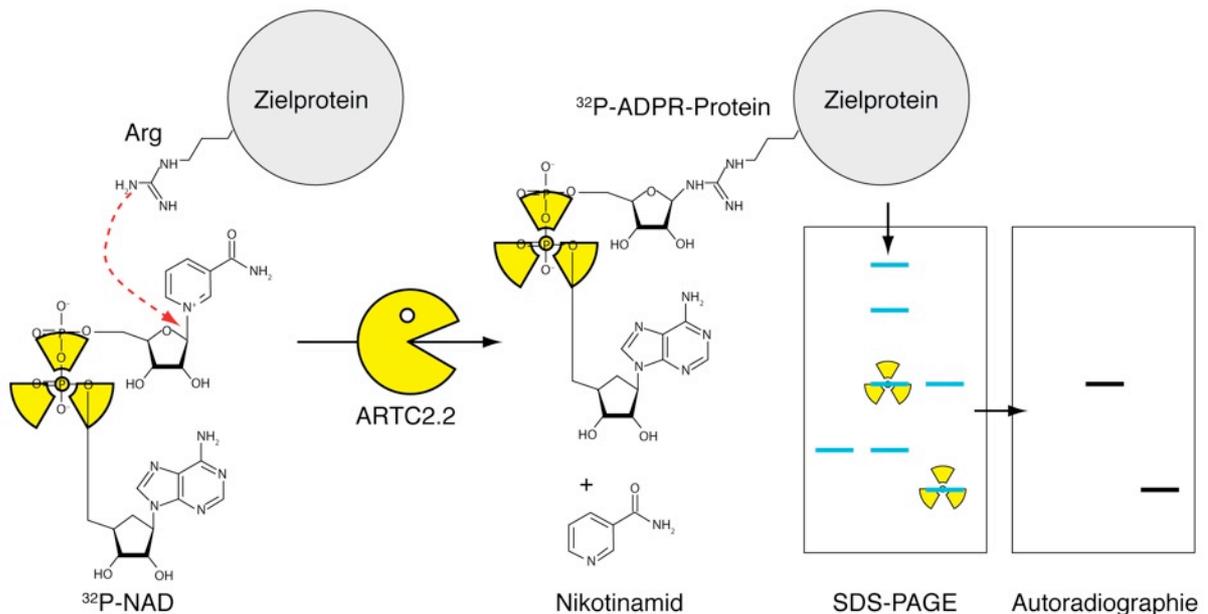


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der ^{32}P -ADP-Ribosylierungsassays.

^{32}P -NAD besitzt am Adenin-zugewandten Phosphat das radioaktive Phosphorisotop ^{32}P . Dieses wird bei der ARTC2.2-katalysierten ADP-Ribosylierungsreaktion auf das Zielprotein übertragen. Nach SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Trocknung des Gels kann dieses zur Exposition eines Röntgenfilms verwendet werden, der durch die emittierte β -Strahlung selektiv geschwärzt wird. Durch Vergleich der Banden auf SDS-PAGE und Autoradiographie können die ADP-ribosylierten Proteine identifiziert werden.

Die in diesen Versuchen eingesetzten Zytokine waren von Immunotools (mit der Ausnahme IL-12 von Peprotech) und die ARTC2.2 wurde aus dem Überstand von stabil transfizierten Zellen nach Nukleotid-induziertem *Shedding* aufgereinigt (**Abschnitt 3.4.3**). Das radioaktive NAD wurde im Mix mit $1\ \mu\text{M}$ nicht-radioaktivem NAD in einer Aktivität von ca. $1\ \mu\text{Ci}$ / Ansatz eingesetzt. Die Reaktionen fanden in einem Volumen von $40\ \mu\text{l}$ statt und wurden durch Zugabe von $20\ \mu\text{l}$ 3x SDS-PAGE Probenpuffer (inklusive Reduktionsmittel, Ausnahme: ^{32}P -ADP-Ribosylierung von IFN- γ und Mausserum) gestoppt. $30\ \mu\text{l}$ wurden für die SDS-PAGE verwendet und der Rest für eine eventuelle zweite SDS-PAGE bei $-20\ ^\circ\text{C}$ eingefroren. Die ADP-Ribosylierung erfolgte mit $50\ \text{ng}$ ARTC2.2 und $1\ \mu\text{M}$ NAD ($1\ \mu\text{Ci}$) für 15 min bei 37

°C. Alle Proben wurden mit SDS-PAGE-Ladepuffer bei 70 °C für 10 min inkubiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt und getrocknet (**Abschnitt 3.3.2**).

Die Autoradiographie erfolgte nach Trocknung der Gele, indem auf das radioaktive Gel in einer Filmkassette im Dunkeln ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser bei -80 °C für Zeiträume von 3 min bis 72 h exponiert wurde. Der Film wurde im Dunkeln in den automatischen Filmentwickler Curix 60 gegeben und nach Entwicklung und Fixierung eingescannt.

³²P-ADP-Ribosylierung von Membranproteinen und löslichen Proteinen

4x10⁵ stabil ARTC2.2-transfizierte oder untransfizierte DC27.10-Zellen wurden gewaschen und in 40 µl DMEM vorgelegt. Nur den untransfizierten Zellen wurde exogen durch *Shedding* freigesetzte sARTC2.2 zugesetzt. Nach Zugabe des ³²P-NAD wurden die Zellen 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden vom Überstand durch Zentrifugation getrennt und 4x mit PBS gewaschen. Die Membranproteine wurden 30 min bei 4 °C mit 0,5 % Triton X-100 in Lösung gebracht und durch Zentrifugation von Zelltrümmern befreit. Der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert, um letzte Zelltrümmer zu entfernen. Alle Proben wurden mit SDS-PAGE-Ladepuffer bei 70 °C für 10 min inkubiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, getrocknet und für eine Autoradiographie verwendet.

³²P-ADP-Ribosylierung von Zytokinen

Je 1 µg von 11 verschiedenen Zytokinen (in aufsteigendem Molekulargewicht: Rantes, MCP-1, IL-5, IFN-γ, IL-17, TNFα, IL-2, IL-1a, IL1-β, IL-6, und IL-12) wurden entweder einzeln oder im Mix mit ³²P-NAD und sARTC2.2 für 15 min bei 37 °C inkubiert. Alle Proben wurden mit SDS-PAGE-Ladepuffer bei 70 °C für 10 min inkubiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, getrocknet und für eine Autoradiographie verwendet.

³²P-ADP-Ribosylierung von IFN- γ und Mausserum

1 μ l Mausserum in 40 μ l PBS wurde mit oder ohne IFN- γ mit ³²P-NAD und sARTC2.2 für 15 min bei 37 °C inkubiert. Alle Proben wurden mit SDS-PAGE-Ladepuffer (ohne Reduktionsmittel) bei 70 °C für 10 min inkubiert und dann mittels nicht reduzierender SDS-PAGE aufgetrennt. Auf diese Weise ist es möglich zu überprüfen, ob IFN- γ (nach ADP-Ribosylierung) als Dimer vorliegt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, getrocknet und für eine Autoradiographie verwendet.

³²P-ADP-Ribosylierung von IFN- γ mit und ohne vor-ADP-Ribosylierung

Zur Abschätzung des ADP-Ribosylierungsgrades wurden quantitativ ADP-ribosyliertes IFN- γ und nicht-ADP-ribosyliertes IFN- γ (**Abschnitt 3.3.3**) mit ³²P-NAD und sARTC2.2 für 15 min bei 37 °C weiter inkubiert. Das nicht vor-ADP-ribosylierte IFN- γ wurde ebenfalls mit 50 μ M NAD, aber ohne ARTC2.2 vorinkubiert. Somit war in beiden Ansätzen dieselbe NAD-Konzentration. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Probenpuffer und Inkubation bei 70 °C für 10 min gestoppt und die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, getrocknet und für die Autoradiographie verwendet.

³²P-ADP-Ribosylierung von IFN- γ nach Bindung des Interferon- γ -Rezeptor 1 (IFNGR1)

IFN- γ wurde in An- oder Abwesenheit von 2 μ g IFNGR1 in PBS oder in PBS mit 1 μ l Mausserum 30 min bei 4 °C vorinkubiert und anschließend mit sARTC2.2 und ³²P-NAD in 1 μ M nichtradioaktivem NAD für 15 min bei 37 °C inkubiert. Alle Proben wurden mit SDS-PAGE-Ladepuffer bei 70 °C für 10 min inkubiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, getrocknet und für eine Autoradiographie verwendet.

3.3.5 Fluorometrische Bestimmung der ADAM17-Inhibition

Die Aktivität von ADAM17 kann über einen Assay gemessen werden, in dem ein Peptid als Substrat für ADAM17 verwendet wird, das ein Fluorophor enthält, das von einem weiteren Fluorophor inhibiert (gequencht) wird. Bei Spaltung des Peptides wird diese Inhibition aufgehoben, sodass eine Fluoreszenz gemessen werden kann. Es wurde mit Mca-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂ (ENZO) ein Peptidsubstrat verwendet, das aus der Pro-TNF α -Sequenz abgeleitet wurde und als gutes Substrat für ADAM17 fungiert (Taylor *et al*, 2009). Die Spaltung erfolgt wie die des Pro-TNF α zwischen A und V und hinterlässt ein Peptid (Mca-PLAQA), das nach Anregung bei 328 nm bei einer Emissionswellenlänge von 420 nm gemessen werden kann.

Hierfür wurden die drei rekombinanten ADAM17-Proteine - murine ADAM17 (Pro-Kat-Dis) (RnD Systems), humane ADAM17 (Kat-Dis-MPD) (RnD Systems) und human ADAM17 (Kat) (ENZO) - in 50 mM Tris-HCL, pH 9 + 100 ng/ μ l BSA auf 5 ng/ μ l verdünnt und für 1 h bei 37 °C mit den jeweiligen Antikörpern oder Inhibitoren in schwarzen 96-well-Platten (Nunc) inkubiert. Es wurden je Ansatz 1 μ g Antikörper bzw. 50 μ M der chemischen Inhibitoren in einem Reaktionsansatz von 100 μ l eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats (20 μ l mit 40 μ M) gestartet und im Fluoreszenz-Plattenleser Tecan Infinite gemessen. Es wurde eine Kinetik über einen Zeitraum von 15 min mit je 1 Messung / min bei Anregung 320 nm / Emission 420 nm gemessen. Aus den Werten über die Zeit wurde die Steigung als Änderung der relativen Fluoreszenzintensitäten (Δ RFU) berechnet.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind unter **Abschnitt 2.15** aufgeführt. Alle Zellen wurden im jeweiligen Zellkulturmedium im Brutschrank bei 37 °C und unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Arbeiten an der Zellkultur wurden immer an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle Materialien und Medien, die in der Zellkultur eingesetzt wurden, wurden zuvor entweder für 20 min bei 121 °C autoklaviert oder über Steriflip oder Stericup steril filtriert. Die Suspensionszellen DC27.10 bzw. DC27.10^{ARTC2.2} wurden in RPMI-Komplettmedium kultiviert. Zur Passagierung dieser Zellen wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit frischem Medium in einer neuen Kulturschale 1:2 bis 1:30, abhängig vom Bedarf und dem Zustand der Zellen, verdünnt.

Die adhärenenten Zelllinien HEK und CHO wurden in DMEM-Komplettmedium kultiviert und die HEK-6e-Zellen in F17-Komplettmedium. Diese Zellen wurden zum Passagieren zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 1-2 ml 1x Trypsin abgelöst. Die Zellen wurden in frischem Medium gewaschen und in Verdünnungen von 1:2 bis 1:10, je nach Bedarf und Zustand der Zellen, geteilt. Zelldichten wurden mit der Neubauer-Zählkammer ermittelt und die Zentrifugationen erfolgten bei allen Zellen für 5 min bei 1600 rpm und 4 °C. Die Kultivierung der Podozyten erfolgte durch Catherine Meyer-Schwesinger (Nephrologie, UKE).

3.4.2 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Die transienten Transfektionen der Zellen erfolgten mit JetPEI (Polyplus) entsprechend der Empfehlung des Herstellers. JetPEI ist ein lineares Polyethylenimin, das die DNA in positiv geladene Partikel verdichtet, die von den Zellen endozytotisch aufgenommen werden.

HEK-Zellen wurden für FACS-Analysen oder Proteinproduktion und CHO-Zellen für die Immunfluoreszenz transfiziert. Die HEK-6e-Zellen wurden für die Produktion von Antikörperfragmenten transfiziert. Die verwendeten Plasmide, Zelllinien und der jeweilige Verwendungszweck der durchgeführten Transfektionen sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3.6: Transfektion eukaryotischer Zellen

Zelllinie	Transfektion	Verwendung
HEK	ARTC2.2 + P2X7	ARTC2.2 für MS
HEK	ARTC2.2 + P2X7	FACS (<i>Shedding</i> -Assay)
HEK	CD62L + P2X7	FACS (<i>Shedding</i> -Assay)
HEK	murine native ADAM17 + GFP	FACS (ADAM17-Bindung)
HEK	murine native ADAM17	WB (ADAM17-Bindung)
HEK	murine ADAM17 (Kat-Pro)	WB (ADAM17-Bindung)
HEK	humane ADAM17 (Kat-Pro)	WB (ADAM17-Bindung)
CHO	murine native ADAM17 + GFP	IFM (ADAM17-Bindung)
CHO	murine ADAM17 (Kat-Pro) + GFP	IFM (ADAM17-Bindung)
CHO	humane ADAM17 (Kat-Pro) + GFP	IFM (ADAM17-Bindung)
HEK-6e	ST127 Nb-Fc-Fusionsprotein	Proteinproduktion
HEK-6e	ST161 Nb-Fc-Fusionsprotein	Proteinproduktion
HEK-6e	D1A12 scFv-Fc-Fusionsprotein	Proteinproduktion
HEK-6e	ST012 Nb-Fc-Fusionsprotein	Proteinproduktion
HEK-6e	ST086 Nb-Fc-Fusionsprotein	Proteinproduktion
HEK-6e	ST154 Nb-Fc-Fusionsprotein	Proteinproduktion

3.4.3 Nukleotid-induziertes *Shedding* und Aufreinigung von löslicher ARTC2.2

Die ARTC2.2 für die funktionellen ADP-Ribosylierungsassays wurde aus stabil ARTC2.2-transfizierten DC27.10-Zellen (DC27.10^{ARTC2.2}) über Nukleotid-induziertes *Shedding* gewonnen. Dafür wurden die Zellen schrittweise auf 20 große Kulturschalen expandiert. Die dicht gewachsenen 1×10^9 Zellen wurden durch Zentrifugation vom Medium getrennt und in frischem RPMI-Medium ohne FCS mit 200 μ M ATP aufgenommen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Das ATP induzierte *Shedding* der auf der Zelloberfläche exprimierten ARTC2.2. Da DC27.10^{ARTC2.2}-Zellen eine ARTC2.2 mit FLAG-Tag exprimieren, konnte die ARTC2.2 nach *Shedding* über Affinitätschromatographie mit dem FLAG-Tag-bindenden Antikörper M2 aufgereinigt werden. Hierfür wurde der Überstand durch Zentrifugation von den Zellen getrennt. FLAG-Tag-enthaltende Proteine wurden über eine M2-Säule aufgereinigt, indem der Überstand auf eine 1 ml M2-Sepharose-Säule gegeben, mit PBS gewaschen und gebundene Proteine anschließend mit 2 ml Elutionspuffer (100 mM Glycin-HCl, pH 3,5 in PBS) eluiert wurden. Das Eluat wurde in 200 μ l Neutralisationspuffer aufgefangen und über Gelfiltration mittels PD-10-Säule in 2,5 ml PBS umgepuffert. Das Eluat der PD-10-Säule wurden über Ultrazentrifugation (Amicon Ultra 10000 MWCO) auf 100 μ l konzentriert und über SDS-PAGE analysiert.

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) ist ein Verfahren, bei dem aus einem Zellgemisch die Expression verschiedener Proteine von einzelnen Zellen bestimmt werden können. Hierzu werden die Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt und strömen im FACS einzeln an einem Laser vorbei, der die Fluorophore anregt, sodass deren Emission gemessen werden kann. So ist es möglich, Zellen mit mehreren Antikörpern gegen unterschiedliche extra- und intrazelluläre Proteine zu markieren und die Expression dieser Proteine auf einzelnen Zellen zu analysieren und zu vergleichen. Es können so mehrere tausend Zellen pro Sekunde analysiert werden.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie angewendet, um den Verlust bestimmter Proteine von der Zelloberfläche, die Bindung eines Antikörpers an transfizierte Zellen sowie die intrazelluläre Phosphorylierung eines Transkriptionsfaktors zu untersuchen. Die einzelnen Versuche werden im Anschluss an die allgemeingültigen Methoden zur Färbung und Messung besprochen.

Die Färbungen für die Durchflusszytometrie erfolgten entweder mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern oder durch unkonjugierte Primärantikörper und einen Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist. Extrazelluläre Färbungen erfolgten durch Inkubation von 1 μg (1 μl) der jeweiligen Antikörper in 100 μl DMEM oder RPMI-Komplett-Medium für 30 min bei Raumtemperatur (RT) und Waschung mit 4 ml PBS mit anschließender Zentrifugation (5 min 1600 rpm). Ein eventueller Sekundärantikörper wurde anschließend auf dieselbe Weise mit den Zellen inkubiert und gewaschen. Die Zellen wurden in 200 μl PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer (FACS Canto, BD) gemessen. Die Auswertungen erfolgten mit dem Programm Flowjo (Version 8.8.7).

3.5.2 Analysen zum Verlust von CD62L und ARTC2.2 von der Zelloberfläche

Im ersten Assay wurden HEK-Zellen in drei Zellkulturflaschen mit ARTC2.2 und P2X7 kotransfiziert (**3.4.2**) und nach 48 h entweder auf Eis geerntet und inkubiert, oder bei 37 °C geerntet und inkubiert, oder in Anwesenheit von 10 μg ARTC2.2-blockierendem Nanobody (s+16a) im Medium (5 ml) bei 37 °C geerntet und anschließend bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden geteilt und ein Teil wurde gegen

CD3 (APC) und CD62L (FITC), der andere Teil gegen CD3 (APC) und ARTC2.2 (FITC) gefärbt und im Durchflusszytometer vermessen.

In einem weiteren Assay wurden Lymphknotenzellen von BALB/c^{ARTC2B6}-Mäusen verwendet. BALB/c^{ARTC2B6}-Mäuse tragen den ARTC2-Lokus der C57BL/6-Mäuse auf dem genetischen Hintergrund der BALB/c-Mäuse. Da C57BL/6-Mäuse aufgrund einer allelen Variante eine stärkere Expression von ARTC2.2 zeigen und die BALB/c-Mäuse ein sensitiveres Allel des P2X7-Rezeptors tragen, resultiert die Kombination dieser beiden allelen Varianten in einem für NAD-induziertes *Shedding* sehr sensitiven Mausstamm. Die axillären und mesenchymalen Lymphknoten wurden präpariert, nachdem das Tier nach Betäubung durch Genickbruch getötet worden war. Die Zellen wurden bei 4 °C durch Homogenisieren des Lymphknotens über ein steriles Sieb und Waschung in RPMI-Medium präpariert. Einem Tier wurden 1 h vor der Lymphknoten-Präparation 50 µg ARTC2.2-inhibierender Nanobody s+16a retro-orbital i.v. gespritzt. Die Lymphknotenzellen wurden bei 4 °C oder 37 °C in An- oder Abwesenheit von 100 µM NAD und unterschiedlichen Inhibitoren des NAD-induzierten *Sheddings* für 30 min inkubiert, anschließend gewaschen, gegen ARTC2.2 (APC), CD62L (FITC) und CD3 (PE) angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

3.5.3 Analyse der Bindung des pAK K133 an ADAM17-transfizierten Zellen

Transient mit nativer muriner ADAM17 und eGFP kotransfizierte HEK-Zellen (**3.4.2**) wurden mit aufgereinigtem polyklonalem Antikörper aus dem Präimmenserum (pIS) und dem Immunerum (IS = K133) 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend mit einem PE-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG-Antikörper nachgewiesen.

3.5.4 Analyse der STAT1-Phosphorylierung in Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit IFN-γ

Makrophagen aus C57BL/6-Mäusen wurden durch Peritoneal-Lavage gewonnen, indem die Tiere nach Betäubung durch Genickbruch getötet wurden und ihnen 2 ml PBS (4 °C) in das Peritoneum injiziert wurden. Die Zellen wurden durch leichte Bewegung der Mäuse gelöst und der Vorgang einmal wiederholt. Die vereinten Zellen wurden mit PBS + 1 % FCS gewaschen, gezählt, und je 2x10⁵ Zellen wurden für 30 min bei 37 °C in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von IFN-γ inkubiert. Hierfür wurde unmodifiziertes IFN-γ, ADP-ribosyliertes IFN-γ sowie de-ADP-ribosyliertes IFN-γ verwendet (**Abschnitt 3.3.3**). Nach 30 min Inkubation wurden die Zellen gewaschen, mit 2 % PFA fixiert und zunächst extrazellulär gegen

CD11b (FITC) angefärbt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, 30 min bei 4 °C mit 200 µl Phosflow Perm Buffer III permeabilisiert und mit einem anti-pSTAT1-Antikörper (pY701 - AF 647) für 20 min bei 4 °C angefärbt. Die Zellen wurden zweimal in PBS + 1 % FCS gewaschen, in 200 µl PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen (FACS Canto). Die Gewinnung und Stimulation der Zellen und die durchflusszytometrische Analyse erfolgten durch Björn Rissiek.

3.5.5 Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM)

Die Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) ermöglicht den Nachweis und die Bestimmung der subzellulären Lokalisation von bestimmten Proteinen durch Fluoreszenz-markierte Antikörper. Die Anfärbung der Proteine erfolgt vergleichbar zur Durchflusszytometrie, die Fluoreszenz wird jedoch im Mikroskop analysiert. Die Färbungen erfolgen entweder direkt mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern oder durch unkonjugierte Primärantikörper und einen Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper, der gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist.

In dieser Arbeit wurden nur intrazelluläre Anfärbungen für die Immunfluoreszenz durchgeführt. Als Zellen wurden CHO-Zellen verwendet, da diese stark adhärent sind und sich auch bei mehreren Waschungen nicht von der Oberfläche der 96-Well-Platten lösen. 48 h nach transienter Kotransfektion verschiedener ADAM17-Konstrukte mit einem nukleär lokalisierten GFP (3.4.2) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA in PBS für 10 min fixiert. Die Trennung von Zellen und Überstand erfolgte jeweils durch Ausschlagen der Platten. Die Zellen wurden durch Inkubation mit 200 µl Block-Puffer für 30 min bei RT permeabilisiert. 500 ng der Primärantikörper wurden in 100 µl Antikörperlösung verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation von 1 h bei RT wurde zweimal mit PBS + 500 mM NaCl und zweimal mit PBS gewaschen. 100 µl des ebenfalls in Antikörperlösung verdünnten PE-konjugierten Sekundärantikörpers wurden auf die Zellen gegeben und 50 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 100 µl Hoechst33342 (1:5000 in PBS) zur Färbung aller Zellkerne zugegeben und weitere 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl 1 % PFA überschichtet und im EVOS Fluoreszenzmikroskop untersucht. Es wurden Bilder der Farben Hoechst, GFP und PE aufgenommen und einzeln, sowie in den verschiedenen Überlagerungen gespeichert.

3.5.6 ELISA-Untersuchungen (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Der ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, bei dem durch eine enzymatische Farbreaktion die Bindung von Antikörper und Antigen bestimmt werden kann. Aufgrund der hohen Sensitivität der Farbreaktion kann diese Methode zur Quantifizierung von Antigenen oder zur Bestimmung von Antikörperaffinitäten verwendet werden. In dieser Arbeit wurde der ELISA eingesetzt, um Bindungsstärken der generierten Antikörper gegen verschiedene ADAM17-Konstrukte zu bestimmen. Hierfür wurden 100 ng der ADAM17-Konstrukte über Nacht bei 4 °C an die Oberfläche von Starwell-Maxisorp-Platten gebunden (*gecoated*). Freie Bindungsstellen wurden anschließend durch 200 µl Block-Puffer für 2 h bei RT blockiert. Die Näpfe wurden mit PBS gewaschen und der Primärantikörper wurde 1 h bei RT gebunden. Hierfür wurden entweder 5 µl HEK-6e-Zell-Überstand (**3.3.1**) (1 µg, 126 nM) oder verschiedene Verdünnungsstufen zwischen 400 nM und 0,001 nM in einer 1:√10 Verdünnungsreihe in PBS + 1 % BSA verwendet. Die Wells wurden dreimal mit 200 µL PBS + 0,05 % TWEEN gewaschen und anschließend mit 100 µl des HRP-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS + 1 % BSA für 1 h bei RT inkubiert. Die Wells wurden erneut dreimal mit 200 µL PBS + 0,05 % TWEEN gewaschen und das Substrat TMB wurde zugegeben. Der Farbumschlag wurde durch Zugabe von 100 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt. Die Extinktion wurde bei 450 nm im ELISA-Plattenleser gemessen.

3.5.7 Western-Blot und Immunodetektion

Der Western-Blot ist eine Methode, in der sich Proteine nach SDS-PAGE und elektrischem Transfer auf eine proteinbindende Membran durch spezifische Antikörper nachweisen lassen. Die Proteine oder die gebundenen Primärantikörper können, ähnlich wie bei dem ELISA, durch einen HRP-konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Die Detektion erfolgt anschließend über ein Chemilumineszenz-Substrat (ECL-Reagenz), das nach Spaltung Licht emittiert und so einen Röntgenfilm (ECL-Film) selektiv schwärzen kann.

Die Proteine bzw. Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (**Abschnitt 3.3.2**) und mit Hilfe des Nass-Blot-Verfahrens (X Cell II) auf PVDF-Membranen transferiert. Der Transfer erfolgte bei 30 V für 90 min auf die zuvor 1 min in Methanol aktivierte PVDF-Membran. Die Membran wurde zur Blockierung freier

Bindungsstellen 1 h bei RT mit Block-Puffer inkubiert und anschließend mit dem in 5 ml Antikörperlösung verdünnten Primärantikörper für 1 h bei RT inkubiert und dreimal 3 min mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Detektion mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper in einer 1:5000-Verdünnung in Antikörperlösung für 45 min bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde mit frisch angesetzter ECL-Lösung (*enhanced chemoluminescence*) für 5 min inkubiert. Die Peroxidase des Sekundärantikörpers katalysiert die Umsetzung des in der ECL-Lösung enthaltenen Luminols unter Lichtemission. Die Lichtemission wurde über einen lichtempfindlichen Film (Hyperfilm ECL) detektiert. Die Belichtungszeit betrug 10 s bis 2 min. Der Film wurde mit dem Film-Entwickler Curix60 entwickelt.

In dieser Arbeit wurde die Methode des Western-Blots zur Analyse der gebundenen ADAM17-Domänen durch die neu generierten Antikörper sowie zur Analyse der Induktion des Immunoproteasoms durch IFN- γ verwendet.

3.5.8 Western-Blot Analyse der gebundenen ADAM17-Domänen

HEK-Zellen wurden mit drei unterschiedlichen ADAM17-Konstrukten (murine ADAM17 nativ, und humane und murine ADAM17 Kat-Pro) transfiziert (**Abschnitt 3.4.2**). Die transfizierten oder untransfizierten (jeweils 1×10^6) Zellen wurden in 200 μ l 1 % Triton-X 100 für 30 min bei 4 °C lysiert, die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert und 10 μ l (das Äquivalent von 5×10^5 Zellen) wurde jeweils auf eine Spur des Polyacrylamidgels aufgetragen. In zwei weiteren Spuren wurden 100 ng rekombinantes Protein humaner ADAM17 (Kat) oder muriner ADAM17 (Pro-Kat-Dis) geladen. Nach SDS-PAGE (3.2.4) wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran gebロットet. Für jeden Primärantikörper wurde ein Gel bzw. ein Blot angefertigt. Die jeweilige Membran wurde mit den Primärantikörpern inkubiert, gewaschen und mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper gegen Kaninchen-IgG inkubiert. Nach weiteren Waschschrinen folgte die Detektion über ECL-Reaktion und Filmexposition.

3.5.9 Induktion des Immunoproteasoms durch IFN- γ

Für die Analyse der Induktion des Immunoproteasoms durch IFN- γ wurden Podozytenkulturen 24 h in Anwesenheit von 5 ng/ml (50 U/ml) IFN- γ stimuliert. Hierfür wurden unmodifiziertes IFN- γ , ADP-ribosyliertes IFN- γ sowie de-ADP-ribosyliertes IFN- γ verwendet (**Abschnitt 3.3.3**). Die Zellen wurden am nächsten Tag

in TPER (Pierce) lysiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation entfernt, die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit den Primärantikörpern gegen die immunoproteasomalen Bestandteile $\beta 5i$ (=LMP7) und PA-28 α sowie gegen Aktin (als Kontrolle für gleichmäßige Beladung des Gels) inkubiert, gewaschen und mit den HRP-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert. Nach weiteren Waschschritten folgte die Detektion über ECL-Reaktion und Filmexposition. Die Behandlung der Zellen und die Durchführung des Western-Blots erfolgten durch Catherine Meyer-Schwesinger (Nephrologie, UKE).

3.6 Massenspektrometrie (MS)

Durch die Massenspektrometrie (MS) ist es möglich, die Masse von geladenen Teilchen zu bestimmen. Hierzu wird die zu untersuchende Substanz ionisiert und in die Gasphase überführt. Diese Ionen werden über ein elektrisches Feld beschleunigt und anhand ihres Verhältnisses von Masse/Ladung (m/z) aufgetrennt und detektiert. Mit der Massenspektrometrie lassen sich unter anderem Proteine identifizieren und Aminosäuresequenzen und posttranslationale Modifikationen von Proteinen bestimmen. Über die Kopplung von Flüssigkeitschromatographie (*Liquid chromatography*, LC) bzw. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High-performance liquid chromatography*, HPLC) und mehreren hintereinander geschalteten MS-Analysen zu LC-MS, MS-MS (MS^2) oder MS-MS-MS (MS^3) mit unterschiedlichen Dissoziationsverfahren ist eine sehr hochauflösende Analyse der Peptide und deren Sequenzen und Modifikationen möglich.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie die Spaltstelle von ARTC2.2 nach Nukleotid-induziertem *Shedding* sowie die ADP-Ribosylierungsstelle von IFN- γ bestimmt. Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden von der AG Tholey des Instituts für experimentelle Medizin der CAU Kiel durchgeführt.

3.6.1 Bestimmung der Spaltstelle von ARTC2.2

Für die Bestimmung der Spaltstelle von ARTC2.2 nach Nukleotid-induziertem *Shedding* wurden ARTC2.2 und P2X7 kotransfizierte HEK-Zellen (3.4.2) fünf Tage nach Transfektion für 20 min mit 100 μ M NAD und 100 μ M ATP bei 37 °C inkubiert. Der Zellüberstand wurde über M2-Sepharose-Säulen gegeben und die gebundenen Proteine wurden mit Elutionspuffer (100 mM Glycin-HCl, pH 3,5 in PBS) eluiert. Die Eluate wurden in Neutralisationspuffer aufgefangen und über Gelfiltration mittels PD-10-Säule in 2,5 ml PBS umgepuffert. Die Eluate der PD-10-Säulen wurden über Ultrazentrifugation (Amicon Ultra 10000 MWCO) aufkonzentriert. Diese sARTC2.2 wurde an 15 μ l einer Aminolink-Matrix mit immobilisiertem anti-ARTC2.2-Nanobody (S-14) gebunden, denaturiert und mit EndoF deglykosyliert. Die Matrix wurde in Probenpuffer für 10 min bei 70 °C erhitzt und die gebundenen Proteine so eluiert. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Bande der erwarteten ARTC2.2-Masse wurden ausgeschnitten und zur AG Tholey gesendet. Hier wurde die Gel-Bande nach einem Waschschrift in Wasser/Acetonitril (50:50) mit 10 mM DTT für 1 h bei 56 °C reduziert und erneut mit Wasser gewaschen. Die Cysteingruppen wurden durch 55 mM Iodacetamid für 30 min im Dunkeln bei RT alkyliert und fünfmal mit Wasser/Acetonitril gewaschen. Die Proteine wurden über Nacht bei 37 °C im Gel mit 5 μ g Trypsin oder 5 μ g Glu-C in Anwesenheit von ¹⁸O-markiertem Wasser verdaut, um die so entstandenen C-Termini von dem zuvor durch *Shedding* der ARTC2.2 entstandenen zu unterscheiden. Die Peptide wurden über HPLC aufgetrennt und entsalzt. Die eluierten Peptide wurden mit MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization)-Matrix gemischt und auf ein MALDI-Ziel (in einem Verhältnis von 1:4 und Intervallen von 15 s über einen Zeitraum von 15-65 min) gespottet. Die massenspektrometrischen Messungen erfolgten mit einem AB SCIEX TOF/TOF 5800 Massenspektrometer. MS-Daten wurden über einen Bereich von 800-4000 m/z gesammelt. Die interne Kalibrierung erfolgte über Glu1-fibinopeptid B, das der MALDI-Matrix zugegeben wurde. Zur Datenauswertung wurde die TS2Mascot Software verwendet.

Die Aufreinigung der ARTC2.2 erfolgte durch Marion Nissen und Joanna Schmid und die Massenspektrometrie durch Thomas Jakoby und Andreas Tholey aus dem Institut für experimentelle Medizin der CAU Kiel.

3.6.2 Bestimmung der ADP-Ribosylierungsstelle von IFN- γ

Unmodifiziertes IFN- γ und ADP-ribosyliertes IFN- γ (**Abschnitt 3.3.3**) wurden über SDS-PAGE aufgereinigt und mit Coomassie gefärbt. Die IFN- γ repräsentierenden Banden wurden ausgeschnitten und zur AG Tholey (Kiel) gesendet. Hier wurden die Banden nach einem Waschschrift in Wasser/Acetonitil (50:50) mit 10 mM Dithiothreitol (DTT) für 45 min bei 56 °C reduziert und erneut mit Wasser gewaschen. Die Cysteingruppen wurden durch 55 mM Iodacetamid für 30 min im Dunkeln bei RT alkyliert und fünfmal mit Wasser/Acetonitil gewaschen. Die Proteine wurden über Nacht bei 37 °C im Gel mit 50 ng Chymotrypsin oder 200 ng Glu-C verdaut. Die Peptide wurden über HPLC aufgetrennt und entsalzt. Die massenspektrometrischen Messungen erfolgten mit einem AB SCIEX TOF/TOF 5800 Massenspektrometer. MS-Daten wurden über einen Bereich von 300 - 2000 m/z gesammelt. Die fünf Signale mit stärkster Intensität wurden über Kollision-induzierte Dissoziation (*collision-induced dissociation*, CID) und Hochenergie Kollisions-Dissoziation (*Higher-energy collisional dissociation*, HCD) fragmentiert und die Fragmente über ein Orbitrap-System in einer MS-MS-Messung mit einer Auflösung von 2 Da (CID) bzw. 3 Da (HCD) analysiert. Bei der Fragmentierung entstehen aus ADP-Ribose-Arginin Ornithin sowie unterschiedliche Bruchstücke des ADP-Ribose-Carbodiimids (**Diskussion, 5.2**). So identifizierte Ornithin-enthaltende Peptide wurden über einen weiteren MS-Schritt analysiert, um die exakte ADP-Ribosylierungsstelle zu identifizieren. Die so gewonnenen Daten aus den LC-MS² und LC-MS³-Messungen wurden mit Hilfe der TS2Mascot Software ausgewertet.

Die Massenspektrometrie erfolgte durch Tomas Koudelka und Andreas Tholey aus dem Institut für experimentelle Medizin der CAU Kiel.

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in drei Teile:

Im ersten Teil werden die Sensitivität der ADP-Ribosyltransferase ARTC2.2 für die Nukleotid-induzierte membran-nahe Proteolyse und die durch Proteolyse veränderte Substratspezifität der ARTC2.2 untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass ARTC2.2 über die Aktivierung von P2X7 und eine ADAM-Protease selbst proteolytisch abgespalten wird. Die Spaltstelle der ARTC2.2 wurde mittels Massenspektrometrie bestimmt und die Substratspezifität von zellgebundener und proteolytisch freigesetzter ARTC2.2 wurde in vergleichenden ADP-Ribosylierungsassays untersucht.

Im zweiten Teil folgt die Analyse möglicher Zielproteine der löslichen ARTC2.2. Hierbei fiel eine Präferenz der löslichen ARTC2.2 für das Zytokin Interferon- γ auf. Es zeigte sich, dass die ADP-Ribosylierung von Interferon- γ nahezu vollständig ablaufen kann und reversibel ist. Die ADP-Ribosylierungsstelle von Interferon- γ wurde mit R128 im funktionell relevanten C-Terminus identifiziert. In zwei funktionellen Assays konnte eine Inhibition der Aktivität von Interferon- γ durch ADP-Ribosylierung gezeigt werden.

Im dritten Teil wird die Generierung und Charakterisierung ADAM17-spezifischer Antikörper beschrieben. Es wurden ein polyklonaler Kaninchenantikörper (K133) und zwei durch Phagen-Display selektierte Nanobodies (ST127 und ST161) charakterisiert. Die Antikörper zeigen spezifische Bindung an unterschiedliche ADAM17-Domänen: ST127 bindet die katalytische Domäne und ST161 bindet die Prodomäne. K133 bindet sowohl die katalytische, als auch die Prodomäne. Die Antikörper sind im ELISA, in der Immunfluoreszenz und im Western-Blot einsetzbar und binden humane und murine ADAM17 mit unterschiedlich hohen Affinitäten.

4.1 Regulation der ADP-Ribosyltransferase ARTC2.2 durch Nukleotid-induzierte Proteolyse (*Shedding*)

Die ADP-Ribosyltransferase ARTC2.2 kann den purinergen P2X7-Ionenkanal durch kovalente Übertragung einer ADP-Ribose-Gruppe auf einen Argininrest aktivieren. Es resultiert ein anhaltender Kalziumeinstrom und die ADAM-Protease (*a disintegrin and metalloprotease*)-vermittelte proteolytische Spaltung einiger Membranproteine von der Zelloberfläche (Scheuplein *et al*, 2009). Eines der bestuntersuchten Membranproteine, die proteolytisch von der Zelloberfläche gespalten werden, ist L-Selektin (CD62L), das von ADAM17 (Peschon *et al*, 1998) nach Aktivierung von P2X7 selektionsgespalten wird (Gu *et al*, 1998; Scheuplein *et al*, 2009). Auch die ARTC2.2 kann von der Zelloberfläche gespalten werden. Bisher wurde dieser Vorgang jedoch nur nach Aktivierung von T-Zellen mit dem Phorbol-ester PMA oder einem, den T-Zell-Rezeptor kreuzvernetzenden, Antikörper beschrieben (Kahl *et al*, 2000). Im Folgenden wird untersucht, ob ARTC2.2 auch durch nukleotid-induzierte membran-nahe Proteolyse von Zellen abgespalten werden kann und somit die eigene Freisetzung initiiert.

Für die membran-nahe proteolytische Spaltung wird im Englischen häufig der Begriff "*shedding*" verwendet (dt.: abwerfen, abstoßen, freisetzen). Dieser Begriff wird im Folgenden als Substantiv „*Shedding*“ verwendet.

4.1.1 Bei der Präparation freigesetztes NAD führt zum Verlust von CD62L und ARTC2.2 von der Zelloberfläche

Schon bei der Präparation von Zellen wird NAD in ausreichender Menge freigesetzt, um über ARTC2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung von P2X7 CD62L von der Zelloberfläche abzuspalten (Rissiek *et al*, 2014). Die ADP-Ribosylierung kann bereits bei 4 °C erfolgen, die Öffnung des P2X7-Ionenkanals jedoch erst bei Erwärmung der Zellen auf 37 °C. Die ADP-Ribosylierung von P2X7 und somit auch das *Shedding* von CD62L kann durch Zugabe eines ARTC2.2-inhibierenden Nanobodies vor der Präparation verhindert werden (Scheuplein *et al*, 2009; Rissiek *et al*, 2014). Um zu untersuchen, ob dieser Signalweg auch den Verlust von ARTC2.2 von der Zelloberfläche induzieren kann, wurden HEK-Zellen mit ARTC2.2, CD62L und P2X7 kotransfiziert (**Abb. 4.1.1**). Sofern die Zellen bei 4 °C geerntet und gehalten wurden, sind P2X7, CD62L und ARTC2.2 auf der Zelloberfläche kotransfizierter Zellen nachweisbar (**Panel 1, 4**). Erwärmung auf 37 °C führt fast zum vollständigen Verlust von CD62L (**Panel 2**) und ARTC2.2 (**Panel 5**). Dieser Verlust lässt sich durch Zugabe von ARTC2.2-inhibierendem Nanobody s+16a verhindern (**Panel 3, 6**). Der protektive Effekt durch s+16a zeigt, dass der Verlust der ARTC2.2 von ihrer Enzymaktivität abhängt.

Auch auf primären T-Zellen lässt sich ein ähnlicher Effekt beobachten (**Abb. 4.1.2**). BALB/c^{ARTC2B6}-Mäuse tragen den ARTC2 Lokus der C57BL/6-Maus auf dem genetischen Hintergrund der BALB/c-Maus. T-Zellen von C57BL/6-Mäusen zeigen eine hohe Expression von ARTC2.2 (Koch-Nolte *et al*, 1999), BALB/c-Mäuse tragen eine sensitivere Variante des P2X7-Rezeptor (Adriouch *et al*, 2002). Die Kombination beider Varianten resultiert in für NAD-induziertes *Shedding* besonders sensitiven T-Zellen der BALB/c^{ARTC2B6}-Mauslinie. Bei der Präparation der Lymphknotenzellen dieser Mäuse wird ebenfalls genug NAD freigesetzt, um den Verlust von CD62L und ARTC2.2 nach Erwärmung von 4 °C (**Panels 1, 4**) auf 37 °C (**Panels 2, 5**) zu induzieren. Dieser Effekt lässt sich teilweise durch i.v. Gabe von 50 µg ARTC2.2-inhibierendem Nanobody s+16a 1 h vor Präparation der Lymphknotenzellen blockieren (**Panels 3, 6**). Die Ähnlichkeit des Verlustes von ARTC2.2 und CD62L legt nahe, dass es sich, wie für CD62L gezeigt (Peschon *et al*, 1998; Scheuplein *et al*, 2009), auch bei der ARTC2.2 um ADAM-Protease-vermitteltes *Shedding* handelt, das durch ARTC2.2 und P2X7 induziert wird.

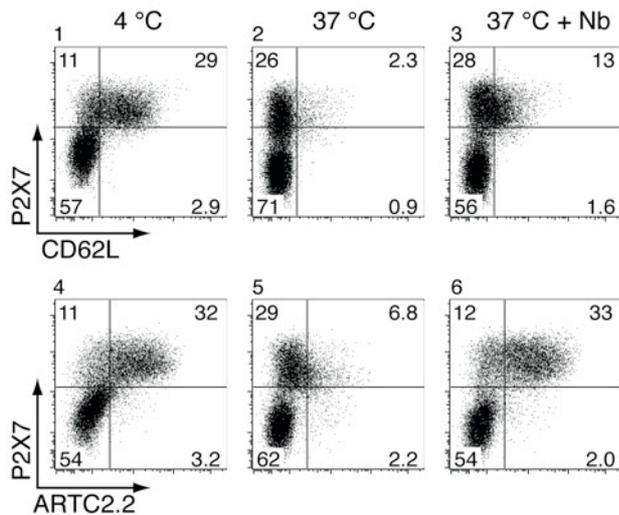


Abb. 4.1.1: Bei der Zellpräparation freigesetztes NAD führt zum Verlust von ARTC2.2 und CD62L von der Zelloberfläche transfizierter HEK-Zellen.

HEK-Zellen wurden mit ARTC2.2, P2X7 und CD62L kotransfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und vor der Anfärbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen ARTC2.2, P2X7 und CD62L für 30 min bei 4 °C oder 37 °C inkubiert. Bei einem dritten Ansatz erfolgten Ernte und anschließende Inkubation bei 37 °C in Anwesenheit des ARTC2.2-blockierenden Nanobodies s+16a (37 °C + Nb). Die Zellen wurden im Durchflusszytometer vermessen. Die dargestellten Dot-Plot Diagramme wurden mit der Software FlowJo erstellt und ausgewertet. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Zellpopulationen im jeweiligen Quadranten an. Die Anfärbung mit dem anti-P2X7 Antikörper zeigt, dass ca. 40 % der Zellen transfiziert wurden. Die durch ARTC2.2 katalysierte ADP-Ribosylierung von P2X7 findet auch bei 4 °C statt, die Aktivierung des Ionenkanals P2X7 sowie die Nukleotid-induzierte Proteolyse nur bei 37 °C.

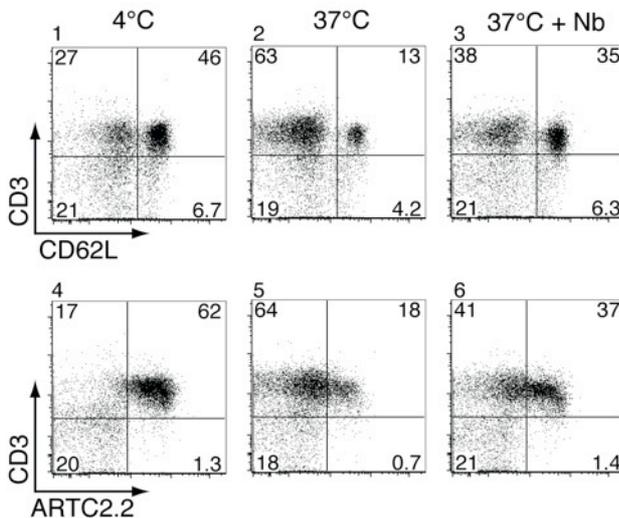


Abb. 4.1.2: Bei der Zellpräparation freigesetztes NAD führt zum Verlust von ARTC2.2 und CD62L von der Zelloberfläche von primären T-Zellen.

Lymphknotenzellen von BALB/c^{ARTC2B6}-Mäusen wurden bei 4 °C präpariert und vor der Anfärbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen ARTC2.2, CD3 und CD62L für 30 min bei 4 °C oder 37 °C inkubiert. Einer weiteren Maus wurde 1 h vor der Zellpräparation 50 µg des ARTC2.2-blockierenden Nanobodies s+16a i.v. gespritzt. Die Lymphknotenzellen wurden vor der Anfärbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern für 30 min bei 37 °C inkubiert (37 °C + Nb). Die Zellen wurden im Durchflusszytometer vermessen und mit der Software FlowJo ausgewertet. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Zellpopulationen im jeweiligen Quadranten an. Die Anfärbung zeigen, dass ca. 75 % der Lymphknotenzellen T-Zellen (CD3+) sind. Bei 4 °C zeigt die Mehrheit dieser Zellen CD62L und ARTC2.2 auf der Zelloberfläche.

4.1.2 ARTC2.2, P2X7 und eine ADAM-Protease sind an NAD-induziertem Shedding von ARTC2.2 und CD62L beteiligt

Zur Überprüfung des postulierten Signalweges über ARTC2.2, P2X7 und einer ADAM-Protease wurde als nächstes untersucht, ob entsprechende Inhibitoren den Verlust von ARTC2.2 und CD62L hemmen (**Abb. 4.1.3**). Als Inhibitoren der ARTC2.2 und des P2X7-Ionenkanals wurden die spezifischen Nanobodies s+16a bzw. 13A7 verwendet, als Inhibitor der ADAM-Protease der Hydroxamat-basierte Inhibitor GW280264X (Koch-Nolte *et al*, 2007; Danquah, 2012; Hundhausen *et al*, 2003).

BALB/c^{ARTC2B6}-Lymphknotenzellen wurden nach Präparation zunächst bei 4 °C mit den Inhibitoren vorinkubiert und dann ohne oder mit Zugabe von 50 µM exogenem NAD bei 37 °C weiter inkubiert, um eine maximale Induktion dieses Signalweges zu erhalten. Wieder ist eine deutliche Reduktion der CD62L- und ARTC2.2-Färbungen von T-Zellen bei Erwärmung auf 37 °C auch ohne Zugabe von exogenem NAD zu sehen (**Abb. 4.1.3 B**). Nach Zugabe von 50 µM NAD ist der Verlust von CD62L und ARTC2.2 von T-Zellen beinahe vollständig (**Abb. 4.1.3 C**). Der P2X7-inhibierende Nanobody 13A7 sowie der Metalloprotease-Inhibitor GW280264X verhindern diesen Verlust fast vollständig; der ARTC2.2-inhibierende Nanobody s+16a zeigt nur eine partielle Blockade (**Abb. 4.1.3 C**). Da bereits das bei der Präparation freigesetzte NAD ausreicht um P2X7 zu ADP-ribosylieren, kann der nachträglich zugesetzte ARTC2.2-inhibierende Nanobody s+16a nur die Effekte des später zugefügten NAD blockieren. Der P2X7-inhibierende Nanobody 13A7, der die Öffnung des bereits ADP-ribosylierten P2X7-Rezeptors blockiert (Danquah, 2012), und der ADAM-Inhibitor GW280264X inhibieren das *Shedding* unabhängig von der ADP-Ribosylierung (**Abb. 4.1.3 C**). Diese Ergebnisse unterstützen den postulierten Mechanismus der Nukleotid-induzierten membrannahen Proteolyse von ARTC2.2.

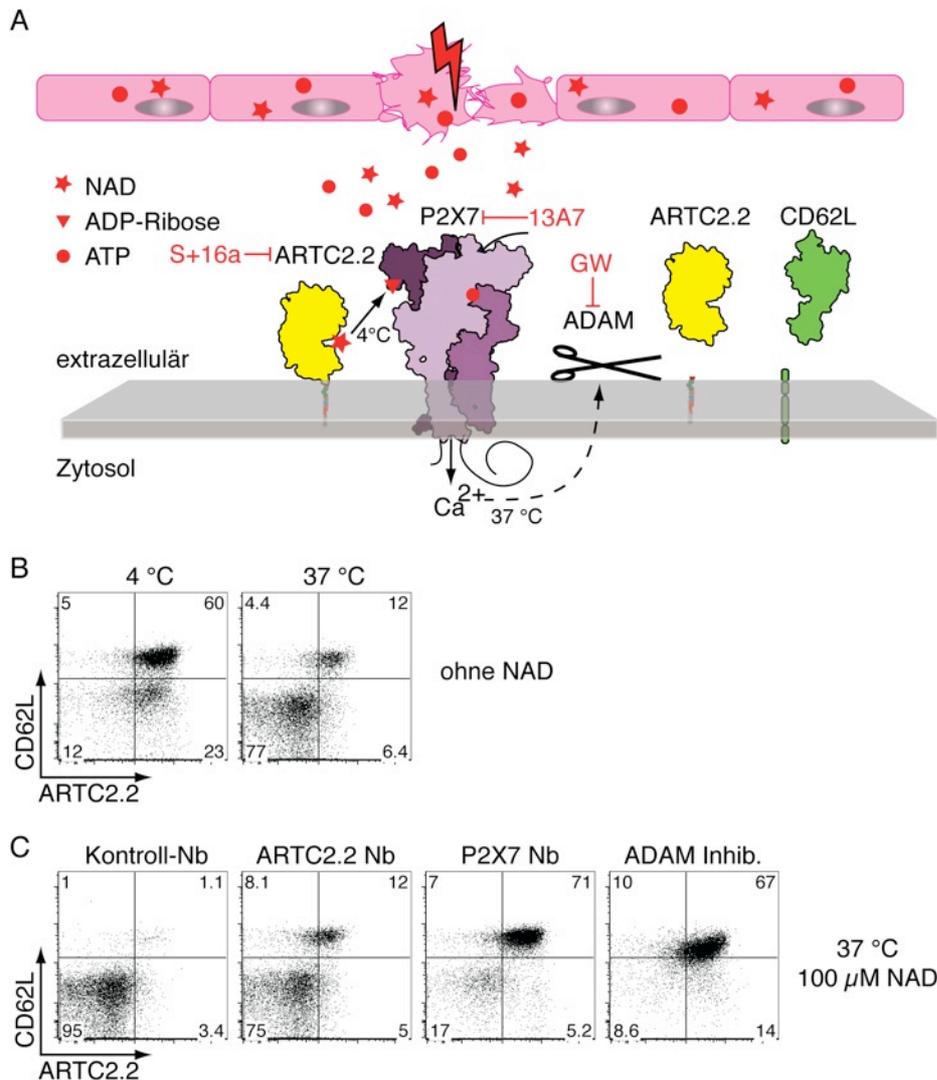


Abb. 4.1.3: Blockade von ARTC2.2, P2X7 und ADAM-Proteasen verhindert den NAD-induzierten Verlust von CD62L und ARTC2.2 von der Zelloberfläche primärer T-Zellen.

(A) Schematische Übersicht des Nukleotid-induzierten *Sheddings*. NAD und ATP werden aus beschädigten Zellen freigesetzt und können direkt (ATP) oder als Substrat für ARTC2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung (NAD) eine Aktivierung des P2X7-Ionenkanals hervorrufen, in deren Folge über eine ADAM-Protease CD62L und ARTC2.2 von der Zelloberfläche gespalten werden. Die Inhibitoren von ARTC2.2 (Nanobody s+16a), P2X7 (Nanobody 13A7) und ADAM-Proteasen (Hydroxamat-basierter Inhibitor GW280264X) können den Verlust von CD62L und ARTC2.2 von der Zellmembran verhindern. (B) Lymphknotenzellen einer BALB/c^{ARTC2B6}-Maus wurden bei 4 °C präpariert, und vor der Anfärbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen ARTC2.2, CD3 und CD62L für 30 min bei 4 °C oder 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden im Durchflusszytometer vermessen und mit der Software FlowJo ausgewertet ('gated' auf CD3+ Zellen). Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Zellpopulationen im jeweiligen Quadranten an. (C) Lymphknotenzellen einer BALB/c^{ARTC2B6}-Maus wurden wie in (B) bei 4 °C präpariert und, vor der Anfärbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern, für 30 min bei 37 °C inkubiert, jedoch hier in Anwesenheit von exogenem NAD. Vier Parallelansätze erfolgten in Anwesenheit von einem Kontroll-Nanobody (Kontroll-Nb), inhibitorischen Nanobodies gegen ARTC2.2 (ARTC2.2 Nb, s+16a) oder P2X7 (P2X7 Nb, 13A7), oder einem Hydroxamat-basierten Inhibitor von ADAM-Proteasen (ADAM Inhib., GW280264X). Die Zellen wurden wie in (B) analysiert und ausgewertet. Der nach der Präparation zugegebene ARTC2.2-inhibierende Nanobody s+16 kann (im Gegensatz zu dem im vorherigen Experiment *in vivo* applizierten Nb) die während der Präparation bei 4 °C erfolgte ADP-Ribosylierung nicht verhindern. Er kann jedoch die durch Zugabe von exogenem NAD-vermittelte weitere ADP-Ribosylierung während der Inkubation bei 37 °C blockieren. Der P2X7-Nanobody 13A7 blockiert ebenso wie der ADAM-Inhibitor den Verlust von ARTC2.2 und CD62L.

4.1.3 ARTC2.2 wird von der Zelloberfläche transfizierter Zellen gespalten

Wenn es sich bei dem Nukleotid-induzierten Verlust von ARTC2.2 um *Shedding* handelt, sollte es möglich sein, die freigesetzte ARTC2.2 im Überstand nachzuweisen. Um größere Mengen an freigesetzter ARTC2.2 zu gewinnen, wurde eine Lymphomzelllinie verwendet, die stabil mit einer ARTC2.2 mit N-terminalem FLAG-Tag transfiziert ist (DC27.10^{ARTC2.2}) (**Abb. 4.1.4**). Nach Behandlung dieser Zellen mit 1 mM ATP zeigt sich ein deutlicher Verlust der ARTC2.2-Färbung (**Abb. 4.1.4 A**). Um die ARTC2.2 im Überstand nachzuweisen, wurde die ARTC2.2 von 1x10⁹ ATP-behandelten DC27.10^{ARTC2.2}-Zellen affinitätschromatographisch mit dem M2 anti-FLAG-Antikörper aus dem Überstand aufgereinigt. Gebundene ARTC2.2 wurde durch einen pH-Shift von der M2-Affinitätssäule eluiert, über Gelfiltration umgepuffert und mittels Ultrazentrifugation eingeeengt. 10 μ l (10 % der Ausbeute) wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die Bande bei ca. 38 kD entspricht der vorhergesagten Größe von glykosylierter ARTC2.2, die Bande bei 64 kD dem als Carrier-Protein zugegebenen Albumin. Ein Vergleich mit den Markerbanden ergibt eine Schätzung für die Menge von ARTC2.2 in der 38 kD Bande von ca. 5-10 μ g (**Abb. 4.1.4 B**). Die so aufgereinigte ARTC2.2 wurde für weitere enzymatische Untersuchungen eingesetzt (**Abb. 4.1.6 und 4.2.1 - 4.2.6**).

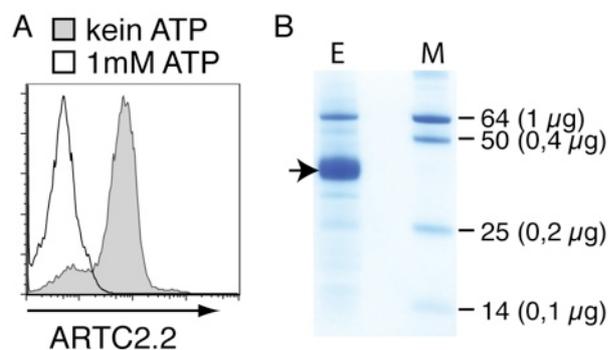


Abb. 4.1.4: Extrazelluläres ATP führt zur Spaltung von ARTC2.2 von der Zelloberfläche transfizierter Lymphomzellen.

Stabil mit FLAG-ARTC2.2 transfizierte DC27.10^{ARTC2.2}-Zellen (1 x 10⁹) wurden für 1 h bei 37 °C mit 1 mM ATP inkubiert und durch Zentrifugation vom Überstand getrennt. Je ein Aliquot der Zellen ohne und mit ATP-Behandlung wurde mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen ARTC2.2 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (**A**) Die ARTC2.2 Expression ist als Histogramm dargestellt. FLAG-ARTC2.2 wurde affinitätschromatographisch über eine Säule mit dem FLAG-spezifischen monoklonalen Antikörper M2 aufgereinigt. Gebundenes Protein wurde mit einem BSA-haltigen Puffer bei pH 2.7 eluiert. Das Eluat wurde über Gelfiltration in PBS umgepuffert und über Ultrazentrifugation aufkonzentriert. (**B**) 10 % der Retenatsfraktion aus der Elution (E) wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Der Pfeil zeigt auf die Bande in der erwarteten Größe von ca. 38 kD der extrazellulären Domäne von ARTC2.2 in glykosylierter Form. Zur relativen Quantifizierung wurden parallel definierte Mengen von Markerproteinen (M) analysiert. Die Ausbeute entspricht ca. 5-10 μ g/10⁸ Zellen.

Die proteolytisch abgestoßene ARTC2.2 wird im Folgenden mit „sARTC2.2“ (*shed* ARTC2.2) abgekürzt, die über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Membran verankerte ARTC2.2 als „GPI-ARTC2.2“.

4.1.4 Die Spaltstelle der ARTC2.2 liegt bei F239/S240 - drei Aminosäuren vor der Membranverankerung

Zur Bestimmung der Spaltstelle der sARTC2.2 nach NAD-induziertem *Shedding* wurden HEK-Zellen mit ARTC2.2 und P2X7 kotransfiziert und mit NAD und ATP behandelt. sARTC2.2 wurde aus dem Überstand der Nukleotid-behandelten HEK-Zellen wie zuvor über den FLAG-Tag mit M2-Sepharose aufgereinigt und nach Deglykosylierung mit Endoglykosidase F (Endo-F) durch SDS-PAGE aufgetrennt (**Abb. 4.1.5**). Die Bande der sARTC2.2 wurde ausgeschnitten (**Abb. 4.1.5 A**) und im Gel mit Trypsin oder Glu-C in Anwesenheit von ^{18}O -markiertem Wasser verdaut. So entstandene C-Termini können über den Einbau von ^{18}O von dem beim *Shedding* von ARTC2.2 entstandenen C-Terminus unterschieden werden. Die resultierenden Fragmente wurden mittels Massenspektrometrie (MS) analysiert. Es wurde F239 als einziger C-Terminus ohne ^{18}O -Markierung und somit F239/S240 als Spaltstelle der ARTC2.2 identifiziert. Da die Endo-F den ersten Zuckerrest der Glykosylierung nicht entfernt, konnten auch die Glykosylierungsstellen der ARTC2.2 bestimmt werden: N59 und N229.

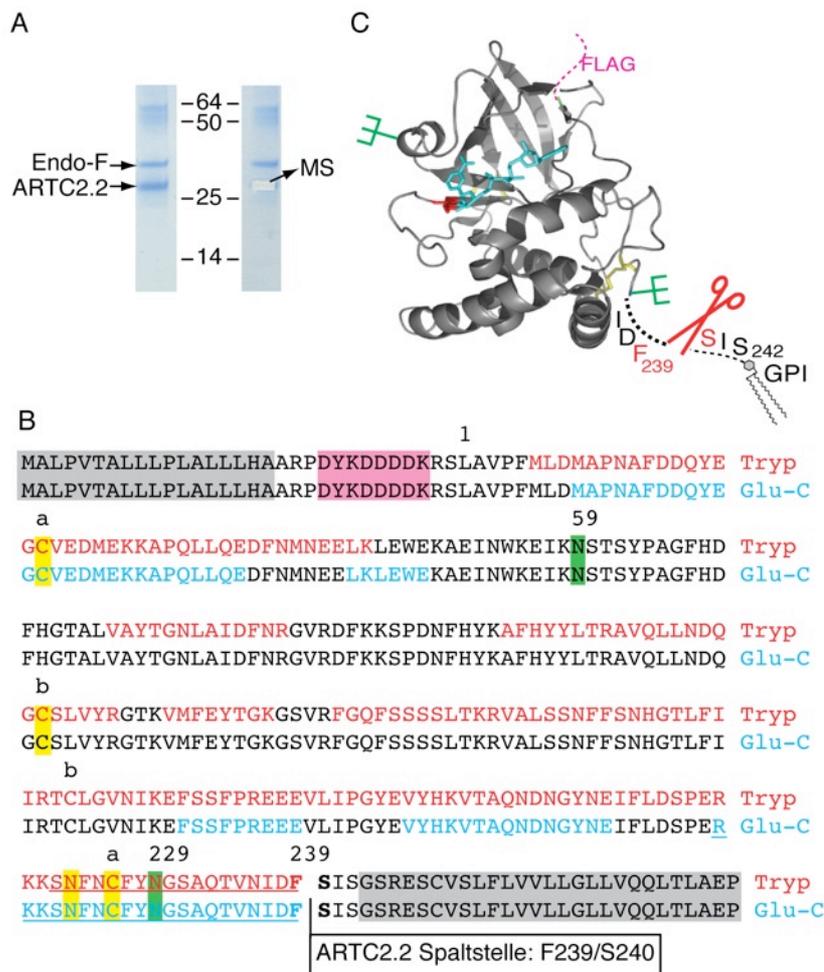


Abb. 4.1.5: ARTC2.2 wird zwischen F239 und S240 gespalten.

(A) HEK-Zellen wurden mit FLAG-ARTC2.2 und P2X7 kotransfiziert. 5 Tage nach Transfektion wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C mit je 100 µM NAD und ATP inkubiert. ARTC2.2 wurde wie in Abb. 4.1.4 aus dem Zellüberstand affinitätschromatographisch über eine M2-Säule aufgereinigt und umgepuffert. Nach Immobilisierung an 15 µl einer anti-ARTC2.2-Nanobody-Matrix wurde ARTC2.2 mit Endo-F deglykosyliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Bande in der erwarteten Größe der deglykosylierten ARTC2.2 von 29 kD wurde für die weitere Analyse mittels Massenspektrometrie (MS) ausgeschnitten. (B) Die Bande wurde im Gel mit Trypsin oder Endoproteinase Glu-C in Anwesenheit von ¹⁸O-markiertem Wasser verdaut um die so entstandenen C-Termini in der MS von dem C-Terminus zu unterscheiden, der zuvor durch *Shedding* entstanden war. Die identifizierten Peptide aus ARTC2.2 sind rot (Trypsin) bzw. blau (Glu-C) dargestellt. Die beiden Peptide, die keine ¹⁸O Markierung aufwiesen, sind unterstrichen. F239/S240 wurde somit als Spaltstelle für ARTC2.2 nach Nukleotid-induziertem *Shedding* identifiziert. N59 und N229 wurden als N-Glykosylierungsstellen identifiziert und sind grün hinterlegt. Das N-terminale Signalpeptid und die C-terminale Signalsequenz für den GPI-Anker sind grau hinterlegt. Sie werden kotranslational gespalten und sind im GPI-verankerten Protein auf der Zelloberfläche nicht enthalten. Die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen (gelb hinterlegt) sind durch Kleinbuchstaben (a, b) gekennzeichnet, der FLAG-Tag ist magentafarben dargestellt. S242 ist die prognostizierte Stelle zur Anfügung des GPI-Ankers. Die Nummerierung der Aminosäuren wurde so angepasst, dass 1 der N-terminalen Aminosäure der nativen ARTC2.2 entspricht. (C) Schematische Darstellung der posttranslationalen Modifikationen der ARTC2.2 an der 3D-Struktur der Ratten-ARTC2.2 (PDB-id: 1og3). Die die proteolytische Spaltstelle flankierenden Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. Die beiden N-gekoppelten Glykosylierungen sind als grüne Gabeln dargestellt. Die Disulfidbrücken sind gelb, der N-terminale FLAG-tag und der C-terminale GPI-Anker sind schematisch dargestellt. Das im aktiven Zentrum gebundene NAD ist cyanfarben, die katalytische Glutaminsäure rot dargestellt. Die Produktion und Aufreinigung der ARTC2.2 wurden von Marion Nissen und Joanna Schmid durchgeführt. Die Bestimmung der Spaltstelle erfolgte durch Thomas Jakoby und Andreas Tholey aus dem Institut für experimentelle Medizin der CAU Kiel.

4.1.5 *Durch Shedding freigesetzte ARTC2.2 (sARTC2.2) ADP-ribosyliert sezernierte Proteine, aber nicht Membranproteine*

Es wurde beschrieben, dass die nach PMA-Stimulation freigesetzte ARTC2.2 enzymatisch aktiv ist (Kahl *et al*, 2000). Um zu überprüfen, ob die ARTC2.2 ebenfalls nach Nukleotid-induziertem *Shedding* aktiv ist und welche löslichen oder zellgebundenen Proteine die sARTC2.2 in diesem Fall ADP-ribosylieren kann, wurde ein ADP-Ribosylierungs-Assay mit radioaktiv markiertem NAD durchgeführt (**Abb. 4.1.6**). Hierbei wurden DC27.10-Lymphomzellen verwendet, die entweder stabil mit GPI-ARTC2.2 transfiziert waren (GPI) oder untransfiziert blieben, dafür aber mit löslicher sARTC2.2 versetzt wurden. Nach Zugabe von ³²P-NAD und Inkubation für 15 min bei 37 °C wurden die Zellen vom Überstand durch Zentrifugation getrennt und die Membranproteine mit Triton-X 100 in Lösung gebracht. Die solubilisierten Membranproteine (m) und die Proteine aus dem Zell-Überstand (ü) wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Nach Trocknung des Gels wurde kovalent (SDS-resistent) in Protein inkorporierte ³²P-ADP-Ribose mittels Autoradiographie detektiert. Die Ergebnisse zeigen im Falle der GPI-verankerten ARTC2.2 mehrere radioaktiv markierte (³²P-ADP-ribosylierte) Membranproteine, aber nur wenige schwach markierte Proteine aus dem Überstand (**Abb. 4.1.6 A, Spuren 1, 2**). sARTC2.2 zeigt keine nachweisbare Aktivität an Membranproteinen, aber eine stärkere Aktivität an Proteinen aus dem Überstand (**Abb. 4.1.6 A, Spuren 3, 4**). Auch in Anwesenheit von Mausserum zeigt sARTC2.2 keine Aktivität an Membranproteinen (**Abb. 4.1.6, B, Spuren 3, 4**) und ein um nur wenige Banden erweitertes Spektrum an löslichen Zielproteinen. Auch die GPI-verankerte ARTC2.2 zeigt in Anwesenheit von Serum nur ein leicht erweitertes Spektrum an löslichen Zielproteinen (**Abb. 4.1.6, B**). Im Serum allein zeigt sich ein ähnlich begrenztes Muster an Zielproteinen für die sARTC2.2 (**Abb. 4.1.6, B, Spur 5**). Diese Ergebnisse zeigen, dass die ARTC2.2 nach Nukleotid-induziertem *Shedding* als aktives Enzym freigesetzt wird und eine neue Substratspezifität entwickelt: weg von Membranproteinen hin zu einem begrenzten Spektrum an sezernierten Proteinen.

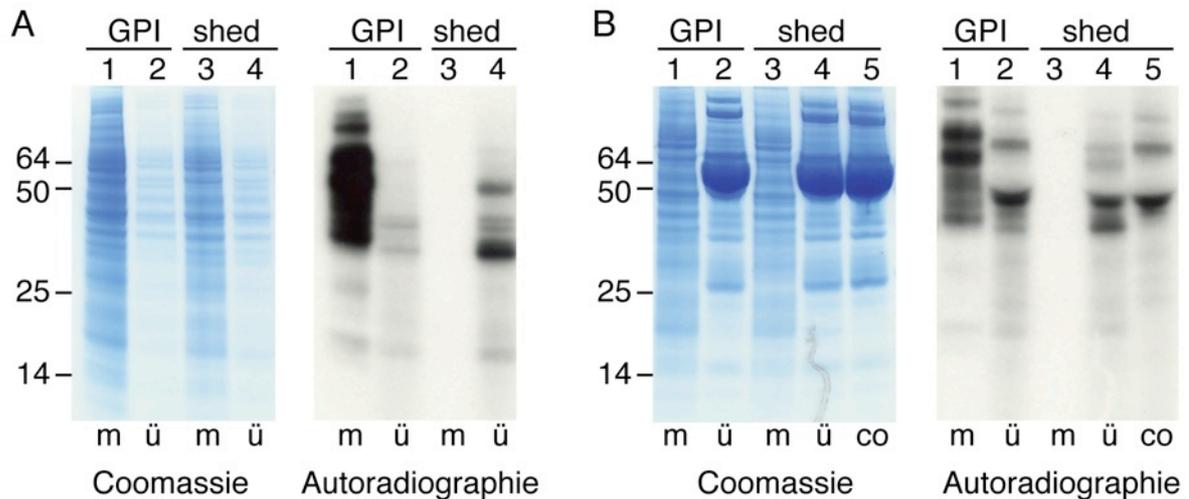


Abb. 4.1.6: Durch *Shedding* freigesetzte ARTC2.2 (sARTC2.2) ADP-ribosyliert sezernierte Proteine, nicht aber membranständige Proteine.

Zum Nachweis ADP-ribosylierter Proteine wurden ARTC2.2-transfizierte sowie untransfizierte DC27.10-Zellen für 15 min mit ^{32}P -NAD inkubiert (je 4×10^5 Zellen in $40 \mu\text{l}$). Die stabil mit ARTC2.2 transfizierten Zellen exprimieren die GPI-verankerte ARTC2.2 auf der Zelloberfläche (GPI, Spuren 1 und 2). Den untransfizierten Zellen wurde wie in Abb. 4.1.4 aufgereinigte, durch *Shedding* freigesetzte ARTC2.2 zugesetzt (shed, Spuren 3, 4). Nach der Inkubation mit ^{32}P -NAD ($1 \mu\text{M}$) wurden Zellen und Überstand (ü) durch Zentrifugation getrennt. Nach viermaligem Waschen der Zellen wurden die Membranproteine (m) mit Triton X-100 solubilisiert und durch Zentrifugation von Zelltrümmern befreit. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. ^{32}P -ADP-ribosylierte Proteine wurden mittels Autoradiographie durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert. Je Spur wurden 50 % des Zellüberstandes bzw. des Zelllysates analysiert. **(A)** Die Inkubation der Zellen wurde in Medium ohne Zusätze durchgeführt. **(B)** Dem Medium wurden 2,5 % Mausserum zugegeben. Als weitere Kontrolle wurde das serumhaltige Medium (ohne Zellen) mit sARTC2.2 und ^{32}P -NAD inkubiert (Spur 5, co). Die in der Coomassie-Färbung in (A) sichtbaren Proteine im Überstand (ü) wurden von den Zellen offensichtlich während der Inkubation freigesetzt. Die in diesem Experiment verwendete Menge an NAD ($1 \mu\text{M}$) induziert kein oder nur wenig *Shedding*.

4.2 sARTC2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung von Interferon- γ (IFN- γ)

ADP-Ribosylierung ist eine posttranslationale Modifizierung, in der eine 540 Da große ADP-Ribose-Gruppe auf das Zielmolekül übertragen wird. Diese Modifikation ändert sowohl die sterischen Eigenschaften als auch die Ladung der modifizierten Aminosäure (Laing *et al*, 2010). ADP-Ribosylierung wurde zunächst als Pathomechanismus von Toxinen entdeckt, über den die biologische Funktion von Zielproteinen inhibiert wird (Laing *et al*, 2010) (Menzel *et al*, 2013). Somit ist es vorstellbar, dass die durch sARTC2.2 katalysierte ADP-Ribosylierung die Funktion der löslichen Zielproteine verändert.

4.2.1 sARTC2.2 ADP-ribosyliert einige Zytokine, bevorzugt IFN- γ

Die veränderte Substratspezifität von ARTC2.2 nach proteolytischer Spaltung wirft die Frage nach möglichen physiologischen Zielproteinen für die sARTC2.2 auf. Da die ARTC2.2 auf T-Zellen exprimiert wird (Koch-Nolte *et al*, 1996) und nach proteolytischer Freisetzung primär lösliche Proteine ADP-ribosyliert (**Abb. 4.1.6**), wurden einige Zytokine als mögliche Zielproteine für die sARTC2.2 untersucht (**Abb. 4.2.1**). Hierzu wurden 11 rekombinante Zytokine (in aufsteigendem Molekulargewicht: Rantes, MCP-1, IL-5, IFN- γ , IL-17, TNF α , IL-2, IL-1 α , IL1- β , IL-6, und IL-12) entweder separat oder in einer Mixtur mit ^{32}P -NAD und sARTC2.2 inkubiert, und mittels SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Autoradiographie analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass folgende Zytokine von sARTC2.2 ADP-ribosyliert werden: MCP-1, IFN- γ , IL-17, TNF α , IL-2, IL1- β , IL-6, und IL-12. Die stärkste Markierung mit ^{32}P -ADP-Ribose ist für IFN- γ zu sehen, sowohl bei einzelner ADP-Ribosylierung (**Abb. 4.2.1 A**) als auch im Mix der Zytokine (**Abb. 4.2 B**). Auch in Anwesenheit von Mausserum wird IFN- γ von ARTC2.2 präferentiell ADP-ribosyliert (**Abb. 4.2.1 C**). Zur besseren Darstellung wurde für den ADP-Ribosylierungsansatz mit Mausserum eine nicht reduzierende SDS-PAGE durchgeführt. IFN- γ läuft hier als Dimer bei ca. 30 kD. Die deutliche Markierung des IFN- γ -Dimers zeigt zum einen, dass ADP-Ribosylierung die Dimerisierung nicht beeinflusst und zum anderen, dass dimerisiertes IFN- γ ADP-ribosyliert werden kann. Obwohl IFN- γ nur einen kleinen Bruchteil der gesamten Proteinmenge darstellt (**Abb. 4.2.1 C**, Coomassie-Färbung) fällt ein Großteil der ADP-Ribosylierungsaktivität der sARTC2.2 auf IFN- γ (C, Autoradiographie).

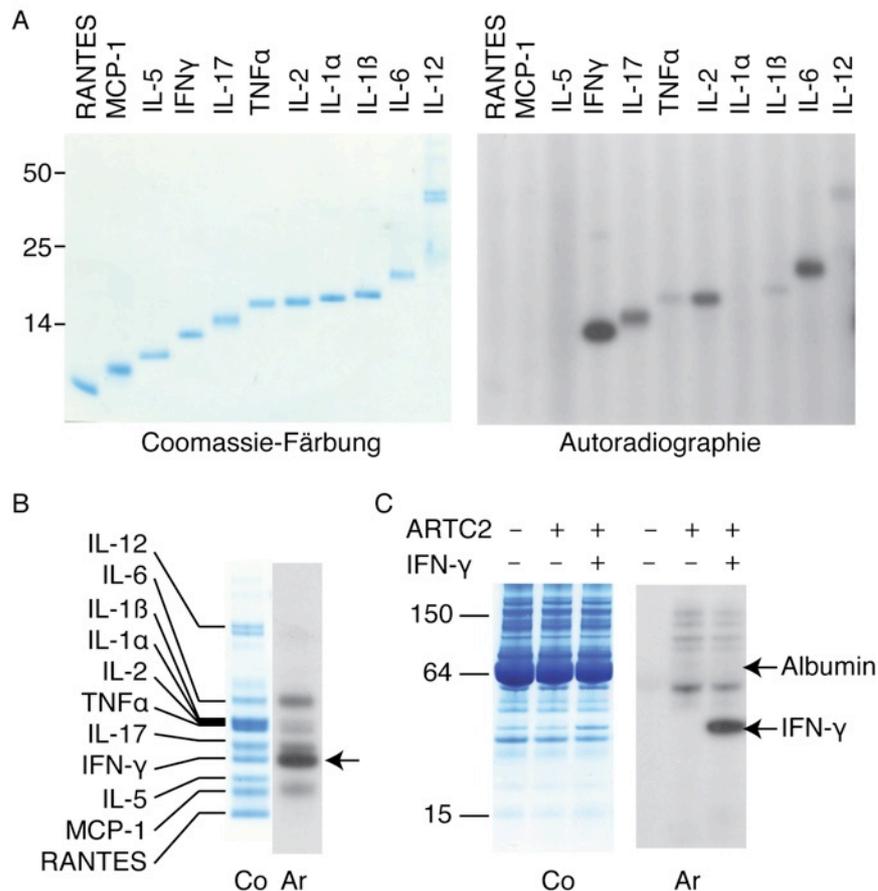


Abb. 4.2.1: sARTC2.2 ADP-ribosyliert bevorzugt Interferon- γ .

Rekombinante Zytokine wurden entweder **(A)** einzeln oder **(B)** im Mix mit ^{32}P -NAD und sARTC2.2 für 15 min bei 37 °C inkubiert. **(C)** Mausserum wurde in An- oder Abwesenheit von IFN- γ mit ^{32}P -NAD und sARTC2.2 für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Co). ^{32}P -ADP-ribosylierte Proteine wurden mittels Autoradiographie (Ar) detektiert. Die SDS-PAGE in (C) erfolgte unter nichtreduzierenden Bedingungen.

4.2.2 Die durch sARTC2.2 katalysierte ADP-Ribosylierung von IFN- γ ist reversibel

Zur weiteren Untersuchung der ADP-Ribosylierung von IFN- γ wurde IFN- γ für 2 h mit 50 μM und 50 ng sARTC2.2 quantitativ ADP-ribosyliert und die Vollständigkeit der Reaktion untersucht. Dazu wurde dem vor-ADP-ribosylierten IFN- γ noch einmal für 15 min sARTC2.2 und ^{32}P -NAD zugesetzt. Die nachträgliche ADP-Ribosylierung wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie analysiert. Zum Vergleich wurde ein Aliquot von IFN- γ parallel nur mit NAD aber ohne sARTC2.2 vorinkubiert und dann ebenfalls noch einmal für 15 min mit sARTC2.2 und ^{32}P -NAD weiter inkubiert. Nicht vor-ADP-ribosyliertes IFN- γ zeigt eine starke radioaktiv markierte Bande, während vor-ADP-ribosyliertes IFN- γ kaum noch weiter radioaktiv markiert werden konnte **(Abb. 4.2.2 A)**. Dies deutet darauf hin, dass unter diesen

experimentellen Bedingungen eine nahezu vollständige ADP-Ribosylierung erreichbar ist.

Die ADP-Ribosylierung durch ARTC2.2 kann durch die ADP-Ribosyl-Hydrolase 1 (ARH1) rückgängig gemacht werden (Moss *et al*, 1992; Koch-Nolte *et al*, 2008). Zur Analyse einer möglichen de-ADP-Ribosylierung von IFN- γ durch ARH1 wurde zuvor ADP-ribosyliertes IFN- γ für 1 h mit ARH1 inkubiert und die erscheinenden Molekularmassen in der SDS-PAGE miteinander verglichen. Es ist eine deutliche Verschiebung des Migrationsverhalten von ADP-ribosyliertem IFN- γ (Spur 2) zu unmodifiziertem IFN- γ (Spur 1) zu sehen. Diese Verschiebung zu einer höher erscheinenden Molekularmasse des IFN- γ nach ADP-Ribosylierung wurde durch Zugabe der ARH1 nahezu vollständig auf das Niveau des unmodifizierten IFN- γ zurückgeführt (**Abb. 4.2.2 B**).

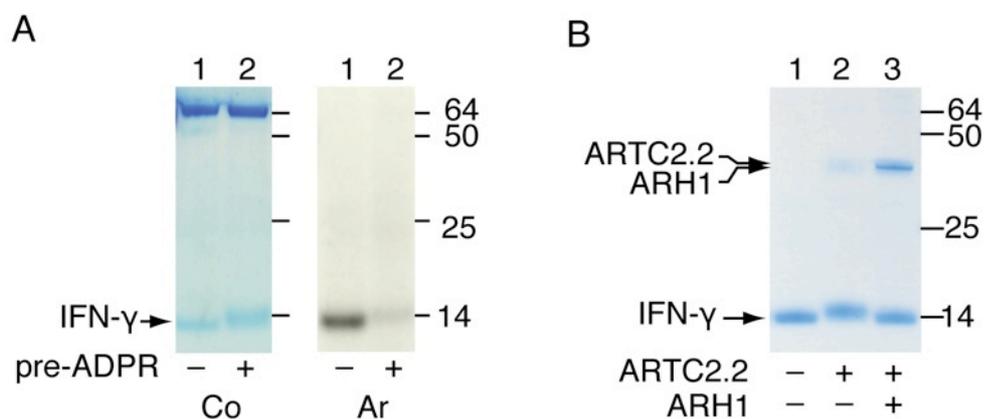


Abb. 4.2.2: Die durch sARTC2.2 katalysierte ADP-Ribosylierung von IFN- γ ist reversibel.

(A) Rekombinantes IFN- γ wurde für 2 h bei 37 °C mit 50 μ M NAD inkubiert. Ein Ansatz erfolgte in Abwesenheit (Spur 1), einer in Anwesenheit von sARTC2.2 (Spur 2). BSA wurde als Carrier-Protein hinzugefügt. Um zu ermitteln, ob die ADP-Ribosylierung von IFN- γ unter diesen Bedingungen bereits vollständig erfolgte, wurde beiden Ansätzen 32 P-NAD und zusätzliche sARTC2.2 zugegeben und 15 min bei 37 °C weiter inkubiert. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Co). 32 P-ADP-ribosyliertes IFN- γ wurde mittels Autoradiographie durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert (Ar). **(B)** Rekombinantes IFN- γ wurde 1 h bei 37 °C mit sARTC2.2 und 50 μ M NAD inkubiert. Der Ansatz wurde geteilt und ohne (Spur 2) oder mit rekombinanter ADP-Ribosyl-Hydrolase (ARH1) (Spur 3) 1 h bei 37 °C weiter inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz von IFN- γ ohne ARTC2.2 und ARH1 inkubiert. Die apparente Molekularmasse des IFN- γ wurde über SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

4.2.3 IFN- γ wird an R128 ADP-ribosyliert

IFN- γ enthält acht mögliche Arginine als Akzeptoraminosäuren für die ADP-Ribosylierung durch ARTC2.2. Davon befinden sich vier an dem für die biologische Aktivität wichtigen C-Terminus (Griggs *et al*, 1992). Eine Bestimmung von ADP-Ribosylierungsstellen kann durch Massenspektrometrie erfolgen, z. B. indem ausgenutzt wird, dass das ADP-ribosylierte Arginin ein anderes Fragmentierungsmuster aufweist oder zu Ornithin konvertiert wird, und einen vom Arginin abweichenden m/z-Wert erhält (Oetjen *et al*, 2009; Laing *et al*, 2010).

Für die Bestimmung der ADP-Ribosylierungsstelle wurde IFN- γ wie im vorherigen Abschnitt beschrieben ADP-ribosyliert und über SDS-PAGE aufgereinigt. Die Coomassie gefärbte Bande des IFN- γ wurde ausgeschnitten (**Abb. 4.2.3 A**). Nach In-Gel-Verdau mit Chymotrypsin oder Glu-C wurden die resultierenden Peptide massenspektrometrisch analysiert. Nur das C-terminale Peptid RKRKRSRC enthielt das typische Fragmentierungsmuster des ADP-Ribose-Carbodiimids (**Abb. 4.2.3 A**). Dieses Peptid konnte ferner aufgrund der Konversion des ADP-ribosylierten Arginins zu Ornithin als ADP-ribosyliertes Fragment bestimmt werden. Eine weitere massenspektrometrische Auftrennung dieses Peptides ergab, dass diese Konversion von Arginin zu Ornithin an R128 stattfand und identifizierte somit R128 als ADP-Ribosylierungsstelle (**Abb. 4.3.2 D**). Diese ADP-Ribosylierungsstelle befindet sich in einem Cluster von positiv geladenen Aminosäuren mit vier Argininen (Abb. 4.2.3 B). Auch für andere Zielproteine wurden die Zielarginine in Bereiche kartiert, in denen mehrere (oft doppelte) Arginine enthalten sind (Laing *et al*, 2010).

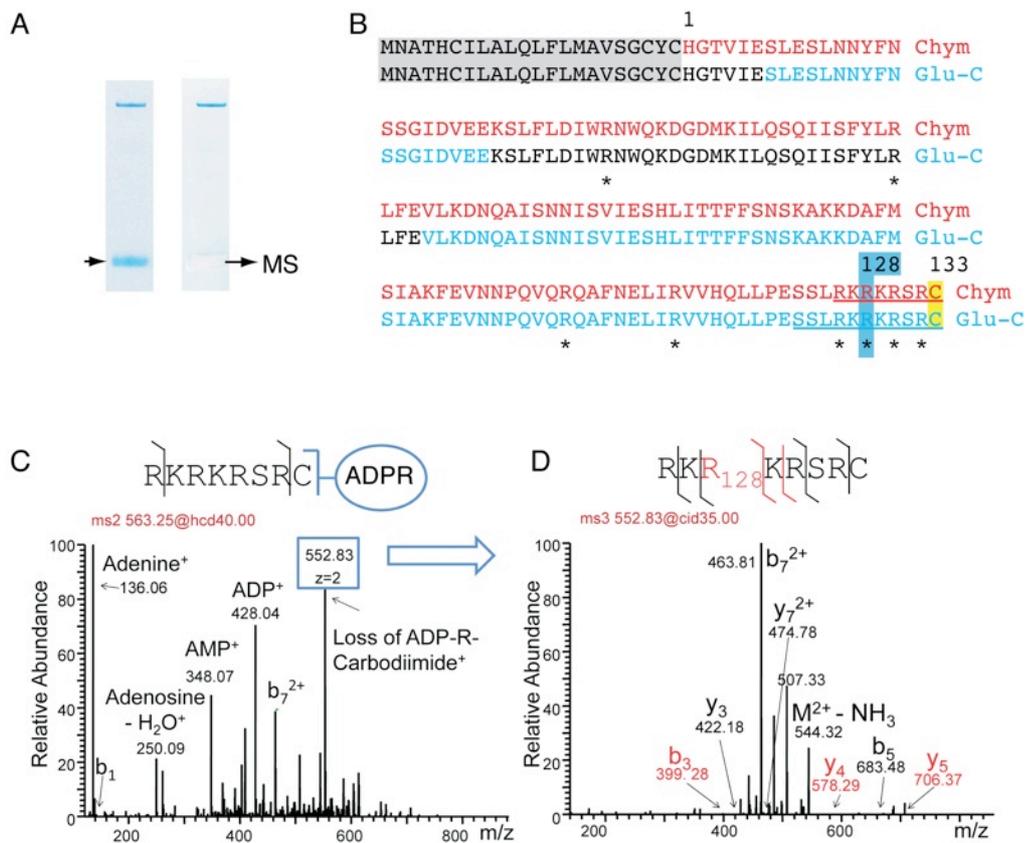


Abb. 4.2.3: sARTC2.2 ADP-ribosyliert IFN- γ an Arginin 128.

(A) Rekombinantes IFN- γ wurde für 1 h mit 10 μ M NAD und löslicher ARTC2.2 (und BSA als Carrier-Protein) inkubiert. Die Proteine wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die ADP-ribosyliertes IFN- γ enthaltende Bande wurde für die MS-Analyse ausgeschnitten. **(B)** Die Bande wurde im Gel mit Chymotrypsin oder Endoprotease Glu-C verdaut und massenspektrometrisch untersucht. Identifizierte Peptide des Chymotrypsin-Verdau sind rot, die des Glu-C Verdau blau markiert. Arginine wurden als potentielle ADP-Ribosylierungsstellen mit einem Stern markiert (*). Die beiden Peptide, die eine für ADP-Ribosylierung charakteristische Fragmentierung aufwiesen, sind unterstrichen. Die ADP-Ribosylierungsstelle R128 ist blau hinterlegt, das C-terminale C133, das die Dimerisierung des IFN- γ bedingt, ist gelb hinterlegt. **(C)** Das HCD-MS²-Spektrum des ADP-Ribose beinhaltenden C-terminalen Peptides aus IFN- γ nach Chymotrypsin Verdau zeigt das charakteristische Fragmentierungsmuster ADP-ribosylierter Peptide. Der höchste Peak steht für ein Fragment, das aus der Konversion von Arginin-ADP-Ribose zu Ornithin entstanden ist. **(D)** MS³-CID Spektrum des Ornithin enthaltenden Peptides aus dem MS²-Ansatz. Die Umwandlung von ADPR-Arginin zu Ornithin bei R128 identifiziert diese Position eindeutig als ADP-Ribosylierungsstelle. Der In-Gel-Verdau sowie die massenspektrometrischen Analysen und Auswertungen wurden von Tomas Koudelka und Andreas Tholey aus dem Institut für experimentelle Medizin der CAU Kiel durchgeführt.

4.2.4 Bindung an den Interferon- γ -Rezeptor verhindert die ADP-Ribosylierung von IFN- γ durch sARTC2.2

Da beschrieben wurde, dass der C-Terminus des IFN- γ an der Rezeptorbindung beteiligt ist (Griggs *et al*, 1992; Szente & Johnson, 1994), wurde untersucht, ob Rezeptorbindung und ADP-Ribosylierung miteinander konkurrieren. Hierfür wurde IFN- γ mit oder ohne einer löslichen Form des Interferon- γ -Rezeptors 1 (IFNGR1) für 30 min vorinkubiert und anschließend mit sARTC2.2 und ^{32}P -NAD weiter inkubiert (**Abb. 4.2.4**). Die Ergebnisse zeigen, dass die Vorinkubation mit dem IFNGR1 die ADP-Ribosylierung von IFN- γ vollständig blockiert und dass der IFNGR1 selbst nicht ADP-ribosyliert wird. Dies ist sowohl in PBS als Reaktionspuffer (**Abb. 4.2.4, A**) als auch in Anwesenheit von Mausserum (**Abb. 4.2.4, B**) gültig. Diese Ergebnisse deuten auf eine räumliche Nähe von Rezeptorbindungs- und ADP-Ribosylierungsstelle im IFN- γ .

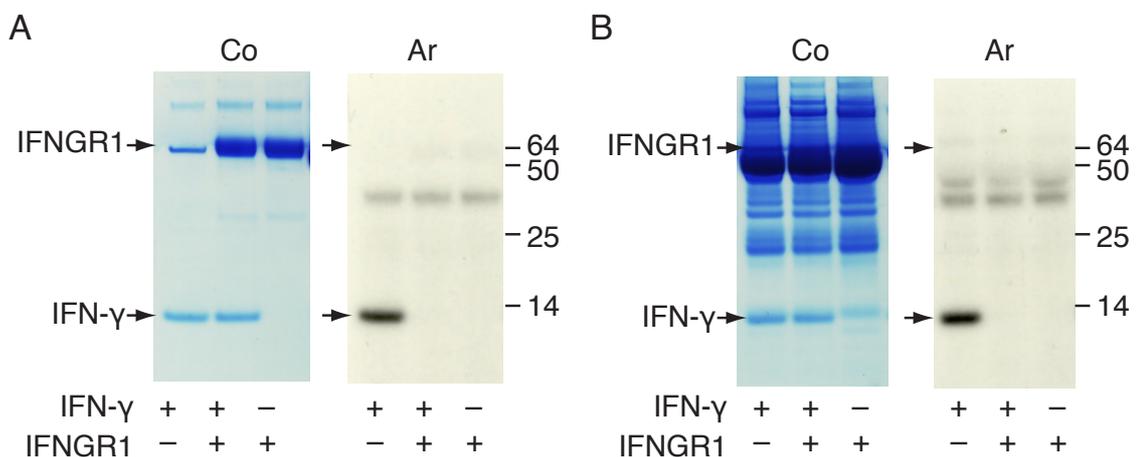


Abb. 4.2.4: Eine lösliche Form des IFN- γ -Rezeptor 1 (IFNGR1) blockiert die ADP-Ribosylierung von IFN- γ durch sARTC2.2.

IFN- γ wurde in An- oder Abwesenheit von rekombinantem IFNGR1 für 30 min vorinkubiert und anschließend für 15 min mit ^{32}P -NAD und sARTC2.2 (mit BSA als Carrier) weiter inkubiert. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Co). ADP-ribosylierte Proteine wurden mittels Autoradiographie (Ar) detektiert. Die Pfeile zeigen die Höhe der Banden von IFNGR1 und IFN- γ . Die Inkubationen in (**A**) wurden in PBS ohne weitere Zusätze durchgeführt. In (**B**) wurden dem Reaktionspuffer PBS 2,5 % Mausserum zugefügt.

4.2.5 ADP-Ribosylierung inhibiert die Funktion von IFN- γ

Die ADP-Ribosylierungsstelle am C-Terminus und die Inhibition der ADP-Ribosylierung durch die Bindung an den Rezeptor deuten auf eine sterische Nähe von Rezeptorbindung und ADP-Ribosylierungsstelle hin und führen zu der Frage, ob ADP-Ribosylierung auch die biologische Aktivität von IFN- γ beeinflusst. IFN- γ , ursprünglich „*macrophage-activating factor*“ genannt, wirkt auf Makrophagen nach Rezeptorbindung über die Phosphorylierung von STAT1 (Darnell *et al*, 1994; Darnell, 1997; Schroder *et al*, 2004). Zur Untersuchung, ob die ADP-Ribosylierung die Funktion von IFN- γ beeinflusst, wurde die IFN- γ -induzierte STAT1-Phosphorylierung in primären Makrophagen untersucht. Hierzu wurden Peritonealmakrophagen aus C57BL/6-Mäusen gewonnen und mit unterschiedlichen Konzentrationen von nichtmodifiziertem und ADP-ribosyliertem IFN- γ stimuliert. Das IFN- γ wurde hierfür sowohl durch Inkubation mit sARTC2.2 und NAD ADP-ribosyliert (ADPR-IFN- γ) als auch nach ADP-Ribosylierung anschließend durch Inkubation mit ARH1 wieder de-ADP-ribosyliert (de-ADPR-IFN- γ). Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD11b und Phospho-STAT1 angefärbt, und die Phosphorylierung von STAT1 der CD11b-positiven Zellen (Makrophagen) im Durchflusszytometer analysiert (**Abb. 4.2.5**). Die Titrationsanalysen zeigen, dass für eine pSTAT1-Phosphorylierung im dynamischen Bereich zwischen 0,3 und 10 U/ml 3- bis 5-fach höhere Konzentrationen an ADP-ribosyliertem IFN- γ benötigt werden als von unmodifiziertem oder de-ADP-ribosyliertem IFN- γ . Die Kurven von IFN- γ und de-ADPR-IFN- γ überlagern sich nahezu vollständig. Dieses Ergebnis zeigt, dass die biologische Wirkung von IFN- γ durch ADP-Ribosylierung inhibiert wird, und dass dieser Effekt durch de-ADP-Ribosylierung reversibel ist.

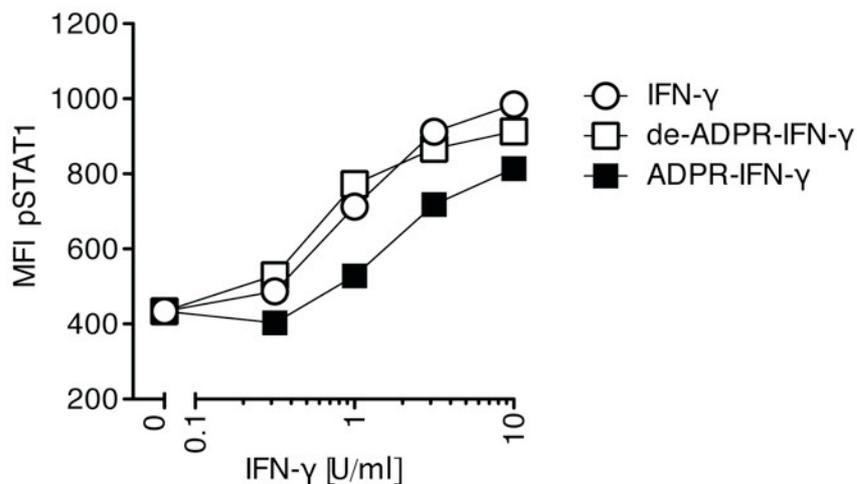


Abb. 4.2.5: ADP-Ribosylierung inhibiert die IFN- γ -induzierte Phosphorylierung von STAT1 in Peritonealmakrophagen.

IFN- γ wurde wie in Abb. 4.2.2 (B) durch sequenzielle Inkubation mit ARTC2.2 und ARH1 ADP-ribosyliert und de-ADP-ribosyliert. Makrophagen aus C57BL/6-Mäusen wurden durch Peritoneal-Lavage gewonnen. Aliquots der Zellen wurden für 30 min bei 37 °C in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an IFN- γ , ADP-ribosyliertem IFN- γ (ADPR-IFN- γ) oder de-ADP-ribosyliertem IFN- γ (de-ADPR-IFN- γ) inkubiert. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert und gegen CD11b angefärbt. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert, mit einem anti-pSTAT1-Antikörper angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der pSTAT1-Anfärbung der CD11b-positiven Zellen. Die Präparation sowie die Stimulation und durchflusszytometrische Analyse der Makrophagen wurden von Björn Rissiek durchgeführt.

Eine weitere Wirkung von IFN- γ ist die Induktion der Komponenten des Immunproteasoms β 5i (auch LMP7 genannt) und PA28- α (Boehm *et al*, 1997; Seifert *et al*, 2010). Die Induktion dieser Faktoren wurde in kultivierten, differenzierten murinen Podozyten analysiert, die für 24 h mit IFN- γ stimuliert wurden. Das IFN- γ wurde entweder unmodifiziert (IFN- γ), ADP-ribosyliert (ADPR-IFN- γ) oder nach ADP-Ribosylierung de-ADP-ribosyliert (de-ADPR-IFN- γ) eingesetzt. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die proteasomalen Faktoren β 5i und PA28- α im Western-Blot untersucht (**Abb. 4.2.6**). Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Induktion von β 5i und PA28- α nach Stimulation mit IFN- γ (Spur 2). Diese Banden sind nach Behandlung der Zellen mit ADP-ribosyliertem IFN- γ deutlich schwächer (Spur 3), nach Behandlung der Zellen mit de-ADP-ribosyliertem IFN- γ ähnlich stark wie bei der Behandlung mit unmodifiziertem IFN- γ (Spur 4 vs. Spur 2).

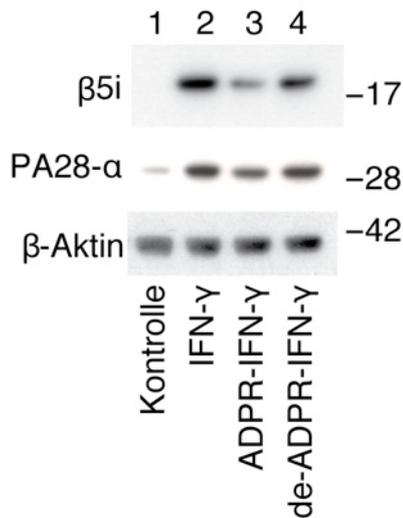


Abb. 4.2.6: ADP-Ribosylierung inhibiert die IFN- γ -induzierte Induktion des Immunproteasoms in Podozyten.

IFN- γ wurde (wie in Abb. 4.2.2 B) durch sequenzielle Inkubation mit ARTC2.2 und ARH1 ADP-ribosyliert und de-ADP-ribosyliert. Differenzierte murine Podozyten wurden für 24 kultiviert: ohne IFN- γ (Kontrolle, Spur1), mit IFN- γ (Spur 2), ADP-ribosyliertem IFN- γ (ADPR-IFN- γ , Spur 3) oder de-ADP-ribosyliertem IFN- γ (de-ADPR-IFN- γ , Spur 4) (50 U/ml). Die Zellen wurden geerntet und mit detergenshaltigem Reagenz TPER lysiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation entfernt und die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und für eine Western-Blot-Analyse auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion der Immunproteasom-Proteine β 5i und PA28- α sowie von β -Aktin (als Ladekontrolle) erfolgte mit spezifischen Primärantikörpern, Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern und Chemilumineszenz-Verfahren. Die Inkubation der Zellen und die Durchführung des Western-Blots erfolgte durch Catherine Meyer-Schwesinger (III. Medizinische Klinik und Poliklinik, UKE).

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass IFN- γ ein bevorzugtes Ziel der nach Nukleotid-induziertem *Shedding* freigesetzten ARTC2.2 ist und die ADP-Ribosylierung von IFN- γ dessen Aktivität reversibel inhibiert.

4.3 Herstellung und Charakterisierung ADAM17-spezifischer Antikörper

In diesem Abschnitt wird die Herstellung und Charakterisierung ADAM17-spezifischer Antikörper gezeigt. ADAM17 ist eine Zelloberflächenprotease, die für die Freisetzung wichtiger immunologischer Regulatoren wie TNF α und CD62L verantwortlich ist (Peschon *et al*, 1998; Murphy, 2008). Für die nähere Charakterisierung der Aktivierung von ADAM17 und ihrer Bedeutung in immunologischen Vorgängen sind spezifische Antikörper nützlich. Hierfür wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt: Immunisierung eines Kaninchens zur Generierung eines polyklonalen Antikörpers und Immunisierung zweier Lamas zur Generierung monoklonaler Einzelkettenantikörper mittels Phagen-Display-Technologie. Ein Vorteil der Klonierung rekombinanter Antikörperfragmente ist die einfache und ergiebige Produktion in pro- oder eukaryotischen Zellkulturen sowie die einfache Reformatierung mittels Klonierung (Wesolowski *et al*, 2009).

4.3.1 Immunisierung des Kaninchens K133 und der Lamas 540 und 541

ADAM17 ist ein Multidomänenprotein, bestehend aus einer inhibitorischen Prodomäne (Pro, Aminosäuren 1-204) (die bei der Reifung zur murenen Form abgespalten wird), einer katalytischen Domäne (Kat 205-455), einer Disintegrandomäne (Dis 456-560), einer Membran-proximalen-Domäne (MPD 561-653), einer Transmembrandomäne (TM 654-675) und einer zytosolischen Domäne (Zyt 676-806) (**Abb. 4.3.1** und **Anhang Abb. 6.2.2**). Für die Immunisierungen und späteren Charakterisierungen der Antikörper wurden folgende Expressionskonstrukte verwendet: murine Vollängen-cDNA, zwei Konstrukte für murine katalytische Domäne mit Prodomäne (Kat-Pro) sowie ein Konstrukt für humane Kat-Pro, die jeweils C-terminal an einem Hexahistidin-Tag fusioniert waren. Die Konstrukte für die murine Kat-Pro unterscheiden sich darin, dass in einem der beiden Konstrukte die Glykosylierungsstellen an N246 durch Mutation von Serin 248 zu Alanin und an N434 durch Mutation von Asparagin 434 zu Glutamin entfernt wurden. Das humane Konstrukt für ADAM17 Kat-Pro enthielt diese Mutationen ebenfalls. Für die späteren Charakterisierungen der Antikörper wurde das murine Konstrukt mit den Glykosylierungsstellen verwendet. Neben diesen Expressionsvektoren wurden für die Charakterisierungen der Antikörper auch kommerziell erhältliche rekombinante ADAM17-Proteine eingesetzt. Die in den jeweiligen Konstrukten enthaltenen ADAM17-Domänen sind in Abb. 4.3.1 A+B

dargestellt. Die Prodomänen der kommerziellen ADAM17-Proteine sind in den Expressionsvektoren enthalten gewesen, aber in den aufgereinigten Proteinen vermutlich nur in geringen Konzentrationen vorhanden. In den Expressionsvektoren sind die Prodomänen ebenfalls enthalten; es ist möglich, dass ein Anteil des exprimierten Proteins die Prodomäne durch Furin-vermittelte Proteolyse bereits verloren hat (Schlöndorff *et al*, 2000).

Die Immunisierung erfolgte mit den Expressionsvektoren für humane und murine ADAM17 Kat-Pro, die letzte Booster-Immunisierung erfolgte mit rekombinantem Protein, aufgereinigt aus dem Überstand von HEK-Zellen nach Transfektion mit denselben Expressionsvektoren (Abb. 4.3.1 C). Das Kaninchen wurde zwei Wochen nach der letzten Booster-Immunisierung entblutet und aus dem Immuserum wurde der polyklonale Antikörper K133 aufgereinigt. Den beiden Lamas wurde 4-8 Tage nach der letzten Booster-Immunisierung Blut entnommen, um aus den peripheren Blutlymphozyten (PBL) RNA für die Klonierung von Phagen-Display-Bibliotheken zu präparieren. Die RNA wurde in cDNA transkribiert, die für Nanobodies (die variable Domäne der Schwere-Ketten-Antikörper) kodierende Region wurde mittels PCR amplifiziert und in einen Phagen-Display-Vektor kloniert (s. Abschnitt 3.1.1-3.1.2).

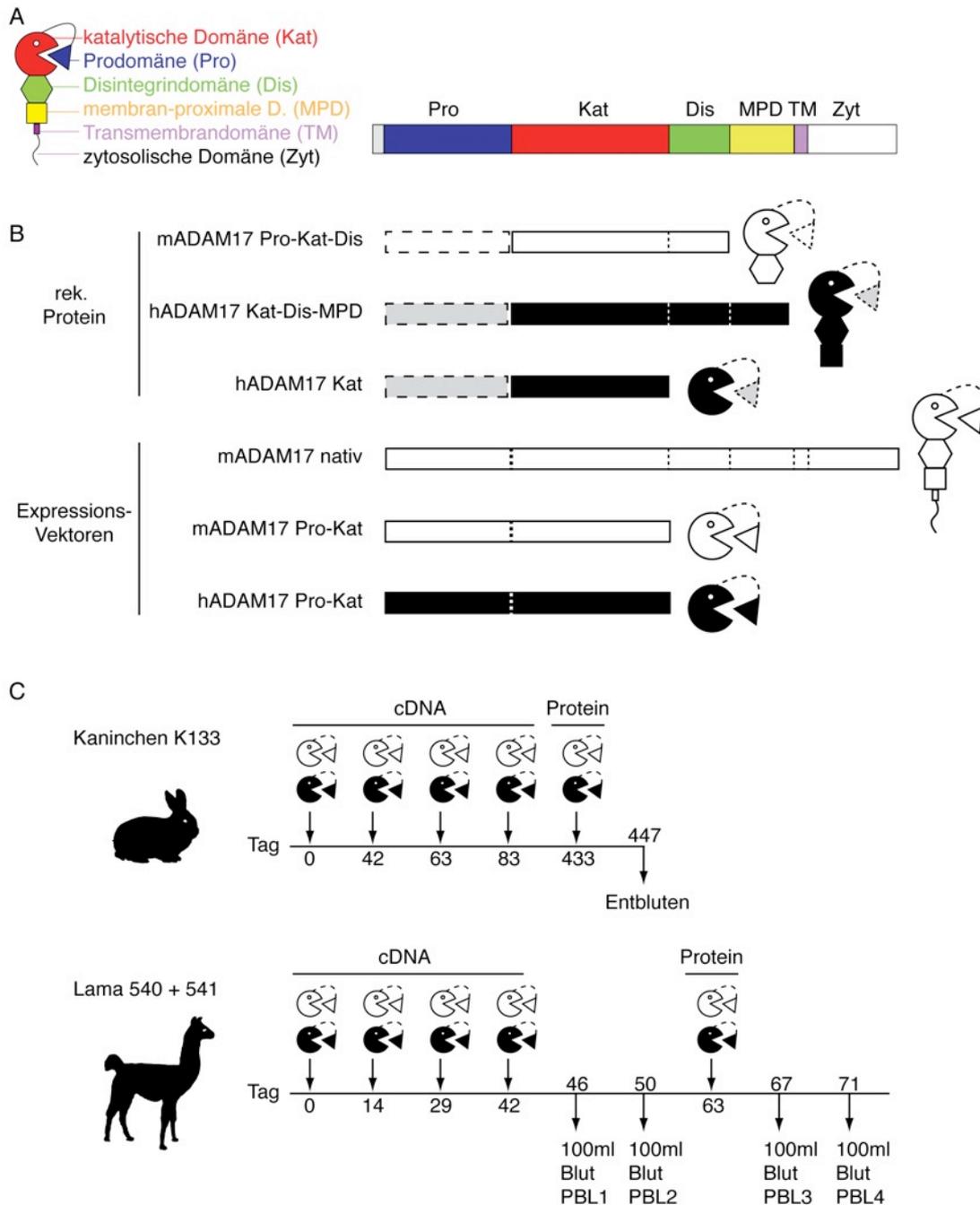


Abb. 4.3.1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von ADAM17 und der untersuchten und für die Immunisierungen verwendeten rekombinanten ADAM17-Varianten.

(A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von ADAM17. **(B)** Schematische Darstellung der verwendeten Proteine und Expressions-Vektoren. Die kommerziell erworbenen rekombinanten ADAM17-Proteine (rek. Protein) waren in Anwesenheit der Prodomäne exprimiert und über C-terminale Tags aufgereinigt worden. Da die Präparate z. T. noch Prodomäne enthalten, ist diese gestrichelt dargestellt. Auch in den verwendeten Expressionsvektoren ist die Prodomäne enthalten, sodass in transfizierten Zellen die Pro-Form sowie ggf. auch mature Formen zu erwarten sind. **(C)** Ein Kaninchen (K133) und zwei Lamas (540 und 541) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit den schematisch dargestellten Expressionsvektoren mittels Genegun (cDNA) oder rekombinantem Protein immunisiert bzw. geboostet. K133 wurde an Tag 447 entblutet und aus dem Serum wurde der polyklonale Antikörper aufgereinigt. Den Lamas 540 und 541 wurde vier Mal 100 ml Blut entnommen und aus den peripheren Blutlymphozyten RNA aufgereinigt (PBL1-4). Murine ADAM17 (mADAM17) ist weiß mit schwarzem Rand, humane ADAM17 (hADAM17) schwarz dargestellt. Die Immunisierung des Kaninchens erfolgte am UKE, die Immunisierungen der Lamas wurden von der Firma Ablynx in Gent durchgeführt.

Die aus dem Präimmenserum (pIS) und dem Immenserum (IS) des Kaninchens aufgereinigten Antikörper wurden durchflusszytometrisch auf ADAM17-Bindung untersucht (**Abb. 4.3.2 A**). Hierfür wurden vitale, transient mit nativer muriner ADAM17 und GFP kotransfizierte HEK-Zellen mit den pIS bzw. IS Antikörpern inkubiert und gebundene Antikörper über einen Fluoreszenz-markierten anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper detektiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die gereinigten K133 IS-Antikörper ADAM17-transfizierte Zellen spezifisch anfärben. Dies deutet an, dass ADAM17 zumindest teilweise an der Zelloberfläche der transfizierten HEK-Zellen exponiert und damit den K133 IS-Antikörpern zugänglich ist. Es ist bekannt, dass ADAM17 zu einem großen Teil intrazellulär vorliegt (Schlöndorff *et al*, 2000; Murphy, 2008), sodass sich nicht alle transfizierten Zellen extrazellulär über ADAM17 anfärben lassen. Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden CHO-Zellen transient mit Konstrukten für murines Vollängenprotein oder humaner bzw. muriner katalytischen und Prodomäne mit kernlokalisiertem GFP kotransfiziert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen intrazellulär angefärbt. In der Überlagerung lässt sich erkennen, dass die transfizierten Zellen, die GFP im Kern exprimieren (GFP), spezifisch von K133 IS-Antikörpern angefärbt werden (PE) (**Abb. 4.3.2 B**).

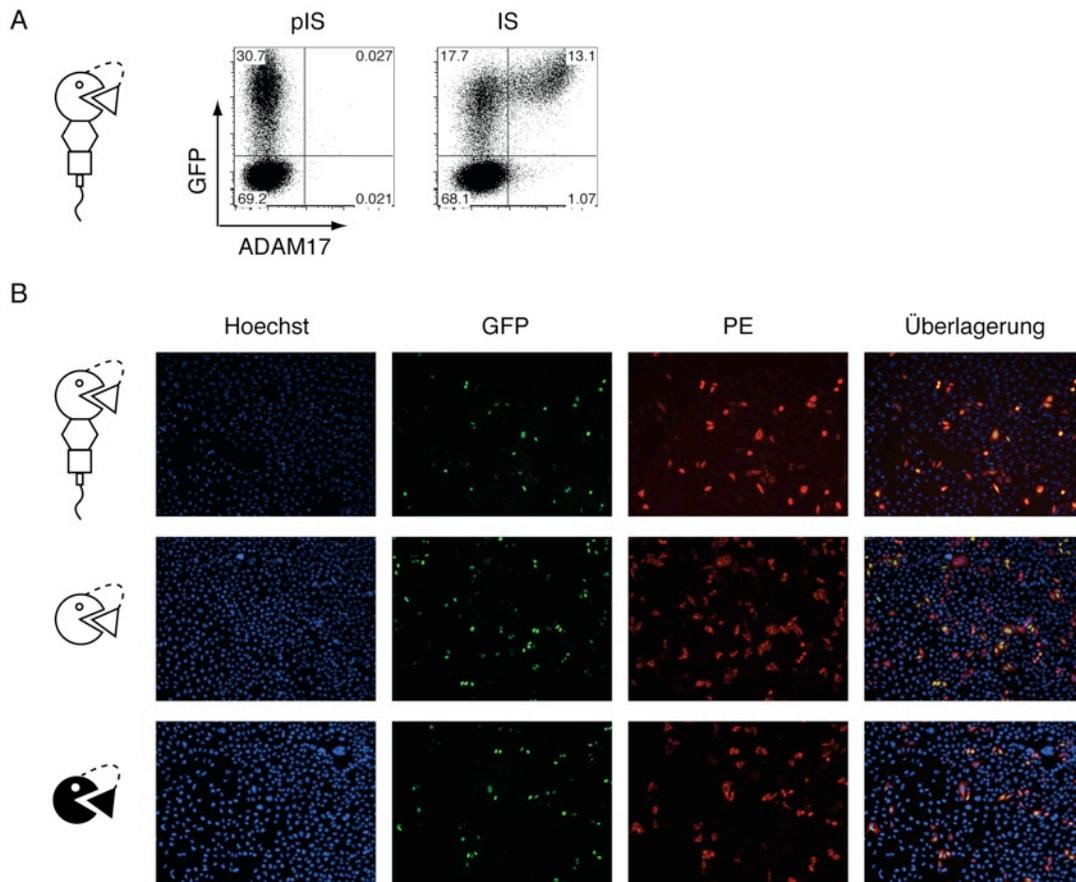


Abb. 4.3.2: K133 erkennt ADAM17-transfizierte Zellen in der Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzmikroskopie.

(A) Transient mit muriner ADAM17 und GFP kotransfizierte HEK-Zellen wurden mit aufgereinigtem Immunglobulin ($1 \mu\text{g/ml}$) aus dem Präimmunserum (pIS) bzw. dem Immunserum (IS = K133 pAK) des Kaninchens inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit einem Phycoerythrin (PE)-gekoppelten Sekundärantikörper im Durchflusszytometer nachgewiesen. **(B)** Transient mit verschiedenen ADAM17-Konstrukten und GFP kotransfizierte CHO-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit dem pAK K133 inkubiert ($1 \mu\text{g/ml}$). Gebundene Antikörper wurden mit einem PE-gekoppelten Sekundärantikörper mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Die dargestellten ADAM17-Schemata entsprechen den in Abb. 4.3.1 erläuterten Expressionskonstrukten. Das transfizierte GFP erscheint dank eines genetisch-fusionierten Kern-Lokalisations-Signals im Zellkern.

4.3.2 Selektion der ADAM17-spezifischen Nanobodies ST127 und ST161

Für die Selektion von Nanobodies wurden aus der RNA der peripheren Blutlymphozyten der Blutentnahmen PBL3 und 4 (vgl. **Abb. 4.3.1**) Nanobodies mit Primern für die VHH-Domänen des Schwere-Ketten-Antikörper-Isotyps IgG2b amplifiziert. Die Amplifikate sowie der Zielvektor pHEN2 wurden mit den Endonukleasen SfiI und NotI geschnitten und der Vektor wurde anschließend, zur Verhinderung einer Religation ohne Insert, dephosphoryliert. Inserts und Vektor wurden über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und die DNA-Konzentration bestimmt. Die Nanobody-kodierenden Fragmente und der pHEN2-Vektor wurden daraufhin in einem molaren Verhältnis von 3:1 (Insert:Vektor) ligiert (**Abb. 4.3.3**). Elektrokompente TG1 *E. coli* wurden mittels Elektroporation mit den Ligationsansätzen transformiert. Zur Bestimmung der Bibliotheksgrößen wurde ein Aliquot der Bibliothek titriert und die Klone wurden gezählt. Aus 50 (Lama 540) bzw. 26 (Lama 541) zufällig gepickten Klonen wurde DNA präpariert und die Nanobody-kodierenden Inserts sequenziert, um die Diversität der entstandenen Bibliotheken abzuschätzen. Die ermittelten Bibliotheksgrößen von $6-8 \times 10^5$ Klonen sowie die niedrige Anzahl an doppelten Klonen bieten eine gute Grundlage für die Selektion mittels Phagen-Display (Wesolowski *et al*, 2009)(**Tabelle 4.1**).

Tabelle 4.1: Charakteristika der primären Nanobody-Phagendisplay-Bibliotheken aus den Lamas 540 und 541.

Die Größe zeigt die Summe der Einzelklone nach Transformation der *E. coli* mit den Ligationsansätzen, Seq. zeigt die Anzahl der sequenzierten Klone aus der Primärbibliothek. Unter den sequenzierten Klonen wurde einige mehrfach gefunden (doppelt). Einer dieser Klone entsprach einem der an ADAM17 selektierten Klone (α ADAM17) (#86, s. Tabelle 4.2, nicht ADAM17-spezifisch)

Lama	Größe	Seq.	doppelt	α ADAM17
540	8×10^5	50	2	1
541	6×10^5	26	1	0

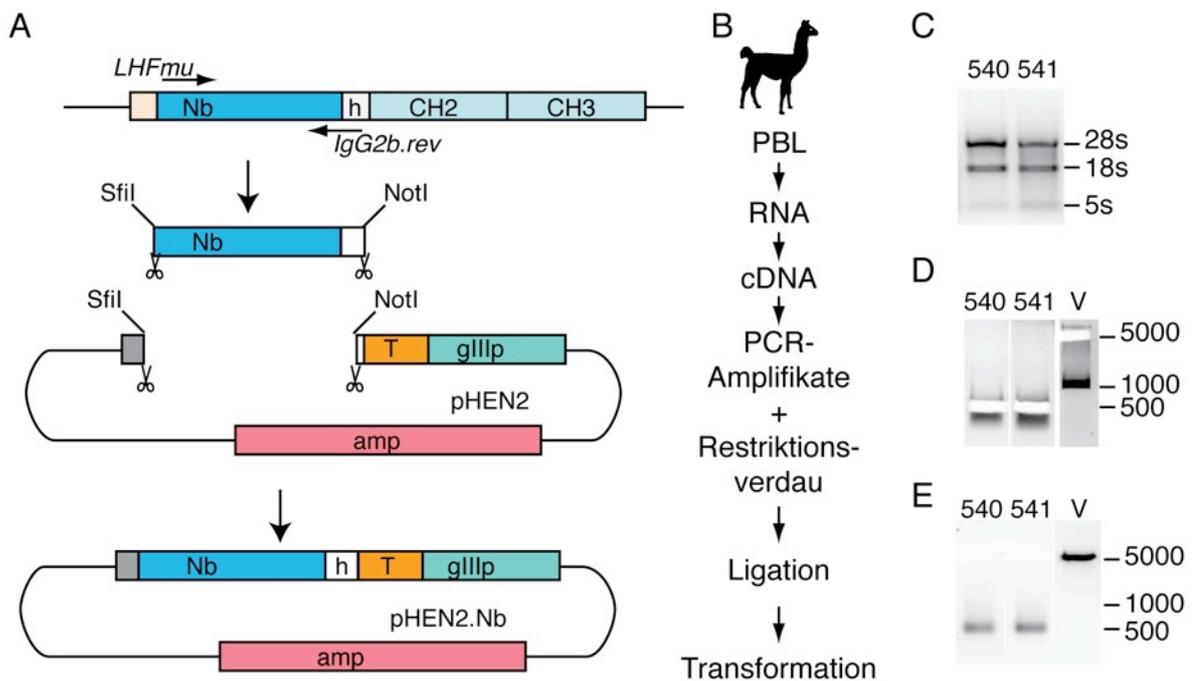


Abb. 4.3.3: Klonierung der Nanobody Phagen-Display-Bibliotheken aus der RNA peripherer Blutlymphozyten der Lamas 540 und 541.

(A), (B) Schematische Darstellung der PCR-Amplifikation und Klonierung der Nanobody kodierenden Region in den Phagen-Display Vektor pHEN2. (C)-(E) Agarosegelelektrophorese von RNA, PCR-Amplifikaten und pHEN2-Vektor. Aus peripheren Blut-Leukozyten (PBL) gewonnene RNA (B) wurde mittels Agarosegelelektrophorese auf Qualität überprüft (C) und anschließend für die reverse Transkription verwendet. Die resultierende cDNA enthält die Schwere-Ketten-Antikörper-kodierenden Bereiche mit Nanobody (Nb), *Hinge*-Region (h) und den konstanten Domänen CH2 und CH3 (A). Die cDNA diente als Template für die Amplifikation der Nanobody-kodierenden Bereiche mit den Primern LHFmu und IgG2b.rev (A). Die Amplifikate wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen SfiI und NotI verdaut (D). Der Zielvektor pHEN2 wurde ebenfalls mit SfiI und NotI verdaut und anschließend mit Antarctic Phosphatase dephosphoryliert. Ein analytisches Gel wurde zur Qualitätskontrolle der geschnittenen Fragmente angefertigt (E) und die Ligation im molaren Verhältnis von 3:1 (Insert:Vektor) vorgenommen (B). Der pHEN2 Vektor beinhaltet einen His-Myc-Tag (T) und das gIIIp, das für die Phagenproduktion notwendig ist (gIIIp), sowie eine Ampicillin-Resistenz (A).

Die Selektion gegen humane und murine ADAM17 erfolgte an rekombinantem ADAM17-Protein, das an die Oberfläche der Wells von Mikrotiterplatten adsorbiert wurde (**Abb. 4.3.4, Tabelle 4.2**). In der ersten Selektionsrunde reicherten sich zwei Klone an: ST127 wurde sowohl nach Selektion an humaner ADAM17 (31x) als auch nach Selektion an muriner ADAM17 (6x) gefunden, ST139 wurde nur an muriner ADAM17 angereichert (5x). Diese Klone sind durch Länge der *Hinge*-Region und An- bzw. Abwesenheit einer Disulfidbrücke zwischen CDR2 und CDR3 und der Sequenz und Länge der CDR3 charakterisiert und entsprechend benannt (ST127: L-9). Ein Klon wurde gefunden, der auch in den Sequenzen der Primärbibliothek gefunden

wurde (ST86). In einer zweiten Selektionsrunde an den gleichen Proteinen wurden weitere Klone angereichert: ST161 (L-17) wurde 3x und ST154 2x gegen murine ADAM17 gefunden. Aus der Familie L-9 von Klon ST127 wurden drei weitere Klone gefunden, die sich jeweils durch die Mutation einer Aminosäure (in *Framework-Region 3* und CDR1) von ST127 unterscheiden.



Abb. 4.3.4: Anreicherung von Nanobody-Familien durch Selektion an immobilisierter ADAM17. Sequenzen der Plasmide aus den nach Festphasenselektion (*Panning*) an ADAM17 eluierten Phagen wurden untereinander ausgerichtet und nach Länge der CDR3 sortiert. In der ersten *Panning*-Runde wurde ein dominanter Klon sowohl an humane als auch an murine ADAM17 angereichert (127, roter Pfeil). Ein weiterer Klon wurde an murine ADAM17 angereichert (139, gelber Pfeil). In der zweiten Runde wurde der dominante Klon 127 aus der ersten Runde weiter an humane und murine ADAM17 selektioniert und dabei in 4 Varianten (Punktmutationen in der *Framework-Region 3* bzw. in der CDR1) gefunden (127, 157, 159, 162, rote Pfeile). Variierende Aminosäuren zweier Klone derselben Familie sind grau hinterlegt. Eine weitere Familie reicherte sich gegen humane und murine ADAM17 an (155 und 164, orangener Pfeil). Zwei weitere Nanobodies wurden an muriner ADAM17 angereichert (161, blauer Pfeil und 154, grüner Pfeil). Die Mitglieder der Nanobody-Familien der, in dieser Arbeit als ADAM17-spezifisch verifizierten und näher charakterisierten, Nanobodies 127 und 161 sind mit einem Rahmen um die Sequenznummer markiert. Die für die Selektion verwendete rekombinante murine (weiß) und humane (schwarz) ADAM17 sind über dem Alignment dargestellt (wie in Abb. 4.3.1 erläutert).

Tabelle 4.2: Charakteristika der angereicherten Nanobody-Familien.

Familiennamen wurden nach Isotyp (L= *long hinge*, IgG2b), Vorhandensein einer zusätzlichen Disulfidbrücke und Länge der CDR3 gebildet (Koch-Nolte *et al*, 2007). Anzahl 1°Bibl., Sel.1 und Sel.2 geben die Anzahl der sequenzierten Klone an, die in der Primärbibliothek, der Selektion 1 oder 2 gefunden wurden. Klon# entspricht der Nummer des Klons; bei mehrfachem Auftreten eines Klones wurde die Nummer des zuerst gefundenen verwendet. CDR3: Aminosäuresequenz der Komplement-determinierenden Region 3. Die Klone 127 und 161 wurden als ADAM17 spezifisch verifiziert.

Familie	Anzahl 1°Bibl.	Anzahl Sel. 1	Anzahl Sel. 2	Klon #	CDR3
L-9	0	37	68	127, 157, 159, 162	ATPGTRWSY
L-17	0	0	3	161	GVFPTYGDYVRHSSFAS
L-4	0	5	0	139	GQLY
L-10	0	0	2	154	RHRDGGTWRG
L-7	0	0	4	155, 164	RLFSNY
L-6	1	1	0	86	FPSYYD
L-13	2	0	0	12	SQSYRTRSSRYDY

HEK-6e-Zellen und pCSE2.5-Vektor sind für die Produktion von sezernierten Proteinen optimiert (Jäger *et al*, 2013). Ausgesuchte Nanobody-kodierende Inserts wurden für die Produktion als Kaninchen-IgG-Fc-Fusionsproteine in HEK-6e-Zellen in den Expressionsvektor pCSE2.5 nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und NotI umklont (Abb. 4.3.5 A). Die kodierenden Sequenzen für die variablen Domänen des human-spezifischen ADAM17-Antikörpers D1A12 (Tape *et al*, 2011) wurden als scFv synthetisiert (von der Firma Life Technologies) und ebenfalls nach NcoI- und NotI-Verdau in pCSE2.5 kloniert (Abb. 4.3.5 B). Sechs Tage nach transienter Transfektion in serumfreiem Medium wurde der Überstand durch Zentrifugation von den Zellen getrennt und 10 µl des Zellüberstandes wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.3.5 C). Die Ergebnisse zeigen jeweils eine prominente Bande auf Höhe der vorhergesagten molaren Masse der Nanobody- bzw. scFv-Fc Fusionsproteine (Abb. 4.3.5 C). Der Vergleich mit Markerproteinen erlaubt die Abschätzung der Ausbeute: Es wurde jeweils eine Konzentration von ca. 200-500 ng/µl für die Nanobody-Fc-Fusionsproteine und von ca. 100 ng/µl für das scFv-Fusionsprotein erzielt. Die hohe Reinheit der Antikörper macht es möglich, diese ohne weitere Aufreinigung für Bindungsstudien im ELISA an adsorbierter, rekombinanter muriner (Pro-Kat-Dis) und humaner (Kat-Dis-MPD) ADAM17 einzusetzen (Abb. 4.3.5 D). Die Ergebnisse zeigen, dass ST127 spezifisch an humane und murine ADAM17 bindet und ST161 und K133 an murine ADAM17. D1A12 bindet erwartungsgemäß (Tape *et al*, 2011) nur an humane ADAM17 (Abb. 4.3.5 D).

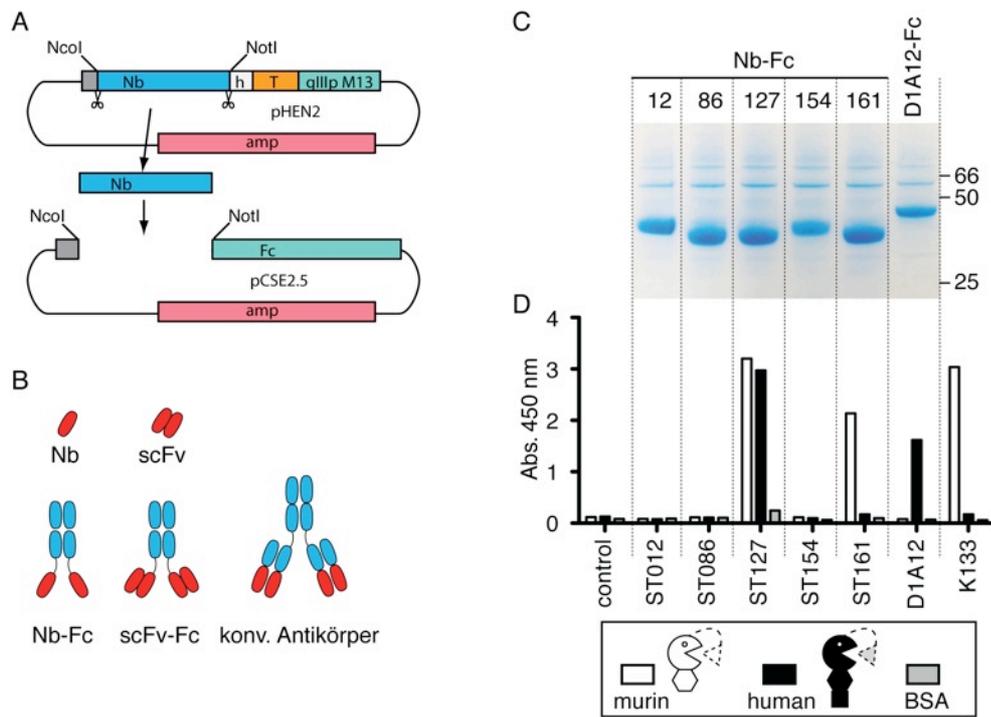


Abb. 4.3.5: ELISA-Analysen zeigen unterschiedliche Bindungsspezifitäten von selektionierten Nanobodies und K133 für murine und humane ADAM17.

(A) Die Nanobodies wurden über NcoI und NotI aus dem Phagen-Display-Vektor pHEN2 in den eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5 umklontiert. Im Zielvektor wird die Sequenz für die Nanobodies mit der Sequenz für den Fc-Teil des Kaninchen-IgGs (Fc) fusioniert. (B) Schematische Darstellung der eingesetzten Antikörper-Konstrukte: Nanobody-Fc-Fusionsprotein (Nb-Fc), *single-chain-variable-Fragment-Fc-Fusionsprotein* (scFv-Fc) und konventioneller Antikörper (konv. Antikörper). Die Antigen-bindenden Domänen sind rot dargestellt. (C) Die umklontierten Konstrukte im pCSE2.5-Vektor wurden zur Transfektion von HEK-6e-Zellen verwendet. Das Medium wurde 6 Tage nach Transfektion durch Zentrifugation von den Zellen getrennt und die Proteine aus 10 μ l des Überstandes mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die Nb-Fc Proteine zeigen nach Reduktion der Disulfidbrücken eine molekulare Masse von ca. 40 kD, das scFv-Fc Protein von ca. 50 kD. Unter nichtreduzierenden Bedingungen bilden die Antikörper über Disulfidbrücken Moleküle mit doppelter molarer Masse. (D) Je 100 ng rekombinantes murines oder humanes ADAM17-Protein oder BSA wurden an der Oberfläche von ELISA-Platten adsorbiert und freie Bindungsstellen blockiert. Die Nüpfen wurden mit je 5 μ l des Nanobody-Fc-Fusionsprotein-haltigen HEK-6e-Überstandes inkubiert und dann gewaschen. Die Detektion gebundener Nb-Fc-Fusionsproteine erfolgte über einen Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG-Antikörper. Der Farbumschlag des Substrates TMB wurde mit Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen. Schwarze Balken zeigen die Bindung an humane ADAM17 (Kat-Dis-MPD), weiße Balken die Bindung an murine ADAM17 (Pro-Kat-Dis) und graue Balken die Bindung an BSA.

Eine besondere Eigenschaft der Schwere-Ketten-Antikörper ist ihre, im Vergleich zu konventionellen Antikörpern, häufig elongierte CDR3 und die Fähigkeit, in kryptische Epitope, wie z. B. tief liegende aktive Zentren von Enzymen, zu binden und diese zu inhibieren (Desmyter *et al*, 1996; Wesolowski *et al*, 2009; Menzel *et al*, 2013). Um mögliche inhibitorische Fähigkeiten der Antikörper ST127-Fc, ST161-Fc und K133 zu untersuchen, wurde ein Assay zur Bestimmung der ADAM17-Aktivität durchgeführt. Dieser Assay basiert auf der Spaltung eines fluorogenen Peptides aus TNF α , das die ADAM17-Spaltstelle beinhaltet. Rekombinante ADAM17 wurde mit den Antikörpern

für 30 min bei 37 °C vorinkubiert, und anschließend wurde das Peptid-Substrat zugegeben und die Fluoreszenz im Fluoreszenz-Plattenleser über 15 min gemessen. Die Steigung der Messwerte über die Zeit ist proportional zur ADAM17-Aktivität und wurde als Änderung der relativen Fluoreszenzintensitäten (Δ RFU) aufgetragen (**Abb. 4.3.6**). Die Ergebnisse zeigen erwartungsgemäß eine Inhibition von ADAM17 durch die niedermolekularen Metalloproteaseinhibitoren GW und TAPI, sowie eine Inhibition durch D1A12 gegenüber humaner ADAM17, jedoch nicht gegenüber muriner ADAM17 (Tape *et al*, 2011). GI wurde als ADAM10 bevorzugender Inhibitor beschrieben (Hundhausen *et al*, 2003) und zeigt in der hier eingesetzten Konzentration eine schwache Inhibition von ADAM17. Die Antikörper ST127, ST161 und K133 zeigen ähnlich wie ein Kontrollantikörper keine erkennbare Inhibition der ADAM17Aktivität.

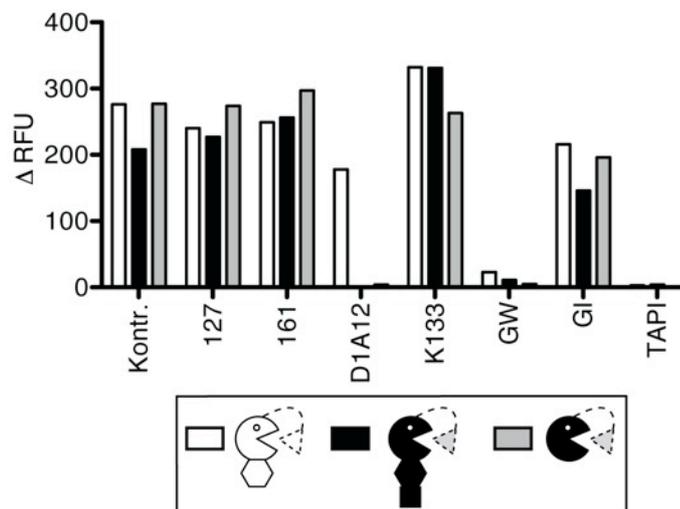


Abb. 4.3.6: D1A12 - aber nicht ST127, ST161, oder K133 - hemmt die ADAM17-Enzymaktivität im fluorogenen Peptid-Assay.

Fluorometrischer Assay der proteolytischen Spaltung eines fluorogenen Peptid-Substrates durch rekombinante ADAM17. Die Spaltung resultiert in einer gesteigerten Fluoreszenz; die spezifische Hemmung von ADAM17 verhindert diese Steigerung der Fluoreszenz. ADAM17 (50 ng) wurde für 1 h mit einem 20- bis 50-fachen molaren Überschuss Antikörper (Nb-Fc / scFv-Fc oder konv. AK) oder mit niedermolekularen Inhibitoren (50 μ M) vorinkubiert. Das Substrat wurde zugegeben und die emittierte Fluoreszenz für 15 min mit einem Fluoreszenzreader aufgezeichnet. Die Änderung der relativen Fluoreszenzintensitäten (Δ RFU) ist proportional zur ADAM17-Aktivität. Kontrolle: nicht bindender Kontroll-Nb-Fc. Weiße Balken zeigen die Aktivität von muriner ADAM17 (Pro-Kat-Dis), schwarze Balken zeigen die Aktivität von humaner ADAM17 (Kat-Dis-MPD) und graue Balken die von humaner ADAM17 (Kat).

4.3.3 *ST127, ST161 und K133 erkennen unterschiedliche Domänen von ADAM17*

Zur näheren Charakterisierung der ADAM17-Epitope, die von den Antikörpern ST127, ST161 und K133 erkannt werden, wurden Western-Blot-Analysen mit Lysaten aus ADAM17-transfizierten HEK-Zellen und rekombinanten ADAM17-Proteinen durchgeführt (**Abb. 4.3.7**). Die Ergebnisse zeigen, dass ST127 alle drei in transfizierten HEK-Zellen exprimierten ADAM17-Varianten spezifisch erkennt: Lysate aus mit muriner Pro-Kat und humaner Pro-Kat transfizierten Zellen zeigen jeweils eine einzige ähnlich starke Bande bei 58 kD (**Abb. 4.3.7 A, Spuren 2, 3**), Lysate aus mit muriner Vollängen ADAM17 transfizierten HEK-Zellen eine einzige deutliche Bande bei 120 kD (**Abb. 4.3.7 A, Spur 1**). Die Analyse der beiden rekombinanten Proteine zeigt, dass ST127 nur die Fragmente bindet, die die katalytische Domäne beinhalten: humane ADAM17 Kat bei 35 kD (**Abb. 4.3.7 A, Spur 5**) sowie murine ADAM17 Pro-Kat-Dis bei 80 kD und Kat-Dis bei 55 kD, jedoch nicht die murine Prodomäne bei 25 kD (**Abb. 4.3.7 A, Spur 5**). Auch ST161 erkennt alle drei in transfizierten HEK-Zellen exprimierten ADAM17-Varianten (**Abb. 4.3.7 B, Spuren 1-3**), weist aber eine Präferenz für murine Pro-Kat gegenüber humaner Pro-Kat auf. Bei der Analyse der rekombinanten Proteine lässt sich erkennen, dass ST161 nur die Fragmente bindet, die die Prodomäne beinhalten: murine ADAM17 Pro-Kat-Dis bei 80 kD und die murine Prodomäne bei 25 kD (**Abb. 4.3.7 B, Spur 6**), sowie die humane Prodomäne bei 25 kD (schwach) (**Abb. 4.3.7 B, Spur 5**), jedoch nicht die murine Kat-Dis und die humane Kat. K133 zeigt ebenfalls eine spezifische Bindung an murines ADAM17-Vollängenprotein sowie an humane und murine ADAM17 Pro-Kat in Zelllysaten von transfizierten HEK-Zellen (**Abb. 4.3.7 C, Spuren 1-3**). K133 weist dabei - wie ST161 - eine Präferenz für murine Pro-Kat gegenüber humaner Pro-Kat auf. Ebenfalls bindet K133 die rekombinante humane katalytische Domäne (schwach) (**Abb. 4.3.7 C, Spur 5**) sowie alle Fragmente der murinen ADAM17. Die Beobachtung, dass K133 zwei nicht überlappende Proteine, die Kat-Dis und schwächer auch die Prodomäne allein erkennt, lässt darauf schließen, dass dieser polyklonale Antikörper verschiedene Epitope der ADAM17 erkennt (**Abb. 4.3.7 C, Spur 6**).

Es zeigt sich somit im Western-Blot, dass ST127 die katalytische Domäne von humaner und muriner ADAM17 bindet und ST161 die Prodomäne - mit Präferenz für die murine Form. K133 bindet als polyklonaler Antikörper stärker an murine als an humane ADAM17 und enthält Antikörper sowohl gegen die Pro- als auch gegen die katalytische Domäne.

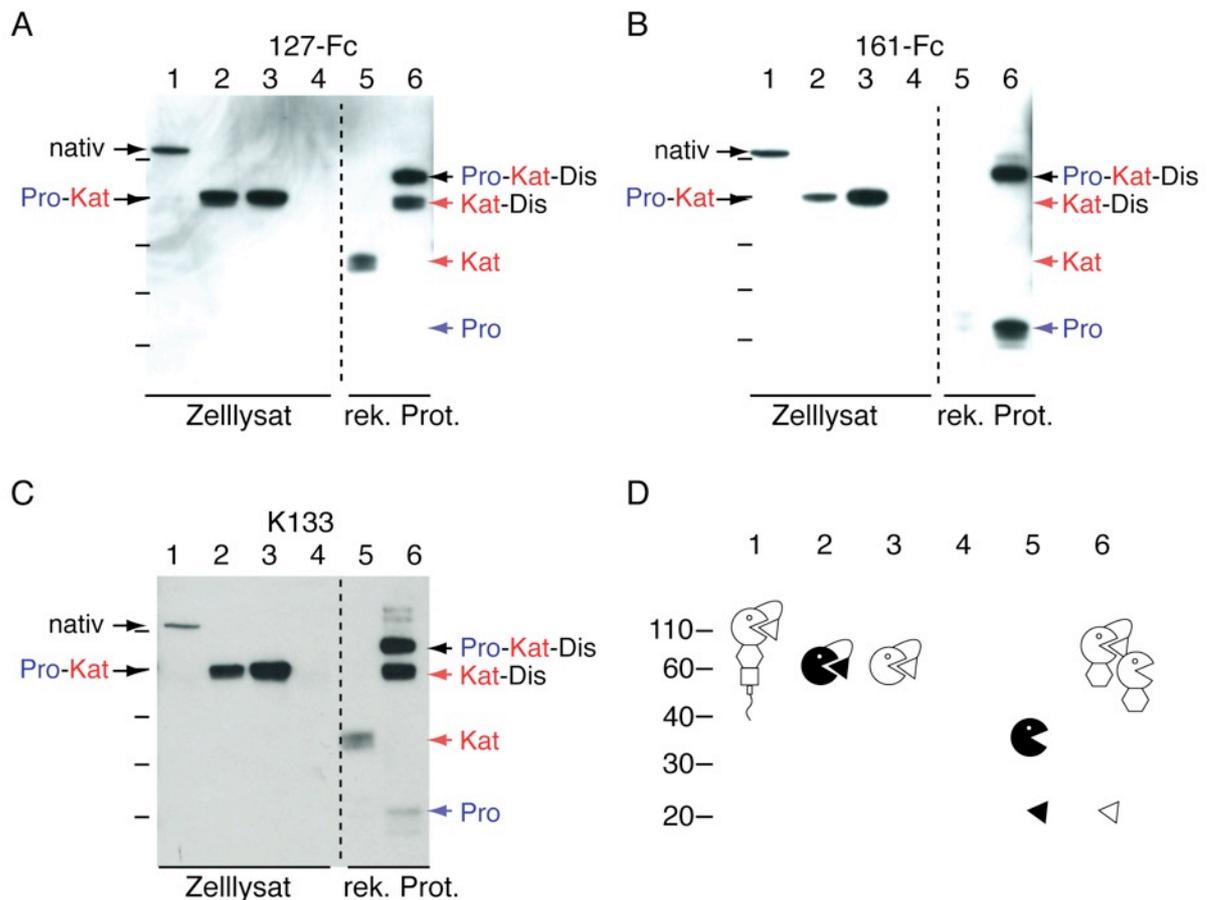


Abb. 4.3.7: ST127 und ST161 erkennen die katalytische Domäne bzw. die Prodomäne.

Die in (D) schematisch dargestellten Varianten von ADAM17 wurden im Western-Blot-Verfahren auf Reaktivität mit 127-Fc (**A**) und 161-Fc (**B**) oder K133 (**C**) untersucht. HEK-Zellen (Spuren 1-4) wurden mit nativer muriner ADAM17 (1), humaner ADAM17 Pro- und katalytischer Domäne (2), muriner ADAM17 Pro- und katalytischer Domäne (3) transfiziert oder blieben untransfiziert (4). HEK-Zellen wurden 24 h nach Transfektion geerntet und mit Triton X-100 lysiert. Das Lysat von 5×10^4 Zellen wurde je Spur aufgetragen. Je 100 ng kommerziell erworbene rekombinante ADAM17-Proteine wurden in Spuren 5 und 6 aufgetragen. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG-Antikörper und dem Chemielumineszenz-Verfahren. Die vermutliche Domänen-Struktur der beobachteten Banden ist am Rande der Blots wiedergegeben (s. auch die Erläuterung in Abb. 4.3.1). Die in (D) schematisch dargestellten Varianten von ADAM17 zeigen die Laufhöhe der jeweiligen Konstrukte. Die Laufhöhe der Banden entspricht dem Mittelpunkt der katalytischen Domäne bzw. der Prodomäne in der schematischen Darstellung.

Zur Charakterisierung weiterer Anwendungsbereiche der Antikörper wurden CHO-Zellen transient mit den drei verschiedenen ADAM17-Expressionskonstrukten transfiziert und mit den Antikörpern ST127, ST161 und K133 intrazellulär für die Immunfluoreszenzmikroskopie angefärbt. Es zeigt sich, dass K133 alle drei

Konstrukte erkennt, während D1A12 erwartungsgemäß nur die humane ADAM17 (Pro-Kat) erkennt. ST127 und ST161 erkennen ebenfalls spezifisch alle drei Konstrukte. Dabei zeigen Zellen, die mit den verkürzten Varianten (humane und murine Pro-Kat) transfiziert waren deutlich stärkere Signale als mit der Volllängen-ADAM17 transfizierte Zellen. Die Färbung von ST161 für das murine Volllängenkonstrukt war sehr schwach und nur auf sehr wenigen Zellen detektierbar. Diese Ergebnisse spiegeln die im Western-Blot (**Abb 4.3.7**) erhobenen Ergebnisse wider.

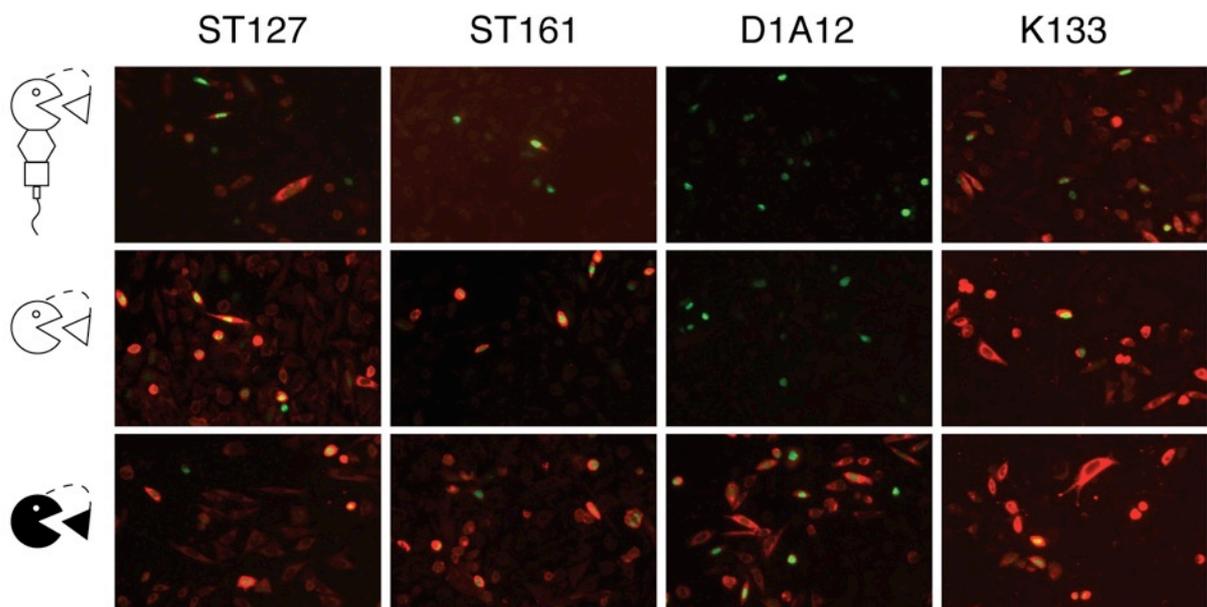


Abb. 4.3.8: ST127 und ST161 erkennen ADAM17-transfizierte Zellen in der Immunfluoreszenzmikroskopie.

CHO-Zellen wurden mit den schematisch dargestellten Expressionskonstrukten für murine bzw. humane ADAM17 und mit einem Konstrukt für kernlokalisiertes GFP kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit den angegebenen Antikörpern gefärbt. Gebundene Antikörper wurden mittels eines PE-konjugierten anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörpers in der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen.

Um eine weitere Charakterisierung der Bindungsaffinitäten der Antikörper durchzuführen, wurde ein Titrationsassay im ELISA mit drei rekombinanten Proteinen durchgeführt: murine ADAM17 Pro-Kat-Dis, humane ADAM17 Kat-Dis-MPD und humane ADAM17 Kat. Die Ergebnisse zeigen eine ca. 100-fach höhere Affinität von ST127 für die humane Kat als für die humane Kat-Dis-MPD (50 pM zu 5 nM). Die Affinität gegenüber muriner Pro-Kat-Dis liegt dazwischen (ca. 0,5 nM). ST161 zeigt ebenfalls starke Affinität gegenüber muriner ADAM17 Pro-Kat-Dis (ca. 0,3 nM), jedoch nur äußerst schwache Bindungen an die humanen Proteine (> 300 nM).

D1A12 zeigt eine hohe Affinität für humane ADAM17 Kat-Dis-MPD (ca. 0,3 nM), jedoch praktisch keine Bindung an die katalytische Domäne allein.

K133 bindet murine ADAM17 Pro-Kat-Dis und die humane Kat mit scheinbarer Affinität von 10 nM, humane ADAM17 Kat-Dis-MPD jedoch nur mit einer scheinbaren Affinität von > 300 nM. Da es sich bei K133 um eine polyklonale Mischung verschiedener Antikörper handelt, unter denen die ADAM17-spezifischen Antikörper nur einen Bruchteil ausmachen, muss die tatsächliche Affinität deutlich höher liegen.

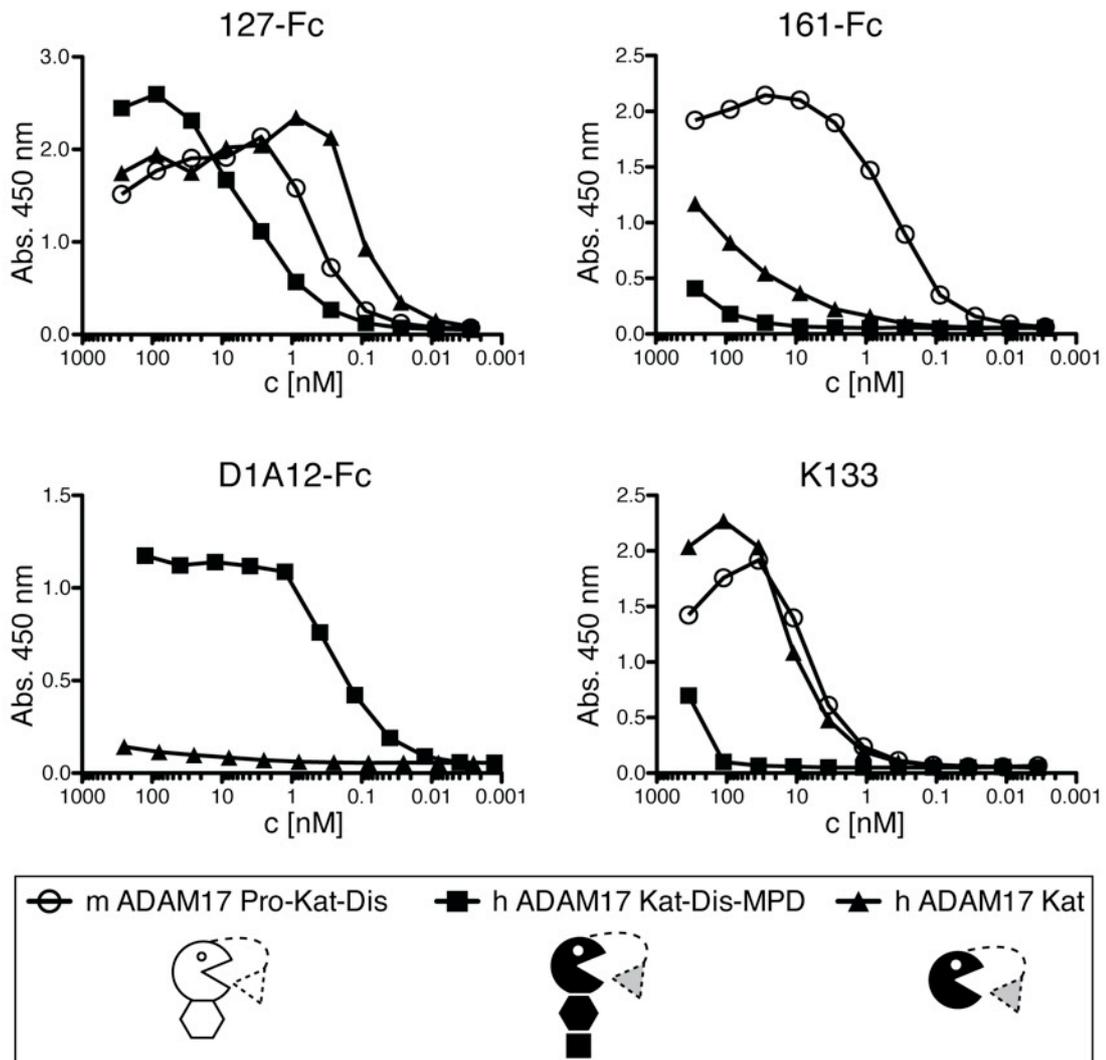


Abb. 4.3.9: Titrationsanalysen zeigen unterschiedliche Bindungsaffinitäten von ST127, ST161, K133 und D1A12 für murine und humane ADAM17-Varianten.

Die Bindungsaffinität der Antikörper für verschieden ADAM17-Varianten wurde im ELISA untersucht. An die Näpfe einer ELISA wurden je 100 ng rekombinantes ADAM17-Protein adsorbiert und freie Bindungsstellen blockiert. Verdünnungsreihen der Antikörper wurden in 1 % BSA in PBS angefertigt und für 1 h mit den immobilisierten ADAM17-Proteinen inkubiert. Nach Waschung der Näpfe erfolgte die Detektion gebundener AK über einen Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG Antikörper. Weiße Kreise zeigen die Bindung an murine ADAM17 (Pro-Kat-Dis), schwarze Symbole die Bindung an humane ADAM17 (Kat-Dis-MPD: Quadrat; Kat: Dreieck). Die Dissoziationskonstante (K_D) der Nanobodies entspricht der Konzentration bei halbmaximaler Absorption.

Die Ergebnisse in diesem Abschnitt zeigen die erfolgreiche Generierung verschiedener Antikörper gegen ADAM17. Ein polyklonaler Antikörper aus einem Kaninchen und zwei monoklonale, durch Phagen-Display selektierte Schwere-Ketten-Antikörper aus Lama-Lymphozyten wurden hinsichtlich ihrer Funktionalität in unterschiedlichen immunologischen Methoden, ihrer Epitope und ihrer Affinitäten charakterisiert. Alle drei Antikörper funktionieren in ELISA, Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Western-Blot. Das Nanobody-Fc-Fusionsprotein ST127 bindet die katalytische Domäne von ADAM17, ST161 bindet die Prodomäne (mit Präferenz für murine ADAM17). Der polyklonale Kaninchenantikörper K133 bindet sowohl die katalytische als auch die Prodomäne. ST127 und ST161 binden ihre Epitope mit hohen Affinitäten von unter 1 nM.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ARTC2.2 sowohl Initiator als auch Ziel von NAD-induzierter membrannaher Proteolyse (*Shedding*) auf T-Zellen ist. Die Spaltung erfolgt zwischen F239 und S240, drei Aminosäuren N-terminal des GPI-Ankers und entlässt ARTC2.2 in enzymatisch aktiver Form. Die Zielspezifität wird dabei von Membranproteinen zu sekretierten Proteinen verschoben und freigesetzte ARTC2.2 kann einige Zytokine ADP-ribosylieren. IFN- γ zeigte eine besonders prominente ADP-Ribosylierung und wurde daher weiter untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die ADP-Ribosylierung von IFN- γ an R128 erfolgt, mit der Rezeptorbindung konkurriert und die biologische Aktivität von IFN- γ inhibiert.

Des Weiteren konnten neue Antikörper gegen ADAM17 generiert werden. Es wurden zwei monoklonale Nanobody-Fc-Antikörper (ST127 und ST161) aus RNA immunisierter Lamas kloniert, selektioniert und produziert sowie ein polyklonaler Antikörper (K133) aus dem Serum eines immunisierten Kaninchen gewonnen. Alle drei Antikörper sind in Immunfluoreszenzmikroskopie, ELISA und Western-Blot einsetzbar. ST127-Fc und ST161-Fc binden die katalytische Domäne bzw. die Prodomäne mit hoher Affinität und K133 kann als pAK die katalytische- und die Prodomäne binden.

Die Diskussion ist in vier Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt werden die zugrundeliegenden Mechanismen und die möglichen Konsequenzen des *Sheddings* von ARTC2.2 und der daraus resultierenden veränderten Substratspezifität besprochen. Im zweiten Abschnitt wird die ADP-Ribosylierung von IFN- γ , der Nachweis und ihre Reversibilität sowie die Inhibition von IFN- γ durch ADP-Ribosylierung besprochen. Der dritte Teil behandelt die Charakteristika der entwickelten ADAM17-spezifischen Antikörper und deren Anwendungsmöglichkeiten. Im vierten Teil wird der Signalweg des Nukleotid-induzierten *Sheddings* besprochen - mit einem besonderen Fokus auf die regulatorischen Eigenschaften von sARTC2.2 und ADP-ribosyliertem IFN- γ in inflammatorischen Milieus.

5.1 Regulation der ADP-Ribosyltransferase ARTC2.2 durch Nukleotid-induzierte Proteolyse

Es konnte gezeigt werden, dass ARTC2.2 über die NAD-abhängige ADP-Ribosylierung von P2X7 die eigene Freisetzung von der Zelloberfläche induziert. Dies wurde sowohl für ARTC2.2 und P2X7 kotransfizierte HEK-Zellen (**Abb. 4.1.1**) als auch für primäre T-Zellen gezeigt (**Abb. 4.1.1 + 4.1.2**). Mit Hilfe spezifischer Inhibitoren konnte die Beteiligung von ARTC2.2, P2X7 und einer ADAM-Protease am NAD-induzierten *Shedding* untermauert werden (**Abb. 4.1.3**). Weiterhin konnte ARTC2.2 aus dem Überstand Nukleotid-behandelter DC27.10^{ARTC2.2}-Zellen aufgereinigt werden (**Abb. 4.1.4**).

Die beiden nahe verwandten und für *Shedding* primär verantwortlichen Proteasen ADAM10 und ADAM17 werden durch GW280264X inhibiert. Aufgrund einer überlappenden Substratspezifität kann nicht abschließend geklärt werden, um welche Protease es sich handelt. Einige Hinweise deuten jedoch auf ADAM17 als die hauptverantwortliche Protease für das *Shedding* von ARTC2.2 hin. Während ADAM10 eher als konstitutiv aktive Protease gilt, benötigt ADAM17 eine Aktivierung (Hundhausen *et al*, 2003; Murphy, 2008). Die Oberflächenexpression von ADAM17 auf T-Zellen ist ohne Stimulation sehr gering, steigt aber nach Aktivierung stark an (Ebsen *et al*, 2013).

Die Spaltstelle von ARTC2.2 nach Nukleotid-induziertem *Shedding* konnte mittels Massenspektrometrie aufgeklärt werden: sie liegt drei Aminosäuren vor dem GPI-Anker zwischen F239 und S240 (**Abb. 4.1.5**). In einem Peptid-Screeningassay zur Bestimmung bevorzugter Sequenzen in den Spaltstellen von ADAM17- und ADAM10-Substraten wurde die Stelle p1', (die erste Aminosäure C-terminal der Spaltstelle) als wichtigster Selektivitätsfaktor zwischen ADAM17 und ADAM10 beschrieben. Hier passt das Serin aus der ARTC2.2 besser in das Profil der ADAM17 (Caescu *et al*, 2009).

Ein Vergleich der beiden Proteasen in der MEROPS-Datenbank, die 60 verifizierte Zielproteine der ADAM17 und 40 Zielproteine der ADAM10 beinhaltet, zeigt promiskuitive Spaltstellenprofile für ADAM17 und ADAM10, mit wenig Unterschieden in den bevorzugten Aminosäuren (**Abb. 5.1**). Die Sequenz der ARTC2.2 passt in den meisten Positionen in den mittleren Häufigkeitsbereich der bekannten ADAM17- und

ADAM10-Substrat-Sequenzen. An den spaltstellennahen Positionen P2, P1 und P1' passt die ARTC2.2-Sequenz besser in das Spaltstellenmuster der ADAM17. So ist an Position P1 die Aminosäure F der ARTC2.2 in sonst keiner Sequenz der ADAM10-Substrate an dieser Position vorhanden, während sie zweimal in der Sequenz von ADAM17-Substraten zu finden ist; in der Position P1' haben acht der 60 untersuchten Sequenzen aus ADAM17-Zielproteinen wie ARTC2.2 ein Serin, jedoch nur zwei der untersuchten 40 Sequenzen der ADAM10-Substrate.

		ADAM17								ADAM10							
Position		P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
↑ Häufigkeit Amino- säure / Position	10L	12A	10A	15A	20V	14V	15S	10S	07S	08A	09Q	10A	10V	09V	12S	08Q	
	07H	10V	09Q	07R	09L	07R	06G	07V	06H	05V	05A	05T	06Q	07K	06G	07V	
	06R	08L	08L	05K	08S	05A	06A	05P	04G	05H	04V	05H	05L	05R	04I	04K	
	05D	06S	05V	05H	05T	05S	05L	04A	04L	04P	04E	03P	04R	04I	04T	03F	
	05K	05T	04M	04P	03F	05T	05I	04Q	03N	04S	03L	03I	03M	03A	03A	03S	
	04N	04P	03F	04T	03D	04I	03T	04E	03V	02I	02I	03K	02S	03L	02V	03H	
	04V	03H	03S	04Q	02A	04L	03C	04R	03T	02F	02M	02G	02I	02T	02F	02A	
	04T	02I	03E	03L	02I	04E	03N	03I	02P	02Y	02S	02M	02T	01G	02C	02D	
	04S	02G	02D	03I	02M	03H	03Q	03T	02E	02Q	02N	02Q	01G	01Y	01P	02E	
	03P	02M	02G	03Y	01G	02G	02F	03D	02K	01G	02K	02R	01A	01S	01L	01I	
	02G	02Y	02I	02F	01Q	02P	02K	02G	01Y	01L	01D	01V	01F	01N	01M	01T	
	02Q	01F	02N	02G	01E	02Q	02H	02M	01D	01M	01G	01Y	01K	01Q	01D	01R	
	02E	01D	02R	01V	01R	02K	01P	02F	01R	01T	01R	01E	00P	01E	01K	00G	
	01W	01K	01P	01N	00P	01F	01V	01L	00A	01E	01H	00F	00Y	01H	00Y	00P	
	00A	01R	01C	01D	00Y	00M	01M	01Y	00I	01K	00P	00L	00W	00P	00W	00L	
	00I	00W	01K	00M	00W	00Y	01D	01W	00M	00W	00F	00W	00C	00M	00N	00M	
	00M	00C	01H	00W	00C	00W	00Y	01N	00F	00C	00Y	00S	00N	00F	00Q	00Y	
	00F	00N	00Y	00S	00N	00C	00W	01H	00W	00N	00W	00C	00D	00W	00E	00W	
	00Y	00Q	00W	00C	00K	00N	00E	00C	00C	00D	00T	00N	00E	00C	00R	00C	
	00C	00E	00T	00E	00H	00D	00R	00K	00Q	00R	00C	00D	00H	00D	00H	00N	

Abb. 5.1: Die ARTC2.2 Spaltstelle passt besser in das Spaltstellen-Profil von ADAM17 als in das von ADAM10.

Die Profile der Spaltstellen von 60 bekannten ADAM17-Substraten und 40 ADAM10-Substraten wurden anhand der Häufigkeit der an der jeweiligen Stelle auftretenden Aminosäuren abgebildet. Die Spaltstelle ist mit einer roten gestrichelten Linie markiert. Die Positionen N-terminal zur Spaltstelle sind mit P1-P4, die Positionen C-terminal zur Spaltstelle mit P1'-P4' benannt, sodass die Zahlen 1-4 für den Abstand zur Spaltstelle stehen. Die Tabellen enthalten die Aminosäuren im Einbuchstabencode sowie die Anzahl der jeweiligen Aminosäuren in bekannten Substraten. Aminosäuren mit gleicher Häufigkeit an einer Position wurden in einem Block zusammengefasst. Die schwarze gestrichelte Linie trennt häufiger (oben) und seltener (unten) bestätigte Aminosäuren an der jeweiligen Position. Rot hinterlegt wurde die jeweilige Aminosäure der ARTC2.2. Die Daten zu den bekannten Substraten von ADAM17 und ADAM10 wurden der MEROPS-Datenbank entnommen (merops.sanger.ac.uk).

Es konnte gezeigt werden, dass die ARTC2.2 nach Nukleotid-induziertem *Shedding* als aktives Enzym freigesetzt wird und ihre Spezifität verändert, sodass sie zwar keine Membranproteine mehr ADP-ribosylieren kann, jedoch ein erweitertes Spektrum an löslichen Zielproteinen aufweist (**Abb 4.1.6**). Der Verlust der Fähigkeit Membranproteine zu ADP-ribosylieren könnte generell einen negativen *feed-back*-

Mechanismus darstellen, indem bei starker NAD-induzierter ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen die ARTC2.2 von der Zelloberfläche entfernt wird, um so eine zu starke ADP-Ribosylierung zu unterbinden. Im Fall der ADP-Ribosylierung von P2X7 könnte diese Regulation einen protektiven Effekt auf den Nukleotid-induzierten Zelltod (*nucleotide induced cell death*, NICD) haben. Bisherige Versuche zeigen aber, dass - nach Zugabe von NAD und anschließendem Waschen der Zellen - ein beginnender NICD nicht gestoppt werden kann (Seman *et al*, 2003). Ob die Dauer und die Konzentrationen des vorhandenen NADs in Entzündungsreaktionen *in vivo* diese Regulation möglich machen, ist nicht hinreichend untersucht. Da die Aktivierung von P2X7 nach ADP-Ribosylierung (aufgrund der kovalenten Modifikation) langanhaltend ist (Adriouch *et al*, 2008), ist jedoch anzunehmen, dass eine Aktivierung über ADP-Ribosylierung von P2X7, die zum *Shedding* von ARTC2.2 führt, auch NICD auslöst.

Es ist jedoch denkbar, dass T-Zellen durch einen anderen Stimulus, etwa eine kürzere, nicht zum Zelltod führende Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ATP (Adriouch *et al*, 2008) oder durch Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor (Kahl *et al*, 2000), ARTC2.2 abspalten und so für eine folgende NAD-Exposition desensibilisiert werden. Ob *in vivo* kurzzeitige lokale Anstiege der ATP-Konzentrationen vorkommen und ob diese ARTC2.2-*Shedding* induzieren können, ist bisher nicht hinreichend bekannt. Mature T-Zellen in der Peripherie zeigen eine geringere Expression von ARTC2.2 als naive T-Zellen auf der Zelloberfläche und sind somit resistenter gegenüber NICD (Koch-Nolte *et al*, 1999). Es ist daher vorstellbar, dass in Bereichen starker Inflammation T-Zellen, die spezifisch über ihren T-Zell-Rezeptor aktiviert wurden, überleben und eine effektive Immunantwort gewährleisten können, während naive, potentiell autoreaktive T-Zellen durch NICD entfernt werden (Seman *et al*, 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen (Tregs) besonders sensitiv gegenüber NICD sind und die Injektion von NAD eine Depletion von Tregs und folgend verstärkte anti-Tumorantworten im Mausmodell bewirkt (Hubert *et al*, 2010). Eine Desensibilisierung der Tregs durch ARTC2.2-*Shedding* würde somit eher antiinflammatorisch wirken.

In dieser Arbeit wurde mit Interferon- γ (IFN- γ) ein neues Zielprotein für die ARTC2.2-katalysierte ADP-Ribosylierung charakterisiert (**Abschnitt 4.2**). Ein spezifisches Motiv, das bestimmte Proteine als Zielproteine für die ARTC2.2 oder andere ARTCs kennzeichnet, ist bisher nicht bekannt. Ein Vergleich der ADP-Ribosylierungsstellen (ADPR-Stellen) von Zielproteinen der ARTC-Familie zeigt keine klare Sequenz-Spezifität; es zeigen sich aber einige übereinstimmende Eigenschaften in diesen Bereichen (**Tabelle 5.1**). Flankierend zu dem ADP-ribosylierten Arginin (ADPR-Arginin) sind häufig weitere Arginine und positiv geladene Aminosäuren. Von den 14 bekannten ADPR-Stellen weisen sechs mindestens ein weiteres Arginin auf, vier davon direkt neben dem Ziel-Arginin. Es findet sich bei elf Bereichen eine positive Nettoladung und nur in einem Bereich eine negative Nettoladung. Die ADPR-Stelle von IFN- γ zeigt mit zwei weiteren Argininen und zwei Lysinen eine fünffach positive Nettoladung.

Tabelle. 5.1: Die ADP-Ribosylierungsstelle von IFN- γ passt gut zu bereits bekannten ADP-Ribosylierungsstellen von Zielproteinen eukaryotischer ARTCs.

Es wurden je drei Aminosäuren vor und nach der ADP-Ribosylierungsstelle (ADPR-Stelle) des jeweiligen Zielproteins dargestellt. Die ADPR-Stellen wurden unterstrichen. Kationische Aminosäuren (R, H, K) wurden blau, anionische Aminosäuren (D, E) rot hervorgehoben. Es finden sich nahe der bisher bestätigten ADPR-Stellen häufig doppelte Arginine oder andere kationische Aminosäuren. Bei mehrfachen ADPR-Stellen in einem Protein wurden die häufiger auftretenden fett markiert.

Zielprotein	ADPR-Stelle	ADPR-Arginin	Spezies	ART	Referenz
IFN- γ	<u>LRKRKRS</u>	R128	Maus	ARTC2.2	diese Arbeit
P2X7	<u>YPRRGAQ</u>	R125	Maus	ARTC2.1+2	Seman <i>et al</i> , 2003
	<u>SSDRRCK</u>	R133			
HNP-1	<u>AGERRYG</u>	R14	Mensch	ARTC1	Paone <i>et al</i> , 2006
	<u>YQGRLWA</u>	R24			
Tuft	<u>TKPR</u>	R4	Huhn	Heterophilen-ART	Terashima <i>et al</i> , 1995
G-Protein β	<u>LKTREGN</u>	R129	Hamster		Lupi <i>et al</i> , 2000
Desmin	<u>QVSRTSA</u>	R48	Kaninchen	Muskel-ART	Zhou <i>et al</i> , 1996
	<u>RTTRVTP</u>	R62			
Aktin	<u>NELRVAP</u>	R95	Truthahn	Erythrozyten-ART	Just <i>et al</i> , 1995
	<u>IVHRKCF</u>	R372			
Aktin	<u>DAPRAVF</u>	R28	Huhn	Heterophilen-ART	Terashima <i>et al</i> , 1995
	<u>TAEREIV</u>	R206			
Kemptide	<u>LRRASL</u>	R2, R3	Huhn	Leber-ART	Matsuura <i>et al</i> , 1988

Es ist bekannt, dass die Zielspezifitäten von ARTC-Familienmitgliedern teilweise überlappen. Dies konnte z. B. für HNP-1 und LFA-1 gezeigt werden, die sowohl von ARTC1 als auch von ARTC2.2 ADP-ribosyliert werden können (Krebs *et al*, 2003; Paone *et al*, 2006). Eine Regulation der ADP-Ribosylierung über das räumliche Zusammentreffen von ARTC und Zielprotein ist daher wahrscheinlich. Diese

Regulation kann u. a. durch Expression auf unterschiedlichen Zellen und Geweben (Koch-Nolte *et al*, 2008) oder durch Anreicherung in bestimmten zellulären Bereichen erfolgen. Eine Assoziation der ARTC2.2 in *lipid rafts* wurde beschrieben, die Einfluss auf ihre Spezifität und Aktivität hat (Bannas *et al*, 2005).

Das *Shedding* der ARTC2.2 stellt eine weitere Möglichkeit der räumlichen Regulation der ADP-Ribosylierung dar. ADP-Ribosylierung ist bisher als intrazelluläre oder membrangebundene Reaktion beschrieben. ADP-Ribosylierungsaktivität konnte zuvor durch Induktion von *Shedding* im Überstand von T-Zellen nachgewiesen werden (Nemoto *et al*, 1996a; Kahl *et al*, 2000). ADP-ribosyliertes HNP-1 wurde als lösliches sekretiertes Protein in der bronchoalveolären Lavage von Rauchern nachgewiesen; es kann sowohl von membranständiger als auch von löslicher rekombinanter ARTC1 ADP-ribosyliert werden (Paone *et al*, 2002; 2006). Das einzige sekretierte Mitglied der ARTC-Familie, ARTC5, wird vorwiegend in Hoden und Muskelzellen exprimiert (Okazaki *et al*, 1996; Glowacki *et al*, 2001). Die ARTC5 besitzt zunächst eine NAD-Hydrolase-Aktivität und wandelt seine Aktivität erst nach Auto-ADP-Ribosylierung zu einer ADP-Ribosyltransferase-Aktivität (Weng *et al*, 1999) und ist hinsichtlich der Zielproteine sowie der physiologischen Bedeutung nicht näher charakterisiert (Koch-Nolte *et al*, 2008). Andere verwandte und nicht in der Zellmembran verankerte ADP-Ribosyltransferasen sind in der großen Gruppe bakterieller Toxine zu finden. Diese ARTs besitzen jedoch Mechanismen um in das Zytosol ihrer Zielzellen zu gelangen und ADP-ribosylieren intrazelluläre Proteine (Koch-Nolte *et al*, 2008; Menzel *et al*, 2013) (**Abb. 1.1**).

Die durch *Shedding* induzierte Verschiebung der Zielproteinspezifität der ARTC2.2 und die Möglichkeit nun sekretorische Proteine im Blut und anderen extrazellulären Flüssigkeiten zu erreichen, ergibt ein breites Spektrum an potentiellen neuen Zielmolekülen für die ADP-Ribosylierung. Es ist zu überprüfen, ob andere ARTC-Familienmitglieder, z. B. die auch im Menschen exprimierte ARTC1, auf ähnliche Weise reguliert und freigesetzt werden können.

Es konnte gezeigt werden, dass im Mausserum Proteine vorhanden sind, die von sARTC2.2 ADP-ribosyliert werden können. Diese stellen jedoch im Serum nur einen Bruchteil der vorhandenen Proteine dar; die meisten Serumproteine, wie z. B. Albumin, werden nicht oder nur sehr schwach ADP-ribosyliert (**Abb. 4.1.6**). Einige Zytokine wurden in dieser Arbeit als Zielproteine für sARTC2.2 identifiziert (**Abb. 4.2.1**). Eine Analyse der Sequenzen dieser ADP-ribosylierten Zytokine zeigt einige Arginine in basischer Umgebung, die potentielle ADPR-Stellen darstellen könnten

(Tabelle 5.2). Eine eindeutige Vorhersage der ADPR-Stellen ist jedoch aufgrund der Heterogenität der ADPR-Stellen in bekannten Zielproteinen nicht möglich. In den bekannten 3D-Strukturen liegen die meisten Arginine an der Proteinoberfläche und wären somit potentiell einer ADP-Ribosylierung zugänglich.

Tabelle. 5.2: Sequenzen ADP-ribosylierter Zytokine durch ARTC2.2.

Arginine sind rot, andere kationische Aminosäuren (H, K) blau dargestellt. Bereiche mehrerer Arginine bzw. kationischer Ladung sind unterstrichen.

Zytokin	Sequenz
IL-1 β	VPIRQLHYRLRDEQQKSLVLSDPYELKALHLNGQINQQVIFSMSFVQGEPNSNDKIPV ALGLKGKNLYLSCVMKDGTPTLQLESVDPKQYPKKKMEKR FVFNKIEVKS KVEFESA EFPNWIYSTSQAEHKPVFLGNNSGQDIIDFTMESVSS
IL-2	APTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRLMT FKFYLPKQATELKDLCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVVKLKGS DNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQ
IL-5	MEIPMSTVVKETLTQLSAHRALLTSNETMRLPVPTHKNHQLCIGEIFQGLDILKNQTVR GGTVEMLFQNLSLIKKYIDRQKEKCGEERRRTRQFLDYLQEF LGVMSTEWAMEG
IL-6	FPTSQVRRGDFTEDTTPNRPVYTTTSQVGGGLITHVLWEIVEMRKELCNGNSDCMND DALAENNLKLPKPEIQRNDGQYQTGYNQEICLLKISSGLLEYHSYLEYMKNNLKDNKKDK ARVLQRDRTETLIHIFNQEVKDLHKIVLPTPISNALLTDKLESQKEWLRTKTIQFILKSLEE FLKVTLRSTRQT
IL-12A	RVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREK LKH YSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKT CLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYPQTEFQAIN AALQNH H QQIILDKGMVAIDELMQLSNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKL CILLH AFSTRVV TINR VMGYLSSA
IL-17	AAIIPQSSACPNTAEAKDFLQNVKVN L KVFN SLGAKVSS RRPSDYLN R STSPWTLHRN EDPD R YPSVIWEAQC RHQ RCVNAEGKLDH HMNSVLIQ QEILV L KREPESCPFTF R VE KMLVGVGCTCVASIVRQAA
TNF α	LRSSSQNSSDKPVAHV VAN HQVEEQLEWLSQRANALLANGMDL KDNQLVVPADGLY LVYSQVLFKGGQCPDYVLLTHTVSRFAISYQEKVNLLSAV KSP CPKDTPEGAEL KPW YEPIYLG GVFQLEK GDQLSAEVNLPKYLDFAESGQVYFGVIAL
IFN- γ	HGTVIESLES LNNYFNSSGIDVEEK SLFLDIW R NWQKDGDMKILQSQIISFYLR L FEVL KDNQAISNNISVIESHLITFFS NSKAKK DAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIR V VHQ LLPESSL RKR R S R C

Es ist von unserer Gruppe gezeigt worden, dass auch das proinflammatorische humane TNF α von humaner löslicher ARTC1 (durch Phospholipase C von der Zelloberfläche gespalten und aufgereinigt) *in vitro* ADP-ribosyliert und inhibiert werden kann (Laing, 2010; Laing *et al*, 2011).

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals die Verbindung aus Freisetzung einer ADP-Ribosyltransferase durch einen physiologischen Stimulus mit einer daraus resultierenden Möglichkeit, Zytokine zu ADP-ribosylieren.

5.2 Funktionelle Konsequenzen der ADP-Ribosylierung von Interferon- γ

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ARTC2.2 nach Nukleotid-induziertem *Shedding* Zytokine - bevorzugt IFN- γ - ADP-ribosylieren kann (**Abb. 4.2.1**). Die ADP-Ribosylierung ist eine reversible Modifikation und es wurde gezeigt, dass ADP-ribosyliertes IFN- γ durch die ADP-Ribosyl-Hydrolase 1 (ARH1) de-ADP-ribosyliert werden kann (Oka *et al*, 2006; Kernstock, 2007) (**Abb. 4.2.2**). Eine weitere Möglichkeit des Verlustes der ADP-Ribosegruppe stellt die nicht-enzymatische Konversion des ADPR-Arginins zu Ornithin dar. Diese kann einerseits spontan *in vivo* auftreten (Stevens *et al*, 2009), aber auch künstlich in der Massenspektrometrie durch Kollisions-induzierte Dissoziation (*collision-induced dissociation*, CID) induziert werden (Laing *et al*, 2011) (**Abb. 5.2**). Hierbei wird die Guanidinogruppe des Arginins zu einer Aminogruppe verkürzt. Ornithin ist keine proteinogene Aminosäure und kann somit von den anderen Aminosäuren in der Massenspektrometrie unterschieden werden. Des Weiteren wird bei der CID das entstehende ADP-Ribose-Carbodiimid teilweise in kleinere Produkte gespalten, die einen „Fingerabdruck“ aus ADP-Ribose-Carbodiimid, ADP, AMP und Adenosin darstellen. Hierdurch lassen sich die ADP-ribosylierten Peptide und das ADP-ribosylierte Arginin in der Massenspektrometrie identifizieren. Auf diese Weise konnte Arginin 128 als ADP-Ribosylierungsstelle bestimmt werden (**Abb. 4.2.3**).

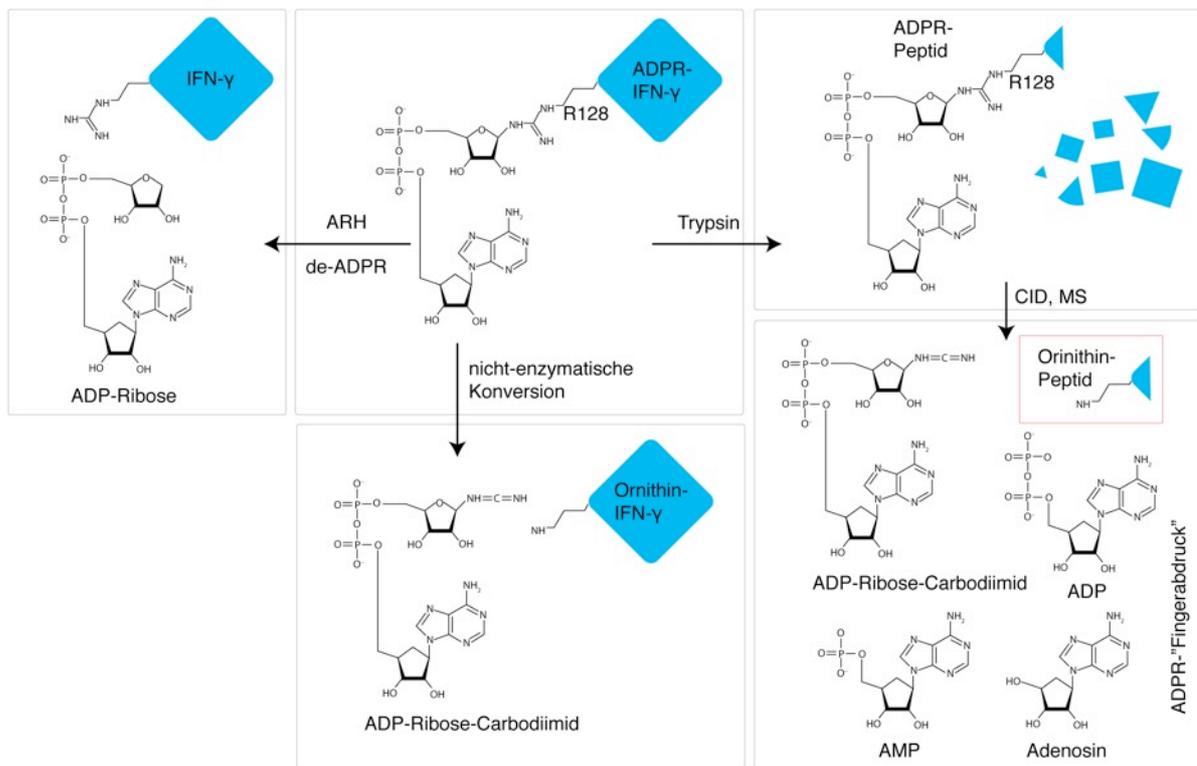


Abb. 5.2: ADP-ribosyliertes Arginin kann über Konversion zu Ornithin in der Massenspektrometrie identifiziert werden.

Murines IFN- γ (blau) kann enzymatisch durch eine ADP-Ribosyl-Hydrolase (ARH) de-ADP-ribosyliert oder zu Ornithin umgewandelt werden. Diese Reaktion kann spontan im Sinne einer nicht-enzymatischen Konversion ablaufen oder z. B. durch Kollisions-induzierte Dissoziation (CID) in der Massenspektrometrie induziert werden. Ornithin ist keine proteinogene Aminosäure und kann somit in weiterer Massenspektrometrie von den Argininen unterschieden werden. Des Weiteren entsteht bei der Massenspektrometrie ein „Fingerabdruck“ der ADP-Ribosylierung, bestehend aus ADP-Ribose-Carbodiimid und den Bruchstücken ADP, AMP und Adenosin.

Das als ADPR-Stelle von IFN- γ identifizierte Arginin 128 (**Abb. 4.2.3**) befindet sich in dem positiv geladenen C-Terminus von IFN- γ , fünf Aminosäuren vor dem C-terminalen Cystein, das für die Dimerisierung des IFN- γ verantwortlich ist. Die Dimerisierung von IFN- γ interferiert nicht mit der ADP-Ribosylierung (**Abb. 4.2.1 C**). Jedoch verhindert die Bindung von IFN- γ an eine lösliche Form des Interferon- γ -Rezeptors 1 (IFNGR1) die ADP-Ribosylierung von IFN- γ (**Abb. 4.2.4**). Dies lässt eine sterische Unvereinbarkeit von Rezeptorbindung und ADP-Ribosylierung vermuten. Die C-terminale Region von IFN- γ ist offensichtlich wichtig für die biologische Aktivität (Seelig *et al*, 1988; Lundell *et al*, 1991; Haelewyn *et al*, 1997; Subramaniam *et al*, 2001; Ahmed *et al*, 2003). Humanes IFN- γ ist als löslicher Dimer sowie gebunden an den IFNGR1 kristallisiert worden, die Struktur des C-Terminus von IFN- γ konnte jedoch bisher nicht aufgelöst werden (Walter *et al*, 1995; Thiel *et al*, 2000; Randal & Kossiakoff, 2001). Für die Interaktion von murinem IFN- γ mit seinem Rezeptor gibt es bisher keine 3D-Strukturen, weshalb das murine IFN- γ auf das humane IFN- γ modelliert wurde, um die räumliche Lage des C-Terminus zu untersuchen (**Abb. 5.3**). Es zeigt sich eine Bindung des IFN- γ -Dimers mit zwei IFNGR1, bei der jeder Monomer des IFN- γ an ein IFNGR1-Molekül bindet. Die Bindung im N-terminalen Bereich von IFN- γ ist in der 3D-Struktur gut zu sehen, der

C-Terminus der Struktur endet jedoch bei Lysin 125, acht Aminosäuren (AS) vor dem eigentlichen C-Terminus und drei AS vor dem ADP-ribosylierten Arginin 128. Lysin 125 befindet sich bei Rezeptorbindung auf der zellzugewandten Seite und ragt leicht aus dem IFN- γ -Molekül heraus. Die Tatsache, dass die räumliche Struktur des C-Terminus nicht bestimmt werden konnte, spricht dafür, dass keine starre, sondern eher eine flexible, z. B. auf elektrostatischen Wechselwirkungen basierende Bindung vorliegt. In der Nähe zum IFN- γ -C-Terminus befindet sich ein Bereich des Rezeptors, der einige negativ geladene AS enthält und der für den IFN- γ C-Terminus zugänglich wäre. In diesem Bereich befindet sich ebenfalls ein nicht definierter Bereich in der Struktur des IFNGR1 von drei Aminosäuren. Es wurde von Walter et al. postuliert, dass der positiv geladene IFN- γ C-Terminus diesen negativ geladenen Bereich des Rezeptors in einer elektrostatischen Wechselwirkung bindet (Walter *et al*, 1995).

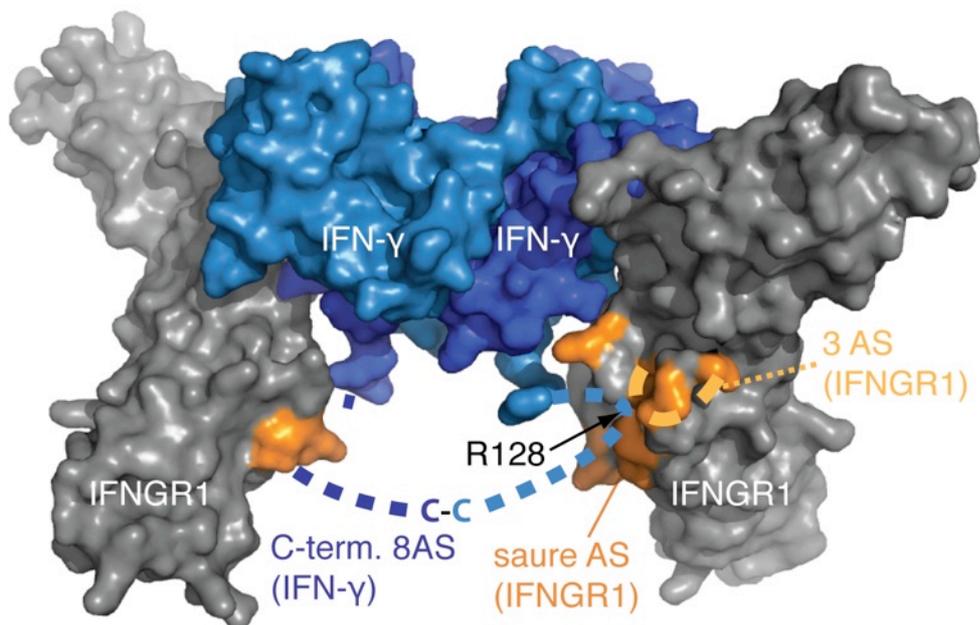


Abb. 5.3: IFNGR1 besitzt mögliche Bindungsstellen für den IFN- γ -C-Terminus.

Murines IFN- γ (hellblau-dunkelblauer Dimer) wurde auf die Struktur des humanen IFN- γ -Dimers im Komplex mit dem IFN- γ -Rezeptor 1 (IFNGR1) (grau) modelliert. In der Struktur konnte der C-Terminus von IFN- γ nicht dargestellt werden. Die letzte AS der Struktur ist L125, drei AS von R128 und acht AS vom C-Terminus des IFN- γ entfernt. Die fehlenden stark basischen AS RKRKRSRC sind durch blau gestrichelte Linien symbolisiert. Ebenfalls fehlt ein kleiner Bereich des Rezeptors: die drei AS VDY, die durch eine hellorange gestrichelte Linie symbolisiert sind. Im IFNGR1 sind einige saure AS in der Nähe des C-Terminus von IFN- γ vorhanden (dunkelorange). Die C-terminalen Cysteine bilden eine Disulfidbrücke, die beide Monomere miteinander verbindet (C-C). Für das Modellieren mittels SWISS-MODEL des murinen IFN- γ und die Darstellung des IFNGR1 wurde die Struktur von humanem IFN- γ mit INFR1 verwendet (Thiel *et al*, 2000) (pdb-id: 1fg9).

Eine weitere mögliche Rolle des C-Terminus des IFN- γ wird kontrovers diskutiert: die polybasische Sequenz (RKRKRSRC) weist starke Ähnlichkeiten zu der prototypischen nukleären Lokalisationssequenz (PKKKRKV) des SV40-Virus auf und könnte dafür sorgen, dass IFN- γ nach Translokation in die Zelle in den Zellkern einwandert und als Transkriptionsfaktor wirkt (Bader & Weitzerbin, 1994;

Subramaniam *et al*, 1999; Schroder *et al*, 2004; Johnson *et al*, 2013). Eine Inhibition der Wirkung als nukleäre Lokalisationssequenz durch ADP-Ribosylierung aufgrund der Veränderung von Ladung und räumlicher Struktur im C-Terminus von IFN- γ wäre plausibel.

Die Bindung von IFN- γ an den Rezeptor bewirkt eine intrazelluläre Signaltransduktion über JAK1 und JAK2, die zu einer Phosphorylierung von STAT1 führt (Darnell *et al*, 1994) (Darnell, 1997). STAT1 wandert in den Nukleus ein und induziert die Transkription der Zielgene (Darnell *et al*, 1994; Nardozzi *et al*, 2010). In vielen Zellen, z. B. in Makrophagen und Podozyten, wird hierdurch das Immunoproteasom induziert, das vermehrt Peptide erzeugt, die über MHC präsentiert werden können (Mosmann & Coffman, 1989; Szabo *et al*, 2003; Schroder *et al*, 2004; Seifert *et al*, 2010). In dieser Arbeit konnte in zwei unabhängigen Versuchen gezeigt werden, dass die ADP-Ribosylierung von IFN- γ an R128 eine Hemmung der biologischen Funktion zur Folge hat. Zum einen wird die STAT1-Phosphorylierung in Makrophagen durch ADP-Ribosylierung von IFN- γ reduziert und durch de-ADP-Ribosylierung wieder auf die ursprüngliche Stärke zurückgeführt (**Abb. 4.2.5**), zum anderen wird die Induktion des Immunoproteasomes in Podozyten durch ADP-Ribosylierung gehemmt (**Abb. 4.2.6**).

Auf T-Zellen bewirkt IFN- γ eine Konversion zu Th1-Zellen und eine Inhibierung der Th2-Polarisierung, sodass das immunologische Gleichgewicht zugunsten der Th1-Seite verschoben wird (Mosmann & Coffman, 1989; Abbas *et al*, 1996; Bradley *et al*, 1996). Das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Immunantworten ist entscheidend für die Kontrolle von Pathogenen und Autoimmunerkrankungen (Abbas *et al*, 1996; Bradley *et al*, 1996; Rauch *et al*, 2013). Aufgrund der Ergebnisse der funktionellen Versuche zur IFN- γ -Aktivität ist anzunehmen, dass die ADP-Ribosylierung von IFN- γ eine Th1-Polarisierung behindert (**Abb 5.4**). Die Th1-Immunantwort ist proinflammatorisch und durch hohe zytotoxische Aktivitäten und zellvermittelte Immunität charakterisiert, die gegen intrazelluläre Pathogene, aber auch gegen Tumore wirken (Mosmann & Coffman, 1989; Abbas *et al*, 1996). Eine starke Aktivierung der Th1-Achse ist mit Autoimmunreaktionen des Typs IV wie z. B. Kontaktdermatitis, Morbus Crohn, Diabetes mellitus Typ1 und anderen inflammatorischen Erkrankungen assoziiert (Abbas *et al*, 1996; Hommes *et al*, 2006; Rauch *et al*, 2013; Blom & Poulsen, 2013).

5.3 Herstellung und Charakterisierung ADAM17-spezifischer Antikörper

In dieser Arbeit wurden spezifische Antikörper gegen ADAM17 auf zwei unterschiedliche Weisen hergestellt. Zwei monoklonale Antikörper (ST127 und ST161) wurden generiert, indem aus der RNA peripherer Blutlymphozyten aus immunisierten Lamas Phagenbibliotheken kloniert und Nanobodies durch Phagen-Display selektioniert wurden. Die Nanobodies wurden durch genetische Fusion an ein Kaninchen-IgG-Fc-Fragment als rekonstituierte Schwere-Ketten-Antikörper (Nanobody-Fc, NbFc) in eukaryotischen Zellen produziert. Des Weiteren wurde aus dem Serum eines immunisierten Kaninchens ein polyklonaler Antikörper (K133) gewonnen. Diese Antikörper wurden hinsichtlich ihrer Funktionalität in unterschiedlichen immunologischen Methoden, ihrer Bindungsepitope und ihrer Affinitäten charakterisiert. Zum Vergleich wurde der zuvor publizierte Variablen-Fragment-Einzelketten-Antikörper (*single chain variable fragment*, scFv) D1A12 (Tape *et al*, 2011) analog zu den Nb-Fc-Fusionsproteinen als scFv-Fc kloniert und produziert. Die neu generierten Nb-Fc-Fusionsproteine ST127-Fc und ST161-Fc und der polyklonale Antikörper K133 zeigen eine spezifische ADAM17-Bindung in ELISA (**Abb. 4.3.5**), Immunfluoreszenzmikroskopie (**Abb. 4.3.7**) und Western-Blot (**Abb. 4.3.6**). ST127 bindet die katalytische Domäne von humaner und muriner ADAM17, ST161 bindet die Prodomäne mit Präferenz für murine ADAM17 (**Abb. 4.3.6**). Der polyklonale Kaninchenantikörper K133 enthält Antikörper sowohl gegen die katalytische als auch gegen die Prodomäne (**Abb. 4.3.6**). ST127-Fc und ST161-Fc binden ihre Epitope mit hohen Affinitäten von unter 1 nM (**Abb. 4.3.9**). Die Bindung von D1A12 erfolgt über beide Domänen; die VH bindet die Disintegrindomäne, die VL die katalytische Domäne (Tape *et al*, 2011). Daher ist die Bindung an die trunkierte Form aus katalytischer Domäne und Prodomäne (Kat-Pro) deutlich schwächer als an die gesamte Ektodomäne (Kat-Dis-MPD). D1A12 erkennt die humane katalytische und Prodomäne zwar in der Immunfluoreszenz und kann die humane katalytische Domäne unter den gewählten Bedingungen inhibieren (**Abb. 4.3.6**), zeigt aber keine bzw. nur eine äußerst schwache Bindung an die humane katalytische Domäne im ELISA (**Abb. 4.3.9**). Im Gegensatz zu D1A12-Fc erkennen K133, ST127 und ST161 die trunkierte Form aus katalytischer Domäne und Prodomäne auch im ELISA, da sie nicht auf die Bindung an andere Domänen von ADAM17 angewiesen sind (**Abb. 5.5**).

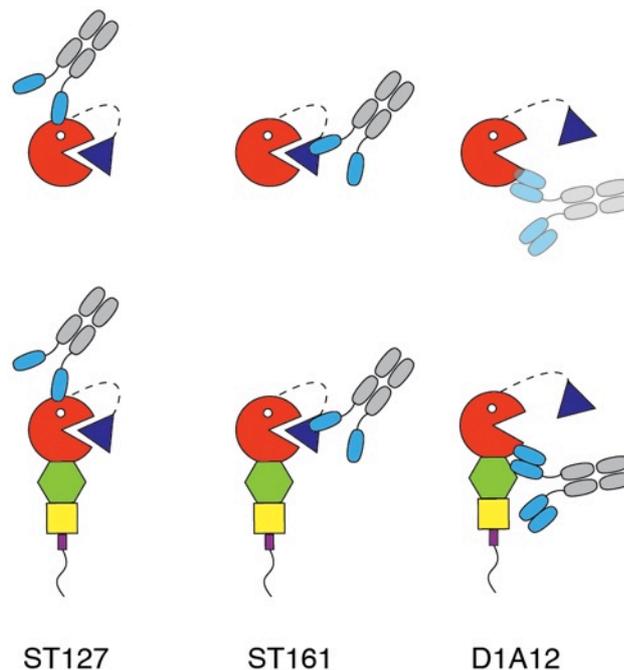


Abb. 5.5: Die generierten Antikörper ST127, ST161 und D1A12 binden unterschiedliche Domänen von ADAM17.

ST127 bindet die katalytische Domäne, ST161 bindet die Prodomäne. Beide Nanobody-Fc-Fusionsproteine erkennen das Vollängenkonstrukt der ADAM17 (unten) sowie eine trunke Form aus katalytischer Domäne und Prodomäne (Kat-Pro) (oben). Das scFv-Fc-Fusionsprotein D1A12-Fc bindet an die Disintegrindomäne (mit der VH) sowie die katalytische Domäne (mit der VL) des Vollängenproteins. D1A12 erkennt ADAM17 Kat-Pro nicht im ELISA, jedoch in transfizierten Zellen in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Die Antikörper sind schematisch in ihrer Domänenstruktur dargestellt. Domänen, die an der Antigenbindung beteiligt sind, wurden blau hervorgehoben. Die ADAM17-Domänen sind farblich getrennt: Katalytische Domäne (rot), Prodomäne (blau), Disintegrindomäne (grün), Membran-proximale-Domäne (gelb), Transmembrandomäne (violett) und zytosolische Domäne (schwarz).

Es wurden somit wertvolle Antikörper gegen ADAM17 mittels zweier unterschiedlicher Methoden erzeugt. Die Klonierung des Immunrepertoires aus immunisierten Lamas erzielt hochaffine, stabile, in hoher Ausbeute produzierbare und gut reformatier- und modifizierbare monoklonale Antikörper (Wesolowski, 2006; Muyldermans, 2013). Die Immunisierung eines Kaninchens stellt eine vergleichsweise schnelle, einfache und günstige Methode der Generierung von (polyklonalen und polyspezifischen) Antikörpern dar. Die Lamas und das Kaninchen wurden mit cDNA-Expressionsvektoren immunisiert. So gewonnene Antikörper erkennen meist das native Protein und sind damit für viele Fragestellungen und Anwendungen, z. B. der Detektion ihrer Antigene auf oder in lebenden oder fixierten Zellen, geeignet (Haynes *et al*, 1996; Adriouch *et al*, 2005; Möller *et al*, 2007). Die in dieser Arbeit generierten Antikörper haben aufgrund ihrer unterschiedlichen Natur und Spezifitäten einen großen Einsatzbereich. Die monoklonalen Nanobody-Fc-Fusionsproteine ST127 und ST161 können eingesetzt werden, um die mature Form

und Präkursor von ADAM17 voneinander zu unterscheiden. Aufgrund der Bindung an unterschiedliche Epitope sind diese Antikörper ebenso wie K133 möglicherweise auch für einen Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von muriner ADAM17 zu verwenden, der bisher nur ungenügend ist (Trad *et al*, 2011). Außerdem können die hier generierten Antikörper ADAM17 auf lebenden Zellen und in Zelllysaten mittels FACS, IFM und Western-Blot nachweisen. Bisher gibt es eine unzureichende Auswahl an monoklonalen Antikörpern gegen murine ADAM17 und ST127 und ST161 könnten diese Lücke schließen.

5.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Modulation der Substratspezifität von ARTC2.2 durch *Shedding* und die Inhibition von IFN- γ durch ADP-Ribosylierung deuten auf einen regulatorischen Mechanismus in inflammatorischen Zuständen. NAD wird von beschädigten Zellen freigesetzt und fungiert zum einen als Gefahrensignal (Adriouch *et al*, 2008) und dient zum anderen ARTC2.2 als Substrat für die ADP-Ribosylierung ihrer Zielproteine (Koch-Nolte *et al*, 1996). Die ADP-Ribosylierung von P2X7 aktiviert diesen Ionenkanal und induziert über ADAM-Proteasen das *Shedding* verschiedener immunologisch wichtiger Membranproteine wie z. B. CD62L von der Oberfläche von T-Zellen, und kann zum NAD-induzierten Zelltod (NICD) führen (**Abb. 5.6**) (Seman *et al*, 2003; Scheuplein *et al*, 2009). Die Beobachtung, dass sARTC2.2 Zytokine ADP-ribosylieren kann und so das proinflammatorische Leitzytokin IFN- γ inhibiert, deutet auf einen antiinflammatorischen Effekt des ARTC2.2-*Shedding*.

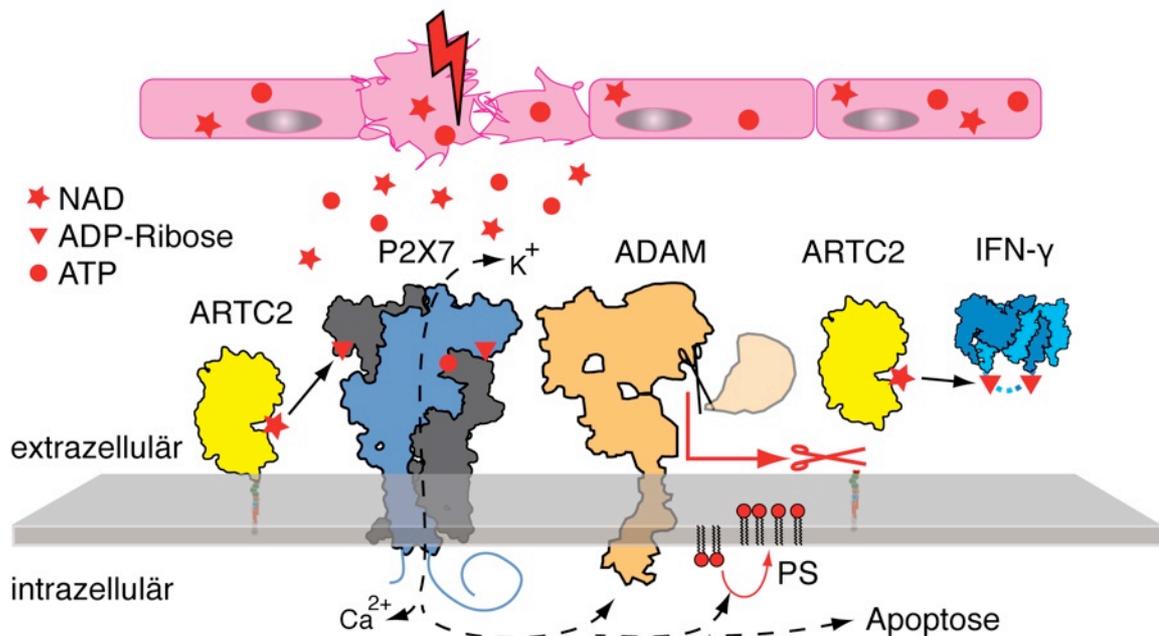


Abb. 5.6: Nukleotid-induzierte Proteolyse der ARTC2.2 reguliert IFN- γ .

In inflammatorischen Prozessen werden Nukleotide wie NAD (roter Stern) und ATP (roter Kreis) freigesetzt und können den Purinrezeptor P2X7 aktivieren. Diese Aktivierung kann entweder durch Bindung des Liganden ATP oder durch ARTC2.2-vermittelte ADP-Ribosylierung induziert werden. Eine Öffnung des P2X7 Ionenkanals bewirkt einen Einstrom von Kalziumeinstrom, einen Ausstrom von Kaliumionen, die Exposition von Phosphatidylserin und aktiviert ADAM10 und ADAM17. ARTC2.2 ist nicht nur Initiator, sondern auch Ziel des *Sheddings* und wird als aktives Enzym von der Zelloberfläche abgestoßen. Hiermit verliert die ARTC2.2 die Fähigkeit, Membranproteine zu ADP-ribosylieren und ADP-ribosyliert nun bevorzugt sekretorische Proteine wie Zytokine. IFN- γ ist ein prominentes Ziel der ADP-Ribosylierung durch sARTC2.2 und wird hierdurch inhibiert.

Die neuen Antikörper ST127, ST161 und K133 stellen wertvolle Werkzeuge dar, um ADAM17 zu analysieren. Da verschiedene Domänen erkannt werden, kann zwischen prozessierter Form und Präkursor unterschieden werden. Somit könnte die Prozessierung durch Furin verfolgt, und die Umstände, unter denen die Reifung von ADAM17 erfolgt, näher untersucht werden. Die Entwicklung eines Sandwich-ELISAs zur Detektion und Quantifizierung von ADAM17 könnte ein hilfreiches Werkzeug zur Charakterisierung von ADAM17 darstellen. Durch die Kombinationen K133 - ST127 und K133 - ST161 könnten vergleichende ELISAs für die katalytische Domäne und Prodomäne entwickelt werden, sodass der prozentuale Anteil der prozessierten Form bestimmt werden könnte. Ein weiteres interessantes Anwendungsgebiet könnte die Klonierung von Chromobodies sein, in denen ein fluoreszierendes Protein, z. B. GFP, mit den Nanobodies fusioniert wird (Rothbauer *et al*, 2006). Mit diesen Konstrukten können Zellen transfiziert werden, um Veränderungen der subzellulären Lokalisation von ADAM17 nach Aktivierung mit unterschiedlichen Stimuli zu verfolgen.

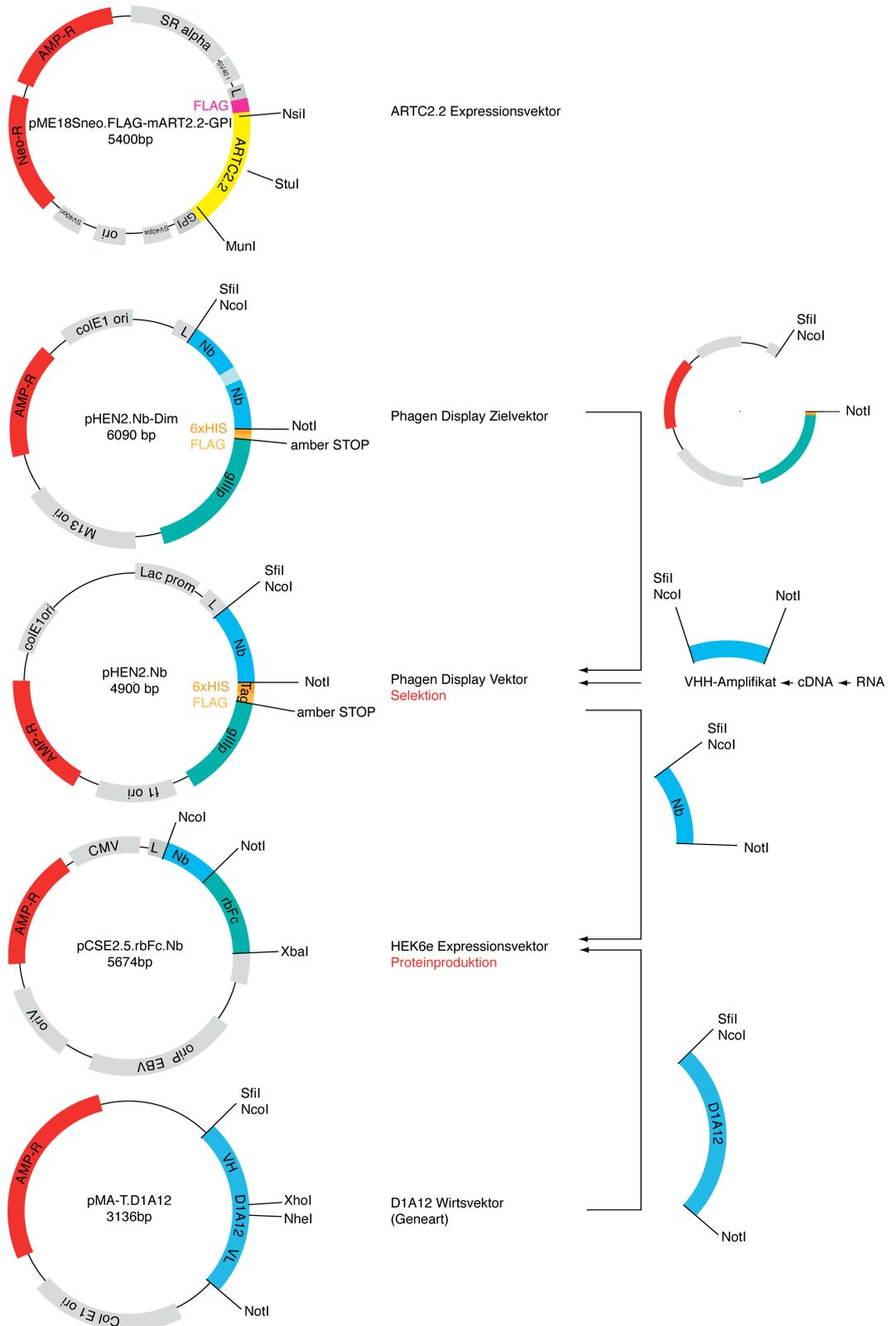
Das Nukleotid-induzierte *Shedding* enzymatisch aktiver ARTC2.2 stellt eine hier neu beschriebene Möglichkeit für T-Zellen dar, auf extrazelluläre Nukleotide zu reagieren. Eine umfassende Analyse sekretorischer Proteine als mögliche Ziele der sARTC2.2-vermittelten ADP-Ribosylierung kann weiteren Aufschluss über diesen Regulationsmechanismus liefern. Zur Überprüfung der physiologischen Relevanz des Nukleotid-induzierten *Sheddings* wären vergleichende Analysen der ADP-Ribosylierungsaktivität bzw. der Nachweis von sARTC2.2 im Serum unter physiologischen bzw. inflammatorischen Bedingungen sinnvoll. Geeignete Mauslinien für diese Untersuchungen wären u. a. BALB/c^{ARTC2B6}, die eine starke ARTC2.2-Expression und eine hohe Sensitivität gegenüber Nukleotid-induziertem *Shedding* aufweist, BALB/c- und C57BL/6-WT-Linien sowie die jeweiligen ARTC2-defizienten Linien, die im Institut für Immunologie vorhanden sind. In diesen Mausmodellen könnten auch *in-vivo*-ADP-ribosylierte Proteine im Serum mit Hilfe der Massenspektrometrie nachgewiesen werden. In ARTC- und P2X7-kotransfizierten Zellen kann überprüft werden, ob auch andere ARTC-Familienmitglieder, z. B. die ARTC1, durch *Shedding* freigesetzt werden können.

Um die Inhibition von IFN- γ durch ADP-Ribosylierung näher zu untersuchen, wäre eine Überprüfung des Einflusses von ADP-ribosyliertem IFN- γ auf die Polarisierung von T-Zellen durch vergleichende Inkubation von T-Zellen *ex vivo* mit IFN- γ und ADP-ribosyliertem IFN- γ sinnvoll. Eine Aufreinigung von ADP-ribosyliertem IFN- γ aus Serum in inflammatorischen Mausmodellen oder nach i.v.-Injektion von NAD könnte die physiologische Relevanz dieses Mechanismus weiter untermauern. Ein möglicher therapeutischer Nutzen der ADP-Ribosylierung könnte ebenfalls in inflammatorischen Mausmodellen getestet werden, indem rekombinant hergestellte sARTC2.2 i.v. gegeben, und die Schwere der Inflammation verfolgt wird.

Der hier erstmalig vorgestellte Mechanismus der Nukleotid-induzierten Freisetzung einer ADP-Ribosyltransferase zeigt das Potential der Regulation von Immunreaktionen durch ADP-Ribosylierung.

6 Anhang

6.1 Plasmidkarten



6.2 Sequenzen

6.2.1 Sequenzen der anti-ADAM17-Antikörper

ST127

MGWSCIIILFLVATATGAHSM~~AOVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS~~**GRTFSSYGM**WFRQAP
GKREFVGS**ISTSGGS**THYADSVKGRFTISRDNANTVY~~LQMNLSLKAEDTAVYYCAG~~**ATPGT**
RWSYWGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAH~~HHHHHGAAEQKLI~~SEEDLN~~GAA~~

ST127-rbFc

MGWSCIIILFLVATATGAHSM~~AOVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS~~**GRTFSSYGM**WFRQAP
GKREFVGS**ISTSGGS**THYADSVKGRFTISRDNANTVY~~LQMNLSLKAEDTAVYYCAG~~**ATPGT**
RWSYWGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAASTC**SKPTCPPPELLGGPSVFI**FPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQV**RTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKE**
FKCKVHNKALPAPIEK**TISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVE**
WEKNGKAE

ST161

MGWSCIIILFLVATATGAHSM~~AOVQLQESGGGLVQGGSLRLSCAAS~~**GTAFSINSM**GWYRQAP
GKSRELVAT**ITSGGN**TNYADSVKGRFTISRDI**VKN**TVY~~LQMDSLKPEDTDVYYCYAG~~**VFPTY**
GDYVRHSSFASWGQGTQVTVSSEPKTPKPQ**PAAAH**HHHHHGAAEQKLISEEDLN~~GAA~~

ST161-rbFc

MGWSCIIILFLVATATGAHSM~~AOVQLQESGGGLVQGGSLRLSCAAS~~**GTAFSINSM**GWYRQAP
GKSRELVAT**ITSGGN**TNYADSVKGRFTISRDI**VKN**TVY~~LQMDSLKPEDTDVYYCYAG~~**VFPTY**
GDYVRHSSFASWGQGTQVTVSSEPKTPKPQ**PAAASTC**SKPTCPPPELLGGPSVFI**FPPKPKD**
TLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQV**RTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQ**
DWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEK**TISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFY**
PSDISVEWEKNGKAE

D1A12

MGWSCIIILFLVATATGAHSM~~AEVQLVESGGGLVVRPGGSLRLSCAAS~~**GFTFSSYAMS**WVRQAP
GKGLEWVSA**ISGSGGS**TYYADSVKGRFTISRDN**T**KNSLYLQMTSLRADD**TAFYYCVKDFGPG**
YGTGWFDYWGPGLTVTVLEGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSSLSASV**GDRVTITCRASQS**
ISSYLNWYQOKPGKAPKLLIH**DASSLQ**SGVPSRFSGSGSGTDFTLT**ISSLQPEDFATYYCQQ**
SFSIPLTFGGGTKMDIKRAAAHHHHHGAAEQKLISEEDLN~~GAA~~

D1A12-rbFc

MGWSCIIILFLVATATGAHSM~~AEVQLVESGGGLVVRPGGSLRLSCAAS~~**GFTFSSYAMS**WVRQAP
GKGLEWVSA**ISGSGGS**TYYADSVKGRFTISRDN**T**KNSLYLQMTSLRADD**TAFYYCVKDFGPG**
YGTGWFDYWGPGLTVTVLEGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSSLSASV**GDRVTITCRASQS**
ISSYLNWYQOKPGKAPKLLIH**DASSLQ**SGVPSRFSGSGSGTDFTLT**ISSLQPEDFATYYCQQ**
SFSIPLTFGGGTKMDIKRAAA**ASTC**SKPTCPPPELLGGPSVFI**FPPKPKDTLMISRTPEVTCV**
VVDVSQDDPEVQFTWYINNEQV**RTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLR**

Komplement-Determinierende Regionen (CDRs): **CDR1**, **CDR2**, **CDR3**
Leader-Sequenz / His+Myc-Tag / Kaninchen-Fc-Domäne
Linker in D1A12

6.2.2 Alignment von ADAM17-Sequenzen aus Mensch, Maus und Lama

	Signalpeptid	1	Prodomeäne	102
H.s.	MRQSLFLTSVVPFLAPRPDPDPGFPHORLEKLSLLSDYDILSLSNIQQHSVRKRDLQSTHVTLLTFSSALKRHFKLYLTSSTERSQNFKVVVVDGKNESEYTVKWQDFFTGHVV			
M.m.	MRRRLILTLVFLVAPRPEEAGSGHPRLEKLSLLSDYDILSLSNIQQHSIRKRDLQSAHLETLTFSSALKRHFKLYLTSSTERSQNLRVVVVDGKNESEYVSKWQNFSGHVV			
V.p.	MRQCFLASLVPLAPRPDPKPGFSPORLEKLSLLSDYDILSLSNIQQHSVRKRDLQASTHLETLTFSSALKRHFKLYLTSSTERSQNFKVVVVDGKNESEYVVKWQDFFGSHVV		205	222
H.s.	GEPSRVLAHIRDDVDLIRINTDGAFYNIPLWRFVNDTKRMLVYKSEDIKNVSRLOSPKVCGYLKVDFNEELLPKGLVDREPEELVHRVKRRADDPMPKNTCKLLVVADHRFYRYMG			
M.m.	GEPSRVLAHIGDDVTVRINTDGAFYNVEPLWRFVNDTKRMLVYKSEDIKDFSRLOSPKVCGYLNAESELLPKGLVDREPEEFVRRVKRRAEPLKNTCKLLVVADHRFYRYMG			
V.p.	GEPSRVLAHIGDPTIRINTDGVBYNIPLWRLINDTKRMLVYKSEDIKNVSRLOSPKVCGYIKANNEELLPKGLVDREPPHELVHRVRRADPNPKNTCKLLVVADHRFYRYMG			
H.s.	RGEESTTNLYLIELIDRVDDIYRNTSWDNAGFKGYGIEQIRILKSPQEVKPGEKHYNMAKSYPNEEKDAWDVKMLLEQFSFDIAEEASKVLAHLFTYQDFDMGTLGLAYVGSFRANS	katalytische Domäne		
M.m.	RGEESTTNLYLIELIDRVDDIYRNTSWDNAGFKGYGIEQIRILKSPQEVKPGERHFNMAKSFNPEEKDAWDVKMLLEQFSFDIAEEASKVLAHLFTYQDFDMGTLGLAYVGSFRANS			
V.p.	RGEESTTNLYLIELIDRVDDIYRNTSWDNAGFKGYGIEQIRILKSPQEVKPGERHYNMAKSYPNEEKDAWDVKMLLEQFSFDIAEEASKVLAHLFTYQDFDMGTLGLAYVGSFRANS		456	462
H.s.	HGGVCPKAYYSPVGGKNIYLNGLTSTKNYKTIILTKPADLVTTHELGHNFGAEHDPDGLAEACAPNEDQGGKYVMYPIAVSGDHENNKMFNSCSKQSIYKTIESKAQECFQEHSNKVCVGN			
M.m.	HGGVCPKAYYNPVFKNIYLNGLTSTKNYKTIILTKPADLVTTHELGHNFGAEHDPDGLAEACAPNEDQGGKYVMYPIAVSGDHENNKMFNSCSKQSIYKTIESKAQECFQEHSNKVCVGN			
V.p.	HGGVCPKAYYSPIGKNIYLNGLTSTKNYKTIILTKPADLVTTHELGHNFGAEHDPDGLAEACAPNEDQGGKYVMYPIAVSGDHENNKMFNSCSKQSIYKTIESKQECFQEHSNKVCVGN	Disintegrindomäne	561	582
H.s.	SRVDEGEEDPGIMYLNNDTCCNSDCTLKGVQCSDRNSPCCKNCFETAQKKCQEAINATCKGVSYCTGNSSECCPPP			
M.m.	SRVDEGEEDPGIMYLNNDTCCNSDCTLKGVQCSDRNSPCCKNCFETAQKKCQEAINATCKGVSYCTGNSSECCPPP			
V.p.	SRVDEGEEDPGIMYLNNDTCCNSDCTLKGVQCSDRNSPCCKNCFETAQKKCQEAINATCKGVSYCTXX	Membran-proximale Domäne	654	702
H.s.	KVCCRDLSGRCVPYVDAEQKNLFLRKGKPCTVGFCDMNGKCEKRVQDVIERWDFIDQLSINTFGKFLADNIVGSVLVFSILFWIPFSILVHC		Transmembran	676
M.m.	KVCCRNLSGPCVPYVDAEQKNLFLRKGKPCTVGFCDMNGKCEKRVQDVIERWDFIDQLSINTFGKFLADNIVGSVLVFSILFWIPFSILVHC			
V.p.	KVCCRDPSGRCVPYVDAEQKNLFLRKGKPCTVGFCDMNGKCEKRVQDVIERWDFIDQLSINTFXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX			
H.s.	SASVRIIKFPFAPQTPGR--LQPAFVIPSAPAAP---KLDHQRMDTIQEDPSTDSHDEDFGEKDPFNSSTAAKSFEDLTHPVTTRSEKAASFKLQRQNRVDSKETEC	cytosolische Domäne		806
M.m.	SASVRIIKFPFAPQTPGR--LQPAFVIPSAPAAP---KLDHQRMDTIQEDPSTDSHDEDFGEKDPFNSSTAAKSFEDLTHPVTTRSEKAASFKLQRQNRVDSKETEC			809
V.p.	SASVRIIKFPFAPQTPGRLOLQAAAPPSPGAPGAPAAKADHQRMDTIQEDPSTDSHDEDFGEKDPFNSSTAAKSFEDLTHPVTTRSEKAASFKLQRQNRVDSKETEC			812

Signalpeptid, Prodomeäne(Pro), katalytische Domäne(Kat), Disintegrindomäne(Dis), Membran-proximale Domäne(MPD), Transmembrandomäne(TM), cytosolische Domäne(Cyt)

H.s.: Homo sapiens, M.m.: Mus musculus, V.p.: Vicugna pacos
 Unterschiede zum Konsensus aus H.s., M.m. und V.p.

N-Glycosylierungsstelle, mutiert in humaner ADAM17 Pro-Kat, muriner ADAM17 Var Pro-Kat

6.2.3 Sequenzen der verwendeten ADAM17-Expressions-Konstrukte

FS#321, FS FS#322, FS#323: kloniert in pCDNA6

humane ADAM17 dg Pro-Kat His6x

(genutzt für die Immunisierung und weitere Untersuchungen)

EcoRIMRQSLFLTSVVPFVLAPRPDDPGFGPHQRLEKLDSSLSDYDILSLSNIQQHSVRKRDLQTS
THVETLLTFSALKRHFKLYLTSSTERFSQNFKVVVDGKNESEYTVKWQDFFTGHVVGEPDSRVLAHI
RDDDVIIRINTDGAEYNIEPLWRFVNDTKDKRMLVYKSEDIKNVSRLQSPKVCGYLKVDNEELLPKGL
VDREPPEELVHRVKRRADPDPMKNTCKLLVVADHRFYRYMGRGEESTTTNYLIELIDRVDDIYRNTAW
DNAGFKGYGIQIEQIRILKSPQEVKPGEKHYNMAKSYPNEEKDAWDVKMLLEQFSFDIAEEASKVCLA
HLFTYQDFDMGTLGLAYVGS PRANSHGGVCPKAYYSPVGKKNIYLNSGLTSTKNYGKTILTKEADLVT
THELGHNFGAEHDPDGLAECAPNEDQGGKYVMYPIAVSGDHENNKMFSCSKQSIYKTIESKAQECFQ
ERSNKVLEHHHHHHHNotI

murine ADAM17 WT Pro-Kat His6x

(genutzt für die Immunisierung und weitere Untersuchungen)

EcoRIMRRRLLILTTLVFPFVLAPRPPEEAGSGSHPRLEKLDSSLSDYDILSLANIQQHSIRKRDLQSA
THLETLLTFSALKRHFKLYLTSSTERFSQNLRVVVVDGKEESEYSVKWQNFSSGHVVGEPDSRVLAHI
GDDVTVRINTDGAEYNVEPLWRFVNDTKDKRMLVYKSEDIKDFSRLQSPKVCGYLNADSEELLPKGL
IDREPSEEFVRRVKRRAEPNPLKNTCKLLVVADHRFYKYMGRGEESTTTNYLIELIDRVDDIYRNTSW
DNAGFKGYGVQIEQIRILKSPQEVKPGERHFNMAKSFNPEEKDAWDVKMLLEQFSFDIAEEASKVCLA
HLFTYQDFDMGTLGLAYVGS PRANSHGGVCPKAYYNPTVKKNIYLNSGLTSTKNYGKTILTKEADLVT
THELGHNFGAEHDPDGLAECAPNEDQGGKYVMYPIAVSGDHENNKMFSCSKQSIYKTIESKAQECFQ
ERSNKVLEHHHHHHHNotI

murine ADAM17 Var Pro-Kat His6x

(genutzt nur für die Immunisierung)

EcoRIMRRRLLILTTLVFPFVLAPRPPEEAGSGSHPRLEKLDSSLSDYDILSLANIQQHSIRKRDLQSA
THLETLLTFSALKRHFKLYLTSSTERFSQNLRVVVVDGKEESEYSVKWQNFSSGHVVGEPDSRVLAHI
GDDVTVRINTDGAEYNVEPLWRFVNDTKDKRMLVYKSEDIKDFSRLQSPKVCGYLNADSEELLPKGL
IDREPSEEFVRRVKRRAEPNPLKNTCKLLVVADHRFYKYMGRGEESTTTNYLIELIDRVDDIYRNTAW
DNAGFKGYGVQIEQIRILKSPQEVKPGERHFNMAKSFNPEEKDAWDVKMLLEQFSFDIAEEASKVCLA
HLFTYQDFDMGTLGLAYVGS PRANSHGGVCPKAYYSPTVKKNIYLNSGLTSTKNYGKTILTKEADLVT
THELGHNFGAEHDPDGLAECAPNEDQGGKYVMYPIAVSGDHENNKMFSCSKQSIYKTIESKAQECFQ
ERSNKVLEHHHHHHHNotI

Mutierte Glykosylierungsstellen **rot** hervorgehoben

Prodomäne, Katalytische Domäne,

Leader-Sequenz / His-Tag

6.2.4 Sequenzen der rekombinanten ADAM17-Proteine

Humane ADAM17 Pro-Kat-Dis-MPD (RnD Systems)

PRPPDDPGFGPHQRLEKLDLSLSDYDILSLSNIQQHSVRKRDLOTSTHVETLLTFSALKRHFKLYLTS
STERFSQNFKVVVDGKNESEYTVKWQDFFTGHVVGEPPDSRVLAHIRDDDDVIIRINTDGAEYNIPLW
RFVNDTKDKRMLVYKSEDIKNVSRLOSPKVCGYLKVDNEELLPKGLVDREPPEELVHRVQRADPDPM
KNTCKLLVVADHRFYRYMGRGEESTTTNYLIELIDRVDDIYRNTSWDNAGFKGYGIQIEQIRILKSPQ
EVKPGEKHYNMAKSYPNEEKDAWDVKMLLEQFSFDIAEEASKVCLAHLFTYQDFDMGTLGLAYVGS
PRANSHGGVCPKAYSPVGKKNIYLNGLTSTKNYGKTILTKADLVTTHELGHNFGEHDPDGLAECAP
NEDQGGKYVMYPIAVSGDHENKMFNSCSKQSIYKTIESKAQECFQERSNKVCGNSRVDEGEEDCPGI
MYLNNDTCCNSDCTLKEGVQCSDRNSPCKKNCQFETAQKKCQEAINATCKGVSYCTGNSSECP
PPGNAEDDTVCLDLGKCKDGKCIFFCEREQOLESCACNETDNSCKVCCRDLSGRCVPYVDAEQ
KNLFLRKGKPCITVGFCDMNGKCEKRVQDVIERFWDFIDQLSINTFGKFLADN

Humane ADAM17 Pro-Kat (ENZO)

PRPPDDPGFGPHQRLEKLDLSLSDYDILSLSNIQQHSVRKRDLOTSTHVETLLTFSALKRHFKLYLTS
STERFSQNFKVVVDGKNESEYTVKWQDFFTGHVVGEPPDSRVLAHIRDDDDVIIRINTDGAEYNIPLW
RFVNDTKDKRMLVYKSEDIKNVSRLOSPKVCGYLKVDNEELLPKGLVDREPPEELVHRVQRADPDPM
KNTCKLLVVADHRFYRYMGRGEESTTTNYLIELIDRVDDIYRNTSWDNAGFKGYGIQIEQIRILKSPQ
EVKPGEKHYNMAKSYPNEEKDAWDVKMLLEQFSFDIAEEASKVCLAHLFTYQDFDMGTLGLAYVGS
PRANSHGGVCPKAYSPVGKKNIYLNGLTSTKNYGKTILTKADLVTTHELGHNFGEHDPDGLAECAP
NEDQGGKYVMYPIAVSGDHENKMFNSCSKQSIYKTIESKAQECFQERSNKV

Murine ADAM17 Pro-Kat-Dis (RnD Systems)

PRPPEEAGSGSHRLEKLDLSLSDYDILSLANIQQHSIRKRDLOQATHLETLLTFSALKRHFKLYLTS
STERFSQNLRVVVDGKEESEYSVKWQNFSGHVVEPPDSRVLAHIGDDDDVTVRINTDGAEYNIPLW
RFVNDTKDKRMLVYKSEDIKDFSRLOSPKVCGYLNADSEELLPKGLIDREPSEEFVRRVQR
AEPNPLKNTCKLLVVADHRFYRYMGRGEESTTTNYLIELIDRVDDIYRNTSWDNAGFKGYGVQIEQIRILKSPQ
EVKPGERHFNMAKSPNEEKDAWDVKMLLEQFSFDIAEEASKVCLAHLFTYQDFDMGTLGLAYVGS
PRANSHGGVCPKAYNPTVKKNIYLNGLTSTKNYGKTILTKADLVTTHELGHNFGEHDPDGLAECAP
NEDQGGKYVMYPIAVSGDHENKMFNSCSKQSIYKTIESKAQECFQERSNKVCGNSRVDEGEEDCPGI
MYLNNDTCCNSDCTLKPQVQCSDRNSPCKKNCQFETAQKKCQEAINATCKGVSYCTGNSSECP
PPGNAED

Prodomäne, Katalytische Domäne, Furin-Spaltstelle

Proteine wurden über C-terminalen His-Tag aufgereinigt,
Menge an Prodomäne in der Präparation daher unklar

6.2.5 Sequenz der verwendeten ARTC2.2

MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKRS LAVPFMLDMAPNAFDDQYEGCVEDMEKKAPQLLQEDF
NMNEELKLEWEKAEINWKEIKNSTSYAGFHDFHGTALVAYTGNLAIDFNRGVDRDFKKSPDNFHYKAF
HYLLTRAVQLLNDQGC SLVYRGTKVMFEYTGKGSVRFQGFSSSSLTKRVALSSNFFSNHGTLFIIRTC
LGVNIKEFSSFPREEEVLIPGYEVYHKVTAQNDNGYNEIFLDSPERKKS NFNCFYNGSAQTVNIDFSI
SGSRESCVSLFLVLLGLLVQQLTLAEP

Flag-Tag

N-Glykosylierungsstellen

Spaltstelle

Signalsequenz / GPI-Anker-Anfügesequenz

6.3 Abkürzungsverzeichnis

2xYT	2-fach Hefeextrakt + Typton (<i>2x yeast extract + tryptone</i>)
3-D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
ADPR	ADP-Ribose
ADPR-Stelle	ADP-Ribosylierungsstelle
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
Ak	Antikörper
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
Ar	Autoradiographie
Arg	Arginin
ARH	ADP-Ribosyl-Hydrolase
ART	ADP-Ribosyltransferase
ARTC	ADP-Ribosyltransferase mit R-S-E Motiv (<i>C2/C3-Familie</i>)
ARTD	ADP-Ribosyltransferase mit H-Y-E Motiv (<i>DT-Familie</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	Unterscheidungsgruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale (<i>cluster of differentiation</i>)
CD62L	L-Selektin
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CDTa	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>collision induced dissociation</i>)
Coating	Beschichtung
Co	Coomassie
CT	Cholera-Toxin aus <i>Vibrio cholerae</i>
Da	Dalton
DMEM	Zellkulturmedium (<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphate
DRAG	Dinitrogenase-Reduktase aktivierende Glycohydrolase
DRAT	Dinitrogenase-Reduktase ATP-Ribosyltransferase
DT	Diphtherie-Toxin aus <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immuno-Assay (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ExoA	Exotoxin A aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ExoS	Exotoxin S aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ExoT	Exotoxin T aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Fc	Fragment mit konstanten Teilen eines Antikörpers (<i>fragment crystallizable</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinthiocyanat
GAS	<i>Interferon-γ activation site</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GI	GI254023X, ADAM Inhibitor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GW	GW280264X, ADAM Inhibitor
hcAb	Schwere-Ketten-Antikörper (<i>heavy chain antibodies</i>)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HNP-1	human neutrophil peptide 1
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
i.v.	intravenös
IFN-γ	Interferon-γ
IFNGR	Interferon-γ-Rezeptor
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JAK	Janus Knase
Kat	katalytische Domäne
Kat-Dis	katalytische Domäne + Disintegrindomäne
kD	Kilodalton
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LC	Flüssigkeitschromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LFA1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MES	2-Morpholinoehansulfonsäure
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MS	Massenspektrometrie
MWCO	molekulare Ausschlussgrenze (<i>molecular weight cut off</i>)
NAD	β-Nikotinamidadenindinukleotid
Nb	Nanobody
NICD	NAD-induzierter Zelltod (<i>NAD induced cell death</i>)
NK	Natürliche Killerzellen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PARP	Poly-ADP-Ribosylpolymerase
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pdb	Proteindatenbank für 3D Strukturen (<i>Protein Data Bank</i>)
PDI	Proteindisulfidisomerase
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol

PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration an H ³ O ⁺ -Ionen
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat (Phorbol-ester)
PT	Pertussistoxin aus <i>Bordetella pertussis</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPMI	Zellkulturmedium (aus dem Roswell Park Memorial Institut)
Pro	Prodomäne
Pro-Kat	Prodomäne + katalytische Domäne
Pro-Kat-Dis	Prodomäne + katalytische Domäne + Disintegrindomäne
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg sedimentation coefficient
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
<i>Shedding</i>	membrannahe Proteolyse von Zelloberflächenproteinen
SOC	<i>super optimal broth</i>
SpvB	<i>Salmonella enterica</i> SpvB Toxin
STAT	Gruppe von Transkriptionsfaktoren (<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>)
TACE	<i>TNF-α converting enzyme</i> = ADAM17
TAE	Tris-Acetat-EDT A
Th1	Typ1-T-Helferzellen
Th2	Typ2-T-Helferzellen
TIMP	endogener Metalloproteaseninhibitor (<i>tissue inhibitor of metalloproteases</i>)
TM	Transmembrandomäne
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
U	Unit
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VH	Variable Domäne der schweren Kette
VHH	Nanobody (<i>variable domain of the heavy chain of heavy chain antibodies</i>)
VL	Variable Domäne der leichten Kette
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp

6.4 Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Murphy KM & Sher A (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**: 787–793
- Adrain C, Zettl M, Christova Y, Taylor N & Freeman M (2012) Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE. *Science* **335**: 225–228
- Adriouch S, Bannas P, Schwarz N, Fliegert R, Guse AH, Seman M, Haag F & Koch-Nolte F (2008) ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *The FASEB Journal* **22**: 861–869
- Adriouch S, Dox C, Welge V, Seman M, Koch-Nolte F & Haag F (2002) Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. *J Immunol* **169**: 4108–4112
- Adriouch S, Dubberke G, Diessenbacher P, Rassendren F, Seman M, Haag F & Koch-Nolte F (2005) Probing the expression and function of the P2X7 purinoceptor with antibodies raised by genetic immunization. *Cellular Immunology* **236**: 72–77
- Adriouch S, Haag F, Boyer O, Seman M & Koch-Nolte F (2012) Extracellular NAD(+): a danger signal hindering regulatory T cells. *Microbes Infect.* **14**: 1284–1292
- Adriouch S, Hubert S, Pechberty S, Koch-Nolte F, Haag F & Seman M (2007) NAD⁺ released during inflammation participates in T cell homeostasis by inducing ART2-mediated death of naive T cells in vivo. *J Immunol* **179**: 186–194
- Ahmed CMI, Burkhart MA, Mujtaba MG, Subramaniam PS & Johnson HM (2003) The role of IFN γ nuclear localization sequence in intracellular function. *Journal of Cell Science* **116**: 3089–3098
- Aktories K, Bärman M, Ohishi I, Tsuyama S, Jakobs KH & Habermann E (1986) Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. *Nature* **322**: 390–392
- Amour A, Slocombe PM, Webster A, Butler M, Knight CG, Smith BJ, Stephens PE, Shelley C, Hutton M, Knäuper V, Docherty AJ & Murphy G (1998) TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett.* **435**: 39–44
- Bader T & Weitzerbin J (1994) Nuclear accumulation of interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 11831–11835
- Bahia MS & Silakari O (2010) Tumor Necrosis Factor Alpha Converting Enzyme: An Encouraging Target for Various Inflammatory Disorders. *Chemical Biology & Drug Design* **75**: 415–443
- Bannas P, Adriouch S, Kahl S, Braasch F, Haag F & Koch-Nolte F (2005) Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 depends on its association with lipid rafts. *Blood* **105**: 3663–3670

- Bannas P, Well L, Lenz A, Rissiek B, Haag F, Schmid J, Hochgräfe K, Trepel M, Adam G, Ittrich H & Koch-Nolte F (2014) In vivo near-infrared fluorescence targeting of T cells: comparison of nanobodies and conventional monoclonal antibodies. *Contrast Media Mol Imaging* **9**: 135–142
- Baral TN, Magez S, Stijlemans B, Conrath K, Vanhollebeke B, Pays E, Muyldermans S & De Baetselier P (2006) Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. *Nat. Med.* **12**: 580–584
- Baranova E, Fronzes R, Garcia-Pino A, Van Gerven N, Papapostolou D, Péhau-Arnaudet G, Pardon E, Steyaert J, Howorka S & Remaut H (2012) SbsB structure and lattice reconstruction unveil Ca²⁺ triggered S-layer assembly. *Nature* **487**: 119–122
- Bass R & Edwards DR (2010) ADAMs and protein disulfide isomerase: the key to regulated cell-surface protein ectodomain shedding? *Biochem J* **428**: e3–e5
- Bell A, Wang ZJ, Arbabi-Ghahroudi M, Chang TA, Durocher Y, Trojahn U, Baardsnes J, Jaramillo ML, Li S, Baral TN, O'Connor-McCourt M, MacKenzie R & Zhang J (2010) Differential tumor-targeting abilities of three single-domain antibody formats. *Cancer Lett.* **289**: 81–90
- Belosevic M, Finbloom DS, Van Der Meide PH, Slayter MV & Nacy CA (1989) Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J Immunol* **143**: 266–274
- Berthold CL, Wang H, Nordlund S & Hogbom M (2009) Mechanism of ADP-ribosylation removal revealed by the structure and ligand complexes of the dimanganese mono-ADP-ribosylhydrolase DraG. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 14247–14252
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ & Cerretti DP (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**: 729–733
- Blanchot-Jossic F, Jarry A, Masson D, Bach-Ngohou K, Paineau J, Denis MG, Laboisie CL & Mosnier J-F (2005) Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. *J. Pathol.* **207**: 156–163
- Blobel CP (2005) ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 32–43
- Blom L & Poulsen LK (2013) In vitro Th1 and Th2 cell polarization is severely influenced by the initial ratio of naïve and memory CD4⁺ T cells. *J Immunol Methods* **397**: 55–60
- Boehm U, Klamp T, Groot M & Howard JC (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 749–795
- Bradley LM, Dalton DK & Croft M (1996) A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J Immunol* **157**: 1350–1358

- Briso EM, Dienz O & Rincon M (2008) Cutting edge: soluble IL-6R is produced by IL-6R ectodomain shedding in activated CD4 T cells. *J Immunol* **180**: 7102–7106
- Brocker CN, Vasiliou V & Nebert DW (2009) Evolutionary divergence and functions of the ADAM and ADAMTS gene families. *Hum. Genomics* **4**: 43–55
- Bruzzone S, Guida L, Zocchi E, Franco L & De Flora A (2001) Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *FASEB J.* **15**: 10–12
- Burnstock G (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**: 1471–1483
- Burnstock G & Verkhratsky A (2009) Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiol (Oxf)* **195**: 415–447
- Caescu CI, Jeschke GR & Turk BE (2009) Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem J* **424**: 79–88
- Canault M, Peiretti F, Kopp F, Bonardo B, Bonzi M-F, Coudeyre J-C, Alessi M-C, Juhan-Vague I & Nalbone G (2006) The TNF alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) is expressed in the atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice: possible contribution to elevated plasma levels of soluble TNF alpha receptors. *Atherosclerosis* **187**: 82–91
- Cesaro A, Abakar-Mahamat A, Brest P, Lassalle S, Selva E, Filippi J, Hébuterne X, Hugot J-P, Doglio A, Galland F, Naquet P, Vouret-Craviari V, Mograbi B & Hofman PM (2009) Differential expression and regulation of ADAM17 and TIMP3 in acute inflamed intestinal epithelia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **296**: G1332–43
- Chakravarty R, Goel S & Cai W (2014) Nanobody: The ‘Magic Bullet’ for Molecular Imaging? *Theranostics* **4**: 386–398
- Chalaris A, Rabe B, Paliga K, Lange H, Laskay T, Fielding CA, Jones SA, Rose-John S & Scheller J (2007) Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* **110**: 1748–1755
- Cockayne DA, Muchamuel T, Grimaldi JC, Muller-Steffner H, Randall TD, Lund FE, Murray R, Schuber F & Howard MC (1998) Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. *Blood* **92**: 1324–1333
- Collier RJ & Cole HA (1969) Diphtheria toxin subunit active in vitro. *Science* **164**: 1179–1181
- Conrath KE, Lauwereys M, Galleni M, Matagne A, Frère JM, Kinne J, Wyns L & Muyldermans S (2001) Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 2807–2812
- Corriden R & Insel PA (2010) Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Science Signaling* **3**: re1

- Cortez-Retamozo V, Backmann N, Senter PD, Wernery U, De Baetselier P, Muyldermans S & Revets H (2004) Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res.* **64**: 2853–2857
- Danquah W (2012) Selection and characterization of llama-derived anti-P2X7 single domain antibodies. *Dissertation, Universität Hamburg, MIN-Fakultät*
- Darnell JE (1997) STATs and gene regulation. *Science* **277**: 1630–1635
- Darnell JE, Kerr IM & Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**: 1415–1421
- De Genst E, Saerens D, Muyldermans S & Conrath K (2006) Antibody repertoire development in camelids. *Developmental & Comparative Immunology* **30**: 187–198
- Desmyter A, Decanniere K, Muyldermans S & Wyns L (2001) Antigen specificity and high affinity binding provided by one single loop of a camel single-domain antibody. *J. Biol. Chem.* **276**: 26285–26290
- Desmyter A, Transue TR, Ghahroudi MA, Thi MH, Poortmans F, Hamers R, Muyldermans S & Wyns L (1996) Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat. Struct. Biol.* **3**: 803–811
- Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, Meersman F, Heremans K, Frenken LGJ, Muyldermans S, Wyns L & Matagne A (2002) Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci.* **11**: 500–515
- Düsterhöft S, Jung S, Hung C-W, Tholey A, Sonnichsen FD, Grötzinger J & Lorenzen I (2013) The membrane-proximal domain of ADAM17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase. *J. Am. Chem. Soc.*
- Ebsen H, Schröder A, Kabelitz D & Janssen O (2013) Differential surface expression of ADAM10 and ADAM17 on human T lymphocytes and tumor cells. *PLoS ONE* **8**: e76853
- Emmerson CD, van der Vlist EJ, Braam MR, Vanlandschoot P, Merchiers P, de Haard HJW, Verrips CT, van Bergen en Henegouwen PMP & Dolk E (2011) Enhancement of polymeric immunoglobulin receptor transcytosis by biparatopic VHH. *PLoS ONE* **6**: e26299
- English WR, Corvol P & Murphy G (2012) LPS activates ADAM9 dependent shedding of ACE from endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **421**: 70–75
- Fong KP, Barry C, Tran AN, Traxler EA, Wannemacher KM, Tang H-Y, Speicher KD, Blair IA, Speicher DW, Grosser T & Brass LF (2011) Deciphering the human platelet sheddome. *Blood* **117**: e15–26
- Frasca D, Adorini L, Landolfo S & Doria G (1985) Enhancing effect of IFN-gamma on helper T cell activity and IL 2 production. *J Immunol* **134**: 3907–3911

- Garbers C, Janner N, Chalaris A, Moss ML, Floss DM, Meyer D, Koch-Nolte F, Rose-John S & Scheller J (2011) Species Specificity of ADAM10 and ADAM17 Proteins in Interleukin-6 (IL-6) Trans-signaling and Novel Role of ADAM10 in Inducible IL-6 Receptor Shedding. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 14804–14811
- Gelling RW, Yan W, Al-Noori S, Pardini A, Morton GJ, Ogimoto K, Schwartz MW & Dempsey PJ (2008) Deficiency of TNF Converting Enzyme (TACE/ADAM17) Causes a Lean, Hypermetabolic Phenotype in Mice. *Endocrinology* **149**: 6053–6064
- Gill DM & Meren R (1978) ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 3050–3054
- Glowacki G, Braren R, Cetkovic-Cvrlje M, Leiter EH, Haag F & Koch-Nolte F (2001) Structure, chromosomal localization, and expression of the gene for mouse ecto-mono(ADP-ribosyl)transferase ART5. *Gene* **275**: 267–277
- Gooz M (2010) ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45**: 146–169
- Gooz P, Dang Y, Higashiyama S, Twal WO, Haycraft CJ & Gooz M (2012) A Disintegrin and Metalloenzyme (ADAM) 17 Activation Is Regulated by $\alpha 5\beta 1$ Integrin in Kidney Mesangial Cells. *PLoS ONE* **7**: e33350
- Gray PW & Goeddel DV (1982) Structure of the human immune interferon gene. *Nature* **298**: 859–863
- Griggs ND, Jarpe MA, Pace JL, Russell SW & Johnson HM (1992) The N-terminus and C-terminus of IFN-gamma are binding domains for cloned soluble IFN-gamma receptor. *J Immunol* **149**: 517–520
- Gu B, Bendall LJ & Wiley JS (1998) Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* **92**: 946–951
- Guse AH (2000) Cyclic ADP-ribose. *J. Mol. Med.* **78**: 26–35
- Haag F, Adriouch S, Braß A, Jung C, Möller S, Scheuplein F, Bannas P, Seman M & Koch-Nolte F (2007) Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic Signalling* **3**: 71–81
- Haag F, Koch-Nolte F, Kühn M, Lorenzen S & Thiele HG (1994) Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species. *Journal of Molecular Biology* **243**: 537–546
- Haelewyn J, Michiels L, Verhaert P, Hoylaerts MF, Witters R & De Ley M (1997) Interaction of truncated human interferon gamma variants with the interferon gamma receptor: crucial importance of Arg-129. *Biochem J* **324 (Pt 2)**: 591–595
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N & Hamers R (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**: 446–448

- Hans W, Schölmerich J, Gross V & Falk W (2000) Interleukin-12 induced interferon-gamma increases inflammation in acute dextran sulfate sodium induced colitis in mice. *Eur. Cytokine Netw.* **11**: 67–74
- Hara N, Badruzzaman M, Sugae T, Shimoyama M & Tsuchiya M (1999) Mouse Rt6.1 is a thiol-dependent arginine-specific ADP-ribosyltransferase. *Eur. J. Biochem.* **259**: 289–294
- Hassa PO & Hottiger MO (2007) The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front. Biosci.* **13**: 3046–3082
- Hattori M & Gouaux E (2012) Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* **485**: 207–212
- Haynes JR, McCabe DE, Swain WF, Widera G & Fuller JT (1996) Particle-mediated nucleic acid immunization. *J. Biotechnol.* **44**: 37–42
- Holbourn KP, Shone CC & Acharya KR (2006) A family of killer toxins. *FEBS Journal* **273**: 4579–4593
- Holliger P & Hudson PJ (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* **23**: 1126–1136
- Holz J-B (2012) The TITAN trial--assessing the efficacy and safety of an anti-von Willebrand factor Nanobody in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfus. Apher. Sci.* **46**: 343–346
- Hommes DW, Mikhajlova TL, Stoinov S, Stimac D, Vucelic B, Lonovics J, Zákuciová M, D'Haens G, Van Assche G, Ba S, Lee S & Pearce T (2006) Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* **55**: 1131–1137
- Hong S, Braß A, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F & Dubyak GR (2007) Lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IFN-beta induce expression of the thiol-sensitive ART2.1 Ecto-ADP-ribosyltransferase in murine macrophages. *J Immunol* **179**: 6215–6227
- Horiuchi K (2013) A brief history of tumor necrosis factor α -converting enzyme: an overview of ectodomain shedding. *Keio J Med* **62**: 29–36
- Horiuchi K, Kimura T, Miyamoto T, Takaishi H, Okada Y, Toyama Y & Blobel CP (2007) Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J Immunol* **179**: 2686–2689
- Hottiger MO, Hassa PO, Lüscher B, Schüler H & Koch-Nolte F (2010) Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci* **35**: 208–219
- Hubert S, Rissiek B, Klages K, Huehn J, Sparwasser T, Haag F, Koch-Nolte F, Boyer O, Seman M & Adriouch S (2010) Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *J. Exp. Med.* **207**: 2561–2568

- Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V, Kallen K-J, Rose-John S & Ludwig A (2003) The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* **102**: 1186–1195
- Huston JS, Mudgett-Hunter M, Tai MS, McCartney J, Warren F, Haber E & Oppermann H (1991) Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods in Enzymology* **203**: 46–88
- Isaacs A & Lindenmann J (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **147**: 258–267
- Jäger V, Büssow K, Wagner A, Weber S, Hust M, Frenzel A & Schirrmann T (2013) High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* **13**: 52
- Johnson HM, Noon-Song EN, Dabelic R & Ahmed CM (2013) IFN signaling: how a non-canonical model led to the development of IFN mimetics. *Front Immunol* **4**: 202
- Junger WG (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **11**: 201–212
- Just I, Sehr P, Jung M, van Damme J, Puype M, Vandekerckhove J, Moss J & Aktories K (1995) ADP-ribosyltransferase type A from turkey erythrocytes modifies actin at Arg-95 and Arg-372. *Biochemistry* **34**: 326–333
- Kahl S, Nissen M, Girisch R, Duffy T, Leiter EH, Haag F & Koch-Nolte F (2000) Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. *J Immunol* **165**: 4463–4469
- Kernstock S (2007) In-silico Analysen, rekombinante Expression und Struktur-Funktionsanalysen humaner ADP-Ribosyl-X Hydrolasen (ARHs). *Dissertation, Universität Hamburg, MIN-Fakultät*
- Kernstock S, Koch-Nolte F, Mueller-Dieckmann J, Weiss MS & Mueller-Dieckmann C (2009) Cloning, expression, purification and crystallization as well as X-ray fluorescence and preliminary X-ray diffraction analyses of human ADP-ribosylhydrolase 1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **65**: 529–532
- Koch-Nolte F, Adriouch S, Bannas P, Krebs C, Scheuplein F, Seman M & Haag F (2006) ADP-ribosylation of membrane proteins: unveiling the secrets of a crucial regulatory mechanism in mammalian cells. *Ann. Med.* **38**: 188–199
- Koch-Nolte F, Duffy T, Nissen M, Kahl S, Killeen N, Ablamunits V, Haag F & Leiter EH (1999) A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto-ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation. *J Immunol* **163**: 6014–6022
- Koch-Nolte F, Fischer S, Haag F & Ziegler M (2011) Compartmentation of NAD⁺-dependent signalling. *FEBS Lett.* **585**: 1651–1656

- Koch-Nolte F, Kernstock S, Mueller-Dieckmann C, Weiss MS & Haag F (2008) Mammalian ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolases. *Front. Biosci.* **13**: 6716–6729
- Koch-Nolte F, Petersen D, Balasubramanian S, Haag F, Kahlke D, Willer T, Kastelein R, Bazan F & Thiele HG (1996) Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADPribosyl)transferases and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins. *J. Biol. Chem.* **271**: 7686–7693
- Koch-Nolte F, Reche P, Haag F & Bazan F (2001) ADP-ribosyltransferases: plastic tools for inactivating protein and small molecular weight targets. *J. Biotechnol.* **92**: 81–87
- Koch-Nolte F, Reyelt J, Schossow B, Schwarz N, Scheuplein F, Rothenburg S, Haag F, Alzogaray V, Cauerhff A & Goldbaum FA (2007) Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo. *The FASEB Journal* **21**: 3490–3498
- Koh WWL, Steffensen S, Gonzalez-Pajuelo M, Hoorelbeke B, Gorlani A, Szynol A, Forsman A, Aasa-Chapman MMI, de Haard H, Verrips T & Weiss RA (2010) Generation of a family-specific phage library of llama single chain antibody fragments that neutralize HIV-1. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 19116–19124
- Kratz F & Elsadek B (2012) Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *J Control Release* **161**: 429–445
- Krebs C, Koestner W, Nissen M, Welge V, Parusel I, Malavasi F, Leiter EH, Santella RM, Haag F & Koch-Nolte F (2003) Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine. *Anal Biochem* **314**: 108–115
- la Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J & Girolomoni G (2003) Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J Leukocyte Biol* **73**: 339–343
- Laing S (2010) Die strukturelle und funktionelle Charakterisierung der ADP-Ribosylierung von humanem Tumor-Nekrose-Faktor durch ADP-Ribosyltransferase-1. *Dissertation, Universität Hamburg, MIN-Fakultät*
- Laing S, Koch-Nolte F, Haag F & Buck F (2011) Strategies for the identification of arginine ADP-ribosylation sites. *Journal of Proteomics* **75**: 169–176
- Laing S, Unger M, Koch-Nolte F & Haag F (2010) ADP-ribosylation of arginine. *Amino Acids* **41**: 257–269
- Le Gall SM, Bobé P, Reiss K, Horiuchi K, Niu X-D, Lundell D, Gibb DR, Conrad D, Saftig P & Blobel CP (2009) ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol. Biol. Cell* **20**: 1785–1794

- Le Gall SM, Maretzky T, Issuree PDA, Niu XD, Reiss K, Saftig P, Khokha R, Lundell D & Blobel CP (2010) ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *Journal of Cell Science* **123**: 3913–3922
- Lendeckel U, Kohl J, Arndt M, Carl-McGrath S, Donat H & Röcken C (2005) Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **131**: 41–48
- Li N, Wang Y, Forbes K, Vignali KM, Heale BS, Saftig P, Hartmann D, Black RA, Rossi JJ, Blobel CP, Dempsey PJ, Workman CJ & Vignali DAA (2007) Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3. *Embo J* **26**: 494–504
- Li T, Bourgeois J-P, Celli S, Glacial F, Le Sourd A-M, Mecheri S, Weksler B, Romero I, Couraud P-O, Rougeon F & Lafaye P (2012) Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *The FASEB Journal* **26**: 3969–3979
- Li X-D, Huergo LF, Gasperina A, Pedrosa FO, Merrick M & Winkler FK (2009) Crystal Structure of Dinitrogenase Reductase-activating Glycohydrolase (DRAG) Reveals Conservation in the ADP-Ribosylhydrolase Fold and Specific Features in the ADP-Ribose-binding Pocket. *Journal of Molecular Biology* **390**: 737–746
- Lichtenthaler SF (2011) α -secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J. Neurochem.* **116**: 10–21
- Lischke T, Schumacher V, Wesolowski J, Hurwitz R, Haag F, Koch-Nolte F & Mittrücker H-W (2013) CD8- β ADP-ribosylation affects CD8(+) T-cell function. *Eur. J. Immunol.* **43**: 1828–1838
- Ludden PW (1994) Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in prokaryotes. *Mol Cell Biochem* **138**: 123–129
- Lundell D, Lunn C, Dalgarno D, Fossetta J, Greenberg R, Reim R, Grace M & Narula S (1991) The carboxyl-terminal region of human interferon gamma is important for biological activity: mutagenic and NMR analysis. *Protein Eng.* **4**: 335–341
- Lupi R, Corda D & Di Girolamo M (2000) Endogenous ADP-ribosylation of the G protein beta subunit prevents the inhibition of type 1 adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **275**: 9418–9424
- Maretzky T, McIlwain DR, Issuree PDA, Li X, Malapeira J, Amin S, Lang PA, Mak TW & Blobel CP (2013) iRhom2 controls the substrate selectivity of stimulated ADAM17-dependent ectodomain shedding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 11433–11438
- Matsuura R, Tanigawa Y, Tsuchiya M, Mishima K, Yoshimura Y & Shimoyama M (1988) Preferential ADP-ribosylation of arginine-3 in synthetic heptapeptide Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly. *Biochem J* **253**: 923–926
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G & Chiswell DJ (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**: 552–554

- McIlwain DR, Lang PA, Maretzky T, Hamada K, Ohishi K, Maney SK, Berger T, Murthy A, Duncan G, Xu HC, Lang KS, Haussinger D, Wakeham A, Itie-Youten A, Khokha R, Ohashi PS, Blobel CP & Mak TW (2012) iRhom2 Regulation of TACE Controls TNF-Mediated Protection Against Listeria and Responses to LPS. *Science* **335**: 229–232
- Menzel S, Rissiek B, Haag F, Goldbaum FA & Koch-Nolte F (2013) The art of blocking ADP-ribosyltransferases (ARTs): nanobodies as experimental and therapeutic tools to block mammalian and toxin ARTs. *FEBS J.* **280**: 3543–3550
- Mohler KM, Sleath PR, Fitzner JN, Cerretti DP, Alderson M, Kerwar SS, Torrance DS, Otten-Evans C, Greenstreet T & Weerawarna K (1994) Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing. *Nature* **370**: 218–220
- Moon H, Na H-Y, Chong KH & Kim TJ (2006) P2X7 receptor-dependent ATP-induced shedding of CD27 in mouse lymphocytes. *Immunol. Lett.* **102**: 98–105
- Moriyama H, Tsukida T, Inoue Y, Yokota K, Yoshino K, Kondo H, Miura N & Nishimura S-I (2004) Azasugar-based MMP/ADAM inhibitors as antipsoriatic agents. *J. Med. Chem.* **47**: 1930–1938
- Mosmann TR & Coffman RL (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**: 145–173
- Moss J, Stanley SJ, Nightingale MS, Murtagh JJ, Monaco L, Mishima K, Chen HC, Williamson KC & Tsai SC (1992) Molecular and immunological characterization of ADP-ribosylarginine hydrolases. *J. Biol. Chem.* **267**: 10481–10488
- Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, et al (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* **385**: 733–736
- Möller S, Jung C, Adriouch S, Dubberke G, Seyfried F, Seman M, Haag F & Koch-Nolte F (2007) Monitoring the expression of purinoceptors and nucleotide-metabolizing ecto-enzymes with antibodies directed against proteins in native conformation. *Purinergic Signalling* **3**: 359–366
- Mueller-Dieckmann C, Kernstock S, Lisurek M, Kriest von JP, Haag F, Weiss MS & Koch-Nolte F (2006) The structure of human ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3) provides insights into the reversibility of protein ADP-ribosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 15026–15031
- Mueller-Dieckmann C, Ritter H, Haag F, Koch-Nolte F & Schulz G (2002) Structure of the Ecto-ADP-ribosyl transferase ART2.2 from rat. *Journal of Molecular Biology* **322**: 687–696
- Murphy G (2008) The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* **8**: 932–941

- Muyldermans S (2013) Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **82**: 775–797
- Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, Barbosa JA & Hamers R (1994) Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng.* **7**: 1129–1135
- Nardoizzi J, Wenta N, Yasuhara N, Vinkemeier U & Cingolani G (2010) Molecular basis for the recognition of phosphorylated STAT1 by importin alpha5. *Journal of Molecular Biology* **402**: 83–100
- Nemoto E, Stohlman S & Dennert G (1996a) Release of a glycosylphosphatidylinositol-anchored ADP-ribosyltransferase from cytotoxic T cells upon activation. *J Immunol* **156**: 85–92
- Nemoto E, Yu Y & Dennert G (1996b) Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function-associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells. *J Immunol* **157**: 3341–3349
- Nguyen VK, Su C, Muyldermans S & van der Loo W (2002) Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation. *Immunogenetics* **54**: 39–47
- North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* **82**: 1013–1067
- Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Schölmerich J, Gross V & Falk W (1999) Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clinical & Experimental Immunology* **116**: 238–245
- Oetjen J, Rexroth S & Reinhold-Hurek B (2009) Mass spectrometric characterization of the covalent modification of the nitrogenase Fe-protein in *Azoarcus* sp. BH72. *FEBS J.* **276**: 3618–3627
- Oka S, Kato J & Moss J (2006) Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J. Biol. Chem.* **281**: 705–713
- Okamoto S, Azhipa O, Yu Y, Russo E & Dennert G (1998) Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function. *J Immunol* **160**: 4190–4198
- Okazaki IJ, Kim HJ & Moss J (1996) Cloning and characterization of a novel membrane-associated lymphocyte NAD:arginine ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **271**: 22052–22057
- Oyen D, Srinivasan V, Steyaert J & Barlow JN (2011) Constraining enzyme conformational change by an antibody leads to hyperbolic inhibition. *Journal of Molecular Biology* **407**: 138–148
- Paone G, Stevens LA, Levine RL, Bourgeois C, Steagall WK, Gochuico BR & Moss J (2006) ADP-ribosyltransferase-specific modification of human neutrophil peptide-1. *J. Biol. Chem.* **281**: 17054–17060

- Paone G, Wada A, Stevens LA, Matin A, Hirayama T, Levine RL & Moss J (2002) ADP ribosylation of human neutrophil peptide-1 regulates its biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 8231–8235
- Pardon E, Laeremans T, Triest S, Rasmussen SGF, Wohlkönig A, Ruf A, Muyldermans S, Hol WGJ, Kobilka BK & Steyaert J (2014) A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat Protoc* **9**: 674–693
- Pears CJ, Couto CA-M, Wang H-Y, Borer C, Kiely R & Lakin ND (2012) The role of ADP-ribosylation in regulating DNA double-strand break repair. *Cell Cycle* **11**: 48–56
- Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ & Black RA (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* **282**: 1281–1284
- Petropoulos K (2012) Phage display. *Methods Mol Biol* **901**: 33–51
- Plazinska A, Kolinski M, Wainer IW & Jozwiak K (2013) Molecular interactions between fenoterol stereoisomers and derivatives and the β_2 -adrenergic receptor binding site studied by docking and molecular dynamics simulations. *J Mol Model* **19**: 4919–4930
- Pope MR, Saari LL & Ludden PW (1986) N-glycohydrolysis of adenosine diphosphoribosyl arginine linkages by dinitrogenase reductase activating glycohydrolase (activating enzyme) from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **261**: 10104–10111
- Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB & Coffman RL (1994) Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* **1**: 553–562
- Pupovac A, Foster CM & Sluyter R (2013) Human P2X7 receptor activation induces the rapid shedding of CXCL16. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **432**: 626–631
- Randal M & Kossiakoff AA (2001) The structure and activity of a monomeric interferon-gamma:alpha-chain receptor signaling complex. *Structure* **9**: 155–163
- Rasmussen SGF, Choi H-J, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, Devree BT, Rosenbaum DM, Thian FS, Kobilka TS, Schnapp A, Konetzki I, Sunahara RK, Gellman SH, Pautsch A, Steyaert J, Weis WI & Kobilka BK (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the $\beta(2)$ adrenoceptor. *Nature* **469**: 175–180
- Rauch I, Müller M & Decker T (2013) The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *JAKSTAT* **2**: e23820
- Reddy P, Slack JL, Davis R, Cerretti DP, Kozlosky CJ, Blanton RA, Shows D, Peschon JJ & Black RA (2000) Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**: 14608–14614
- Rissiek B, Danquah W, Haag F & Koch-Nolte F (2014) Technical Advance: A new cell preparation strategy that greatly improves the yield of vital and functional Tregs and NKT cells. *J Leukocyte Biol* **95**: 543–549

- Roberts WK & Vasil A (1982) Evidence for the identity of murine gamma interferon and macrophage activating factor. *J. Interferon Res.* **2**: 519–532
- Rose-John S (2013) ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets. *Pharmacol. Res.*
- Rothbauer U, Zolghadr K, Tillib S, Nowak D, Schermelleh L, Gahl A, Backmann N, Conrath K, Muyldermans S, Cardoso MC & Leonhardt H (2006) Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat Methods* **3**: 887–889
- Sarker SA, Jäkel M, Sultana S, Alam NH, Bardhan PK, Chisti MJ, Salam MA, Theis W, Hammarström L & Frenken LGJ (2013) Anti-rotavirus protein reduces stool output in infants with diarrhea: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology* **145**: 740–748.e8
- Scheller J, Chalaris A, Garbers C & Rose-John S (2011) ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends in Immunology*: 1–8
- Schenk U, Westendorf AM, Radaelli E, Casati A, Ferro M, Fumagalli M, Verderio C, Buer J, Scanziani E & Grassi F (2008) Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Science Signaling* **1**: ra6
- Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Krebs C, Bannas P, Rissiek B, Seman M, Haag F & Koch-Nolte F (2009) NAD⁺ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *The Journal of Immunology* **182**: 2898–2908
- Schlöndorff J, Becherer JD & Blobel CP (2000) Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J* **347 Pt 1**: 131–138
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T & Hume DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukocyte Biol* **75**: 163–189
- Schwarz N, Fliegert R, Adriouch S, Seman M, Guse AH, Haag F & Koch-Nolte F (2009) Activation of the P2X7 ion channel by soluble and covalently bound ligands. *Purinergic Signalling* **5**: 139–149
- Schwiebert EM & Zsembery A (2003) Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1615**: 7–32
- Seelig GF, Wijdenes J, Nagabhushan TL & Trotta PP (1988) Evidence for a polypeptide segment at the carboxyl terminus of recombinant human gamma interferon involved in expression of biological activity. *Biochemistry* **27**: 1981–1987
- Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schröter F, Prozorovski T, Lange N, Steffen J, Rieger M, Kuckelkorn U, Aktas O, Kloetzel P-M & Krüger E (2010) Immunoproteasomes Preserve Protein Homeostasis upon Interferon-Induced Oxidative Stress. *Cell* **142**: 613–624
- Sekura RD, Fish F, Manclark CR, Meade B & Zhang YL (1983) Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **258**: 14647–14651
- Seman M, Adriouch S, Haag F & Koch-Nolte F (2004) Ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs): emerging actors in cell communication and signaling. *Curr. Med. Chem.* **11**: 857–872

- Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, Deterre P, Haag F & Koch-Nolte F (2003) NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* **19**: 571–582
- Smalley DM & Ley K (2005) L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J. Cell. Mol. Med.* **9**: 255–266
- Srour N, Lebel A, McMahon S, Fournier I, Fugère M, Day R & Dubois CM (2003) TACE/ADAM-17 maturation and activation of sheddase activity require proprotein convertase activity. *FEBS Lett.* **554**: 275–283
- Stevens LA, Levine RL, Gochuico BR & Moss J (2009) ADP-ribosylation of human defensin HNP-1 results in the replacement of the modified arginine with the noncoded amino acid ornithine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 19796–19800
- Stijlemans B, Conrath K, Cortez-Retamozo V, Van Xong H, Wyns L, Senter P, Revets H, De Baetselier P, Muyldermans S & Magesz S (2004) Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *J. Biol. Chem.* **279**: 1256–1261
- Subramaniam PS, Green MM, Larkin J, Torres BA & Johnson HM (2001) Nuclear translocation of IFN-gamma is an intrinsic requirement for its biologic activity and can be driven by a heterologous nuclear localization sequence. *J. Interferon Cytokine Res.* **21**: 951–959
- Subramaniam PS, Mujtaba MG, Paddy MR & Johnson HM (1999) The carboxyl terminus of interferon-gamma contains a functional polybasic nuclear localization sequence. *J. Biol. Chem.* **274**: 403–407
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA & Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* **272**: 735–738
- Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K & Nakata Y (2004) Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J. Neurosci.* **24**: 1–7
- Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL & Glimcher LH (2003) Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **21**: 713–758
- Szente BE & Johnson HM (1994) Binding of IFN gamma and its C-terminal peptide to a cytoplasmic domain of its receptor that is essential for function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **201**: 215–221
- Tanaka Y, Miyamoto S, Suzuki SO, Oki E, Yagi H, Sonoda K, Yamazaki A, Mizushima H, Maehara Y, Mekada E & Nakano H (2005) Clinical significance of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and a disintegrin and metalloprotease 17 expression in human ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**: 4783–4792
- Tang Y, Jiang N, Parakh C & Hilvert D (1996) Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology. *J. Biol. Chem.* **271**: 15682–15686

- Tape CJ, Willems SH, Dombernowsky SL, Stanley PL, Fogarasi M, Ouwehand W, McCafferty J & Murphy G (2011) Cross-domain inhibition of TACE ectodomain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 5578–5583
- Taylor DR, Parkin ET, Cocklin SL, Ault JR, Ashcroft AE, Turner AJ & Hooper NM (2009) Role of ADAMs in the ectodomain shedding and conformational conversion of the prion protein. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 22590–22600
- Tellier E, Canault M, Rebsomen L, Bonardo B, Juhan-Vague I, Nalbone G & Peiretti F (2006) The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp. Cell Res.* **312**: 3969–3980
- Tezcan-Merdol D, Nyman T, Lindberg U, Haag F, Koch-Nolte F & Rhen M (2001) Actin is ADP-ribosylated by the Salmonella enterica virulence-associated protein SpvB. *Mol. Microbiol.* **39**: 606–619
- Thanongsaksrikul J & Chaicumpa W (2011) Botulinum neurotoxins and botulism: a novel therapeutic approach. *Toxins (Basel)* **3**: 469–488
- Terashima M, Yamamori C & Shimoyama M (1995) ADP-ribosylation of Arg28 and Arg206 on the actin molecule by chicken arginine-specific ADP-ribosyltransferase. *Eur. J. Biochem.* **231**: 242–249
- Thiel DJ, le Du MH, Walter RL, D'Arcy A, Chène C, Fountoulakis M, Garotta G, Winkler FK & Ealick SE (2000) Observation of an unexpected third receptor molecule in the crystal structure of human interferon-gamma receptor complex. *Structure* **8**: 927–936
- Thiele HG, Koch F, Hamann A & Arndt R (1986) Biochemical characterization of the T-cell alloantigen RT-6.2. *Immunology* **59**: 195–201
- Tijink BM, Laeremans T, Budde M, Stigter-van Walsum M, Dreier T, de Haard HJ, Leemans CR & van Dongen GAMS (2008) Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology. *Mol. Cancer Ther.* **7**: 2288–2297
- Tominaga T, Sugie K, Hirata M, Morii N, Fukata J, Uchida A, Imura H & Narumiya S (1993) Inhibition of PMA-induced, LFA-1-dependent lymphocyte aggregation by ADP ribosylation of the small molecular weight GTP binding protein, rho. *J. Cell Biol.* **120**: 1529–1537
- Trad A, Hedemann N, Shomali M, Pawlak V, Grötzinger J & Lorenzen I (2011) Development of sandwich ELISA for detection and quantification of human and murine a disintegrin and metalloproteinase17. *J Immunol Methods* **371**: 91–96
- Trifilieff A, Walker C, Keller T, Kottirsch G & Neumann U (2002) Pharmacological profile of PKF242-484 and PKF241-466, novel dual inhibitors of TNF-alpha converting enzyme and matrix metalloproteinases, in models of airway inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **135**: 1655–1664

- Tucher J, Linke D, Koudelka T, Cassidy L, Tredup C, Wichert R, Pietrzik C, Becker-Pauly C & Tholey A (2014) LC-MS Based Cleavage Site Profiling of the Proteases ADAM10 and ADAM17 Using Proteome-Derived Peptide Libraries. *J. Proteome Res.*
- van der Linden R, de Geus B, Stok W, Bos W, van Wassenaar D, Verrips T & Frenken L (2000) Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *J Immunol Methods* **240**: 185–195
- Vandenbroucke K, de Haard H, Beirnaert E, Dreier T, Lauwereys M, Huyck L, Van Huysse J, Demetter P, Steidler L, Remaut E, Cuvelier C & Rottiers P (2010) Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. *Mucosal Immunol* **3**: 49–56
- Vincke C, Gutiérrez C, Wernery U, Devoogdt N, Hassanzadeh-Ghassabeh G & Muyldermans S (2012) Generation of single domain antibody fragments derived from camelids and generation of manifold constructs. *Methods Mol Biol* **907**: 145–176
- Visschedyk DD, Perieteanu AA, Turgeon ZJ, Fieldhouse RJ, Dawson JF & Merrill AR (2010) Photox, a novel actin-targeting mono-ADP-ribosyltransferase from *Photobacterium luminescens*. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 13525–13534
- Vogelsgesang M, Stieglitz B, Herrmann C, Pautsch A & Aktories K (2008) Crystal structure of the *Clostridium limosum* C3 exoenzyme. *FEBS Lett.* **582**: 1032–1036
- Walev I, Vollmer P, Palmer M, Bhakdi S & Rose-John S (1996) Pore-forming toxins trigger shedding of receptors for interleukin 6 and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 7882–7887
- Walter MR, Windsor WT, Nagabhushan TL, Lundell DJ, Lunn CA, Zauodny PJ & Narula SK (1995) Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor. *Nature* **376**: 230–235
- Weng B, Thompson WC, Kim HJ, Levine RL & Moss J (1999) Modification of the ADP-ribosyltransferase and NAD glycohydrolase activities of a mammalian transferase (ADP-ribosyltransferase 5) by auto-ADP-ribosylation. *J. Biol. Chem.* **274**: 31797–31803
- Wesolowski J (2006) Klonierung und Mutagenese von rekombinanten Einzeldomänen-Antikörpern von Lama und Kaninchen. *Diplomarbeit, Universität Hamburg, MIN-Fakultät*
- Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauherff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Boyer O, Seman M, Licea A, Serreze DV, Goldbaum FA, Haag F & Koch-Nolte F (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol.* **198**: 157–174
- Willems SH, Tape CJ, Stanley PL, Taylor NA, Mills IG, Neal DE, McCafferty J & Murphy G (2010) Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *Biochem J* **428**: 439–450

- Yamashita Y, Okamoto M, Ikeda M, Okamoto A, Sakai M, Gunji Y, Nishimura R, Hishinuma M & Shimada M (2014) Protein kinase C (PKC) increases TACE/ADAM17 enzyme activity in porcine ovarian somatic cells, which is essential for granulosa cell luteinization and oocyte maturation. *Endocrinology* **155**: 1080–1090
- Yip L, Woehrle T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, Inoue Y, Ferrari V, Insel PA & Junger WG (2009) Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *The FASEB Journal* **23**: 1685–1693
- Zhang RG, Scott DL, Westbrook ML, Nance S, Spangler BD, Shipley GG & Westbrook EM (1995) The three-dimensional crystal structure of cholera toxin. *Journal of Molecular Biology* **251**: 563–573
- Zhou B-BS, Fridman JS, Liu X, Friedman SM, Newton RC & Scherle PA (2005) ADAM proteases, ErbB pathways and cancer. *Expert Opin Investig Drugs* **14**: 591–606
- Zhou H, Huiatt TW, Robson RM, Sernett SW & Graves DJ (1996) Characterization of ADP-ribosylation sites on desmin and restoration of desmin intermediate filament assembly by de-ADP-ribosylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **334**: 214–222
- Zolghadr K, Gregor J, Leonhardt H & Rothbauer U (2012) Case study on live cell apoptosis-assay using lamin-chromobody cell-lines for high-content analysis. *Methods Mol Biol* **911**: 569–575
- Zolkiewska A (2005) Ecto-ADP-ribose transferases: cell-surface response to local tissue injury. *Physiology* **20**: 374–381

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den

Stephan Menzel