

Prozessierung des humanen GARP–Rezeptors und die physiologischen Auswirkungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität

Sven Fridrich
geboren am 10. April 1984
in Wiesbaden

Mainz, den 16. Januar 2015

Gutachter:

Dekan:

1. Berichterstatter
2. Berichterstatter

Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.2015

„Der Mut zum Optimismus ist die Grundlage des Erfolgs.“

— Robert Lerch —

Zusammenfassung

GARP (*Glycoprotein A Repetitions Predominant*) ist ein Oberflächenrezeptor auf regulatorischen T-Zellen (T_{Regs}), der den latenten TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) bindet. Ein Funktionsverlust von T_{Regs} hat gravierende Autoimmunerkrankungen wie das *Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked Syndrome* (IPEX), Multiple Sklerose (MS) oder Rheumatoide Arthritis (RA) zur Folge. GARP stellt über eine Erhöhung der Aktivierbarkeit von TGF- β den regulatorischen Phänotyp von T_{Regs} sicher und inhibiert die Ausbreitung von autoreaktiven $T_{\text{H}}17$ Zellen.

In dieser Arbeit stand die Regulation von GARP selbst im Mittelpunkt. Es konnte gezeigt werden, dass es sich innerhalb der kiefertragenden Vertebraten um ein strikt konserviertes Protein handelt. Datenbankanalysen machten deutlich, dass es zuerst in basalen Knochenfischen zusammen mit anderen Komponenten der adaptiven Immunantwort auftritt. Ein 3D-Modell, welches über Homologiemodellierung erstellt wurde, gab Aufschluss über die Struktur des Rezeptors und mögliche intramolekulare Disulfidbrücken. Für *in vitro* Versuche wurde eine lösliche Variante von GARP durch einen Austausch der Transmembrandomäne durch C-terminale Meprin α Domänen konstruiert. Diese Variante wurde in der eukaryotischen Zellkultur zuverlässig in den Überstand sezerniert und konnte chromatografisch gereinigt werden. Mit diesem rekombinanten GARP wurden Prozessierungsversuche mit Autoimmunpathogenese assoziierten Proteasen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Serinproteasen Trypsin, Neutrophile Elastase und Plasmin, sowie die Metalloprotease MMP2 in der Lage sind, GARP vollständig zu degradieren. In TGF- β sensitiven Proliferationsuntersuchungen stellte sich heraus, dass die entstandenen Fragmente immer noch in der Lage waren die Aktivierbarkeit von TGF- β zu erhöhen. Neben der Degradierung durch die oben genannten Proteasen konnte ebenfalls beobachtet werden, dass MMP9 und Ovastacin in der Lage sind GARP spezifisch zu schneiden. Ovastacin mRNA wurde in dieser Arbeit das erste Mal außerhalb der Oocyte, in T-Zellen beschrieben. Mit GARP wurde zudem das zweite Proteinsubstrat, neben dem Zona Pellucida Protein 2 identifiziert. Das durch MMP9 erzeugte N-terminale Fragment besitzt zwar die Eigenschaft, an TGF- β zu binden, kann aber die Aktivierbarkeit von TGF- β nicht mehr wie das intakte GARP erleichtern.

Diese Arbeit zeigte, dass GARP durch Proteolyse reguliert wird, wobei die entstehenden Fragmente unterschiedlichen Einfluss auf die Aktivierbarkeit von TGF- β haben. Dieses Wissen bildet die Grundlage für weitere Untersuchungen im translationalen Forschungsbereich, um die gewonnenen Erkenntnisse zur Immunmodulation in der Therapie verschiedener Krankheiten einsetzen zu können.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	vii
1. Einleitung	1
1.1. Das Immunsystem	2
1.2. Immunologische Regulation	4
1.2.1. T-Zell Reifung	5
1.2.2. Regulatorische T-Zellen (T_{Regs})	7
1.3. <i>Glycoprotein A Repetitions Predominant</i> (GARP)	11
1.3.1. GARP auf der Oberfläche von T_{Regs}	13
1.3.2. GARP ist ein Rezeptor für latenten TGF- β	13
1.3.3. Nicht-proteolytische Aktivierung von TGF- β	14
1.3.4. Proteolytische Aktivierung von TGF- β	15
1.4. Proteasen	16
1.4.1. Serin- und Metalloproteasen	17
1.4.2. Proteasen der Astacin-Familie	19
1.4.3. Matrix-Metalloproteasen (MMPs)	21
1.4.4. Die Rolle von Metalloproteasen in der Autoimmunität am Beispiel der Gelatinasen und Rheumatoider Arthritis (RA)	22
1.5. Zentrale Fragestellung dieser Arbeit	24
2. Material und Methoden	27
2.1. Gentechnische Methoden	27
2.1.1. Verwendete Plasmide	27
2.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.1.3. Agarose Gelelektrophorese	28
2.1.4. Klonierung von DNA-Fragmenten	29
2.1.5. Transformation von Bakterien	30
2.1.6. Plasmidisolation aus Bakterienkulturen	31
2.1.7. Isolation und reverse Transkription von RNA	31
2.2. Eukaryotische Zellbiologie	31
2.2.1. Verwendete Zelllinien	31

2.2.2.	Splitten der Zellen	32
2.2.3.	Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen	32
2.2.4.	Transfektion von Säugerzellen	33
2.2.5.	TGF- β Aktivitätsassay	34
2.3.	Proteinexpression und Reinigung	35
2.3.1.	Das Baculovirus Expressionssystem	35
2.3.2.	Vorreinigung des konditionierten Mediums	35
2.3.3.	Affinitätschromatografische Reinigung von GARP _{TS} mittels einer Ni-NTA Säule	36
2.3.4.	Affinitätschromatografische Reinigung von TGF- β _{Strep} mittels einer Strep-Tactin Säule	37
2.4.	Proteinbiochemie	37
2.4.1.	UV/Vis-Spektroskopie	37
2.4.2.	Natrimdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.4.3.	Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blau . .	39
2.4.4.	Färbung von Polyacrylamidgelen mit Silbernitrat	39
2.4.5.	Western-Blotting und Immundetektion	40
2.4.6.	Prozessierung von proTGF- β mit Furin	41
2.4.7.	Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie	41
2.4.8.	<i>In vitro</i> Kopplung von GARP und TGF- β über Disulfidbrücken .	42
2.4.9.	<i>Pull-Down</i> Assay	42
2.4.10.	Proteinpräzipitation mit Trichloressigsäure und Natrium-Desoxycholat	43
2.5.	Bioinformatik	43
2.5.1.	Datenbanksuche nach GARP Genen in anderen Spezies	44
2.5.2.	Erstellung von Sequenz-Alignments	44
2.5.3.	Generierung molekularer Stammbäume	44
2.5.4.	Modellierung des GARP Rezeptors	45
3.	Ergebnisse	47
3.1.	Bioinformatische Analyse von GARP	47
3.1.1.	Verbreitung des GARP-Gens	47
3.1.2.	Stammbaumrekonstruktion durch die GARP-Proteinsequenz . . .	49
3.1.3.	Modellierung des GARP-Rezeptors	51
3.2.	cDNA Screening von stimulierten und unstimulierten T-Zellen	52
3.3.	Klonierung der für die Arbeit bedeutenden Gene	54
3.3.1.	Das Konstrukt „GARP ohne Transmembranregion“ (GARP $_{\Delta TM}$) .	54
3.3.2.	Das Konstrukt „GARP <i>full-length</i> “ (GARP _{FL})	55

3.3.3.	Das Konstrukt „GARP <i>tail-switch</i> “ (GARP _{TS})	56
3.3.4.	Das Konstrukt „TGF- β mit Strep-Tag“ (TGF- β Strep)	58
3.3.5.	Transposition von GARP _{TS} und TGF- β Strep in Bacmide	59
3.4.	Expression der Konstrukte in HEK 293H Zellen	60
3.4.1.	Expression der verschiedenen GARP-Varianten	61
3.4.2.	Expression des Konstrukts TGF- β Strep	62
3.4.3.	Coexpression von TGF- β Strep und GARP _{FL}	62
3.5.	Reinigung von GARP _{TS} und TGF- β Strep aus Hi5-Überständen	63
3.5.1.	Ni-NTA Affinitätschromatografie von GARP _{TS}	64
3.5.2.	Strep-Tactin Affinitätschromatografie von TGF- β Strep	65
3.6.	CD-Spektroskopie von GARP und TGF- β	67
3.7.	Bindung von GARP an TGF- β	69
3.8.	Prozessierung von GARP	71
3.8.1.	Degradierung von GARP	71
3.8.2.	Die Prozessierung von GARP durch MMP9	73
3.8.3.	Prozessierung des GARP-TGF- β Komplexess durch MMP9	78
3.8.4.	Prozessierung von GARP durch Ovastacin	79
3.9.	Einfluss von GARP und TGF- β auf die Zellproliferation	81
3.9.1.	Auswirkung der Proteolyse von GARP auf die Aktivierbarkeit von TGF- β	84
4.	Diskussion	89
4.1.	Bioinformatische Charakterisierung von GARP	89
4.1.1.	GARP evolvierte simultan mit dem adaptiven Immunsystem	89
4.1.2.	GARP besitzt mehrere für Proteolyse zugängliche Regionen	92
4.2.	Herstellung der für die Arbeit bedeutenden Proteine	93
4.3.	Charakterisierung des GARP-TGF- β Komplex	94
4.4.	Proteasekandidaten einer möglichen GARP Prozessierung	98
4.5.	Prozessierung von GARP und die Auswirkungen auf die TGF- β Akti- vierbarkeit	100
4.5.1.	Degradierung von GARP durch die Proteasen Trypsin, Neutrophili- le Elastase und Plasmin	100
4.5.2.	Spaltung von GARP durch MMP2 und MMP9	102
4.5.3.	Prozessierung von GARP durch Ovastacin	106
4.6.	Einfluss auf zukünftige Arbeiten und Ausblick	107
A.	Abkürzungen	129
B.	Alignments	135

C. Zusätzliche Daten	145
D. Plasmidkarten	147
E. Primer	149
F. DNA- und Proteinsequenzen	151
G. Hersteller und Produzenten	155
Curriculum Vitae	157
Danksagung	161
Eidesstattliche Erklärung	163

Tabellenverzeichnis

2.1. Verwendete Plasmide	28
2.2. Standardisiertes PCR-Programm	29
2.3. Verwendete Zelllinien	32
2.4. Puffer für die SDS-PAGE	38
2.5. Zusammensetzung der SDS-Gele	39
2.6. Puffer für die Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	39
2.7. Verwendete Antikörper	40
3.1. Nach einem GARP-Gen durchsuchte Genome	48
3.2. cDNA Screening von Proteasen in T-Zellen	53
3.3. Proteasescreening GARP _{TS}	71
B.1. ID der identifizierten GARP-Gene	135
B.2. Alignment der Vertebraten GARP-Proteine	136
B.3. Alignment für die Modellierung von GARP	143
B.4. Alignment der GARP-Ectodomäne aus <i>H.sapiens</i> und <i>C.milli</i>	144
E.1. Sequenzen der verwendeten Primer zur Erstellung rekombinanter Expressionsvektoren	149
E.2. Sequenzen der für das mRNA Screening verwendeten Primer	150
F.1. DNA- und Proteinsequenz des Konstrukts TGF- β Strep	151
F.2. DNA- und Proteinsequenz des Konstrukts GARP _{FL}	152
F.3. DNA- und Proteinsequenz des Konstrukts GARP _{TS}	153

Abbildungsverzeichnis

1.1. Hippokrates von Kos	1
1.2. Zelltypen der Immunantwort	3
1.3. Die Reifung der T-Zellen	5
1.4. Immunsuppressive Mechanismen der T_{Regs}	9
1.5. Die GARP-Domänenstruktur auf DNA und Proteinebene	12
1.6. Eigenschaften der Serinproteasen	18
1.7. Eigenschaften der Metzinkine	19
2.1. Aufbau des Blot-Sandwichs	40
3.1. Konsensusbaum des GARP-Proteins ausgewählter Spezies	50
3.2. 3D-Modell und Domänenzusammensetzung von GARP	51
3.3. Agarose Gele des cDNA Screenings	54
3.4. Klonierungsschema des Konstrukts GARP_{FL}	55
3.5. Klonierungsschema des Konstrukts GARP_{TS}	57
3.6. Klonierungsschema des Konstrukts $\text{TGF-}\beta_{\text{Strep}}$	58
3.7. Überprüfung der Transposition von $\text{TGF-}\beta_{\text{Strep}}$ und GARP_{TS} cDNA	59
3.8. Expression der GARP-Varianten in HEK 293H Zellen	60
3.9. Expression von $\text{TGF-}\beta_{\text{Strep}}$ in HEK 293H Zellen	62
3.10. Coexpression von GARP_{FL} und $\text{TGF-}\beta_{\text{Strep}}$ in HEK 293H Zellen	63
3.11. Vorreinigung von GARP_{TS} und $\text{TGF-}\beta_{\text{Strep}}$ durch Affi-Blue Chromatografie	64
3.12. Ni-NTA Affinitätschromatografie von GARP_{TS}	65
3.13. Strep-Tactin Affinitätschromatografie von $\text{TGF-}\beta_{\text{Strep}}$	66
3.14. CD-Spektroskopie von GARP_{TS}	67
3.15. CD-Spektroskopie von $\text{TGF-}\beta_{\text{Strep}}$	68
3.16. CD-Spektroskopie des GARP $\text{TGF-}\beta$ Komplexes	69
3.17. <i>In vitro</i> Kopplung von GARP_{TS} und $\text{TGF-}\beta_{\text{Strep}}$	70
3.18. Inkubation von GARP_{TS} und Meprin β	72
3.19. Degradierung von GARP_{TS}	72
3.21. Spaltung von GARP_{TS} durch MMP9 / Silberfärbung	73

3.20. Spaltung von GARP _{TS} durch MMP 9 / Immundetektion	74
3.22. Schema der Fragmentierung von GARP _{TS} durch MMP9	76
3.23. Spaltung von GARP _{FL} in HEK 293H Zellen durch MMP9, MMP2, Neu- trophile Elastase, Plasmin und Trypsin	77
3.24. Spaltung des GARP TGF- β Komplexes durch MMP 9	78
3.25. Spaltung des Komplexes aus latentem TGF- β und GARP durch MMP9 .	79
3.26. Spaltung von GARP durch Ovastacin	80
3.27. Einfluss von TGF- β auf die Mv1Lu-Zellproliferation	81
3.28. Einfluss von GARP auf die Mv1Lu-Zellproliferation	82
3.29. Einfluss von GARP auf die TGF- β Aktivität	83
3.30. Einfluss der kovalenten Bindung von TGF- β an GARP auf die Mv1Lu- Zellproliferation	84
3.31. Einfluss der Spaltung von GARP auf die Aktivierbarkeit von TGF- β . .	85
3.32. Einfluss der Spaltung von GARP auf die Mv1Lu-Zellproliferation	86
3.33. Einfluss des GARP N-terminus auf die Aktivierbarkeit von TGF- β . . .	87
4.1. Molekularer Stammbaum der Wirbeltiere	91
4.2. Schema Bindung von TGF- β an GARP	97
4.3. Spaltung des GARP-TGF- β Komplexes durch MMP2 oder MMP9	105
4.4. Schema der Fragmentierung von GARP _{TS} durch Ovastacin	106
C.1. Kontrolle der Proteasen Elastase, Plasmin und Trypsin auf die TGF- β Aktivierbarkeit	145
C.2. Kontrolle des Einflusses von RGD-Peptiden auf die Proliferation von Mv1Lu Zellen	146
D.1. pGEM-T Vektorkarte	147
D.2. pCMV-Sport6 Vektorkarte	147
D.3. pBluescriptR Vektorkarte	148
D.4. pIRES-neo2 Vektorkarte	148
D.5. pFastBac1 Vektorkarte	148

1. Einleitung

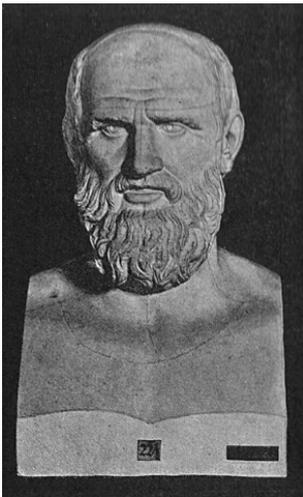


Abbildung 1.1.:

Hippokrates von Kos

Begründer der modernen, westlichen Medizin. Ca. 460 bis 370 v. Chr. Aus: „Baumeister: Denkmäler des klassischen Altertums. 1885. Band I., Seite 694.“

Bis in die jüngere Vergangenheit wurden Krankheiten oft als „Geißel Gottes“ angesehen, obwohl schon um das Jahre 460 v. Chr. unter Hippokrates von Kos die Grundlagen der modernen, westlichen Medizin (Abb. 1.1) entwickelt worden waren. Er stellte das Handeln des Arztes in den Mittelpunkt der medizinischen Behandlung und löste das Schicksal des Patienten vom Einfluss der Götter. Obwohl über die Jahrhunderte neue Erkenntnisse über Anatomie und Pharmakologie gewonnen wurden, dauerte es nach Hippokrates über 2000 Jahre bis der Mensch im Stande war, sich vor einer Erkrankung präventiv zu schützen. 1796 gelang es Edward Jenner, bei Dritten durch die gezielte Infektion mit einem Laborstamm des Kuhpockenvirus (*Orthopoxis vaccinia*) Immunität gegen die oft tödlich verlaufende Infektion mit echten Pocken (*Orthopoxvirus variola*) zu erlangen. Es sollten jedoch weitere 100 Jahre vergehen bis die Mediatoren der Immunität, die Antikörper, erstmals von Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato beschrieben wurden. Zur gleichen Zeit, 1882, wurden von Ilja Metschnikow in Seesternen Zellen beobachtet, die an der Phagocytose von Fremdkörpern beteiligt waren. Die homologen Zellen der Vertebraten werden heute als Makrophagen und Neutrophile Granulozyten bezeichnet. Sie sind elementare Bestandteile des Immunsystems, und dienen der Erkennung und Abwehr von Pathogenen.

1.1. Das Immunsystem

Zusammen mit den mechanischen und physiologischen Barrieren des Körpers wird der Verband von Zellen, die den Körper vor Infektionen schützen allgemein als Immunsystem bezeichnet. Dabei bildet die Haut als größtes menschliches Organ durch ihre Hornschicht eine massive Barriere für Krankheitserreger jeglicher Art. Empfindlichere Epithelien werden durch antimikrobielle Substanzen wie zum Beispiel Lysozym in der Tränenflüssigkeit oder im Speichel geschützt.

Die zelluläre Immunabwehr fußt auf zwei unterschiedlichen Mechanismen, die miteinander eng verzahnt sind. Diese zwei Reaktionswege werden als angeborene und adaptive Immunantwort bezeichnet. Bei der angeborenen Immunantwort werden eindringende Pathogene anhand universeller Merkmale, sogenannter „*Pathogen associated molecular patterns*“ (PAMPs) wie Zellwandbestandteilen von Bakterien oder Pilzen sowie DNA-Motiven erkannt und bekämpft. Hierzu steht den Zellen der angeborenen Immunantwort eine Vielzahl molekularer Mechanismen zur Verfügung (Abb. 1.2). Neutrophile Granulozyten und Makrophagen, die den Hauptanteil der Zellen des angeborenen Immunsystems ausmachen, können eindringende Pathogene phagozytieren und intrazellulär abbauen. Außerdem sezernieren vor allem Neutrophile Granulozyten und die weniger häufig vorkommenden Basophilen- und Eosinophilen Granulozyten cytotoxische und degradierende Enzyme in den extrazellulären Raum. Dadurch sind sie in der Lage, die Verbreitung und Vermehrung von Pathogenen einzudämmen. Des Weiteren sind Mastzellen zusammen mit den Granulozyten für die Einleitung der Entzündungsreaktion verantwortlich. Die Mastzellen spielen bei der allergischen Sofortreaktion eine fundamentale Rolle. Sie setzen Mediatoren frei, die zu einer lokalen oder systemischen Erhöhung der Körpertemperatur (Fieber), sowie zur Erweiterung der Blut- und Lymphgefäße der entzündeten Körperregion führen. Eine besondere Rolle erfüllen die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Sie stammen von Vorläuferzellen ab, aus welchen sich auch die verschiedenen Zelltypen der adaptiven Immunantwort differenzieren. Im Gegensatz zu diesen sind sie aber nicht pathogenspezifisch, sondern erkennen stattdessen entartete oder mit Viren infizierte Zellen. Sie können deren Apoptose auslösen und so die Ausbreitung der Krankheit eindämmen.

Als Schnittstelle zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort fungieren die Dendritischen Zellen (DCs). Sie werden mit den Makrophagen und den B-Zellen als Antigen präsentierende Zellen (APCs) zusammengefasst. Im Gegensatz zu den Makrophagen sind sie jedoch als einziger Zelltyp in der Lage, T-Zellen zu aktivieren. Diese wiederum initiieren die Reifung der B- zur Plasmazelle und der anschließenden Antikörperproduktion (Abb. 1.2).

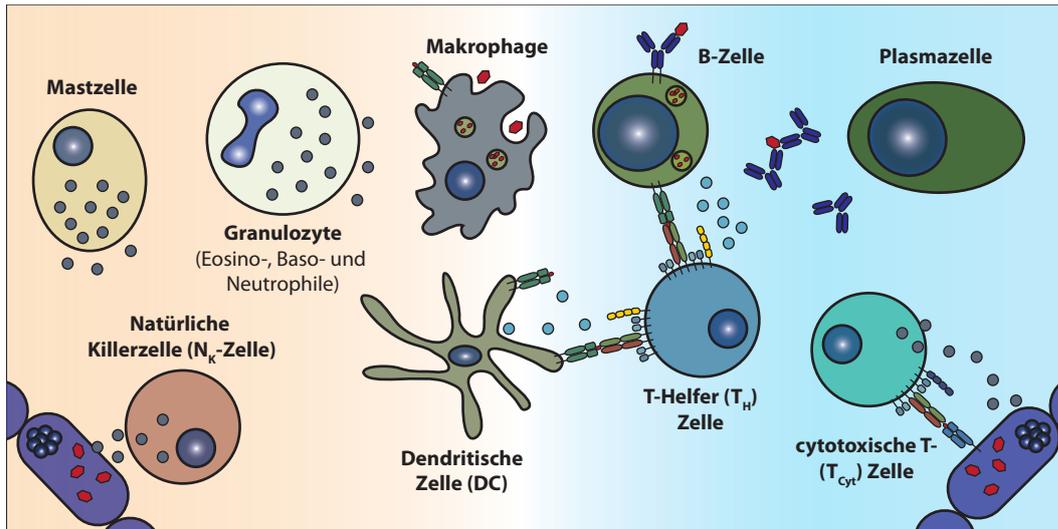


Abbildung 1.2.: Zelltypen der Immunantwort

Die verschiedenen Zelltypen die der angeborenen (links, gelb) und adaptiven (rechts, blau) Immunantwort angehören. N_K -Zellen und T_{Cyt} -Zellen können befallene Zellen direkt attackieren und Apoptose induzieren. Makrophagen und DCs nehmen Pathogene auf und präsentieren Antigene auf ihrer Oberfläche. T_H -Zellen binden an DCs und werden aktiviert. Aktivierte T_H2 -Zellen wiederum initiieren die Reifung von B- zu Plasmazellen. Plasmazellen sezernieren Antikörper und Granulozyten sind in der Lage, antimikrobielle Substanzen zu produzieren. Mastzellen sind an der allergischen Immunantwort beteiligt und sezernieren Histamin nach ihrer Stimulation. Zusammengefasst aus ACHA-ORBEA ET AL. (2012, IN JANEWAY'S IMMUNOBIOLOGY).

Haben DCs oder Makrophagen in der Peripherie Antigene eines Pathogens aufgenommen, so wandern sie über die lymphatischen Gefäße in die Lymphknoten oder die Milz. Dort treffen sie auf naive T- und B-Zellen und initiieren deren Aktivierung. Naive T-Zellen (T_N -Zellen) können direkt von DCs zur Reifung angeregt werden. Dabei hängt der Phänotyp der reifen T-Zellen von den Cytokinen ab, die während der Reifung im umgebenden Milieu vorherrschen. T-Zellen werden nach ihrer Reifung in zwei Großgruppen unterteilt, die durch Oberflächenmarker (CD, *cluster of differentiation*) definiert werden, Übersicht von ACHA-ORBEA ET AL. (2012, IN JANEWAY'S IMMUNOBIOLOGY). Man unterscheidet T-Zellen, die CD8 positiv sind von solchen, die positiv für CD4 sind. Die $CD8^+$ Zellen werden auch als cytotoxische T-Zellen (T_{Cyt}) bezeichnet. Sie docken antigenspezifisch an körpereigene, mit Viren infizierte Zellen an und leiten Apoptose ein, bevor sich das Virus in großen Mengen replizieren kann. Unter den $CD4^+$ T-Zellen lassen sich wiederum Effektor T-Zellen (T_{Eff}) und regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) unterscheiden. Alle diese T-Zellen sind positiv für CD4, unterscheiden sich aber in den exprimierten Transkriptionsfaktoren und Oberflächenmarkern. Die T_{Eff} lassen sich aufgrund der vorherrschenden Transkriptionsfaktoren in Untergruppen einteilen. T-Zellen,

die den Transkriptionsfaktor T-bet (*T-box expressed in T-cells*) exprimieren werden als T_{H1} Zellen bezeichnet (SZABO ET AL. 2000). Sie sind in der Lage Makrophagen zu aktivieren und deren intrazellulären Bakteriolyse zu steigern. T_{H2} Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor GATA-3 und sind vor allem in der mukosalen Immunantwort involviert (OUYANG ET AL. 2000). Sie können eine allergische Reaktion einleiten, wobei sie auch an der Rekrutierung von Eosinophilen Granulozyten beteiligt sind. Zudem bewirken sie die Reifung von B- zu Plasmazellen und einen Klassenwechsel in der Antikörperproduktion. T_{H17}-Zellen sind durch den Transkriptionsfaktor ROR γ T (*retinoic acid-related orphan receptor gamma T*) gekennzeichnet (IVANOV ET AL. 2007) und setzen vor allem Interleukin 17 frei, das die Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten bewirkt. Die T_{Regs} stellen in der Familie der CD4⁺ Zellen eine Sonderstellung dar. Sie beteiligen sich nicht an der Pathogenabwehr oder Aktivierung von B-Zellen, sondern sind vielmehr ein Teil des körpereigenen Immunregulationsmechanismus (s. Regulatorische T-Zellen, S. 7). Ihre regulatorischen Fähigkeiten korrelieren mit der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (*forkhead box protein 3*) und sind unter den CD4⁺ Zellen charakteristisch (HORI ET AL. 2003).

1.2. Immunologische Regulation

Die Fähigkeit des Immunsystems zwischen Selbst und Fremd zu unterscheiden ist die Grundvoraussetzung einer erfolgreichen Abwehr von Pathogenen, ohne dem eigenen Körper zu schaden. Im Falle des angeborenen Immunsystems wird dies dadurch erreicht, dass die Rezeptoren ausschließlich PAMPs erkennen. Diese Merkmale von Pathogenen sind hochgradig konserviert und treten in keiner Weise im Wirtsorganismus auf, sodass von den Zellen des angeborenen Immunsystems keine Gefahr für den eigenen Organismus ausgeht.

Bei B- und T-Zellen ist dies anders. Sie durchlaufen in ihrer Entwicklung mehrere Stadien im Knochenmark und Thymus während derer die Genregionen, die für die B-, beziehungsweise T-Zellrezeptoren kodieren, eine somatische Rekombination erfahren. So kann dieses Gen in mehreren Millionen Variationen vorliegen, wodurch Rezeptoren mit unterschiedlichen Antigenespezifitäten gebildet werden. Diese VDJ-Rekombination ist äußerst effektiv, da sie dem Körper prinzipiell für jedes Antigen einen Rezeptor beziehungsweise Antikörper zur Verfügung stellt, Übersicht in BEVAN ET AL. (2012, IN JANEWAY'S IMMUNOBIOLOGY). Auf der anderen Seite birgt diese Art der Antigenrezeptor-Entstehung auch die Gefahr, dass Rezeptoren mit einer Spezifität gegenüber körpereigenen Proteinen entstehen.

Zellen, die mit solchen Rezeptoren ausgestattet sind, sind in der Lage massive Autoimmunreaktionen hervorzurufen und den Körper extrem zu schädigen. Um das zu verhindern besitzt der Körper zwei Regulationsmechanismen. Zum einen die Selektion der B-Zellen im Knochenmark oder der T-Zellen im Thymus. Die B-Zellen durchlaufen im Knochenmark eine sogenannte positive Selektion, in der sichergestellt wird, dass ein funktioneller B-Zell Rezeptor gebildet werden kann. Zusätzlich werden während der Reifung der T-Zellen im Thymus neben T_N auch T_{Regs} gebildet. Sie verhindern in der Peripherie des Körpers ein Ausbrechen und Ausufern von (Auto)Immunreaktionen. Da sich diese Arbeit vor allem mit den regulatorischen Mechanismen auf T-Zell Ebene befasst, soll im Folgenden besonders auf die Regulation und Entwicklung der T-Zellen eingegangen werden.

1.2.1. T-Zell Reifung

T-Zellen entstehen wie die B-Zellen im Knochenmark. Im Gegensatz zu B-Zellen wandern die T-Vorläuferzellen jedoch aus dem Knochenmark in den Thymus aus. Sie durchlaufen dort in mehreren Schritten eine komplexe Rekombination der Gene, die für ihre T-Zell Rezeptoren (TCR), welche aus einer α - und β -Kette bestehen, codieren. Im Zuge dieses Reifungsprozesses kommt es zu einer exzessiven Zellproliferation. Es sterben jedoch ca. 98 % dieser Zellen durch Apoptose, da sie keinen funktionellen oder einen autoreaktiven TCR ausgebildet haben. Die einzelnen Phasen der T-Zellreifung werden durch das Auftreten und Verschwinden der beiden TCR Corezeptoren CD4

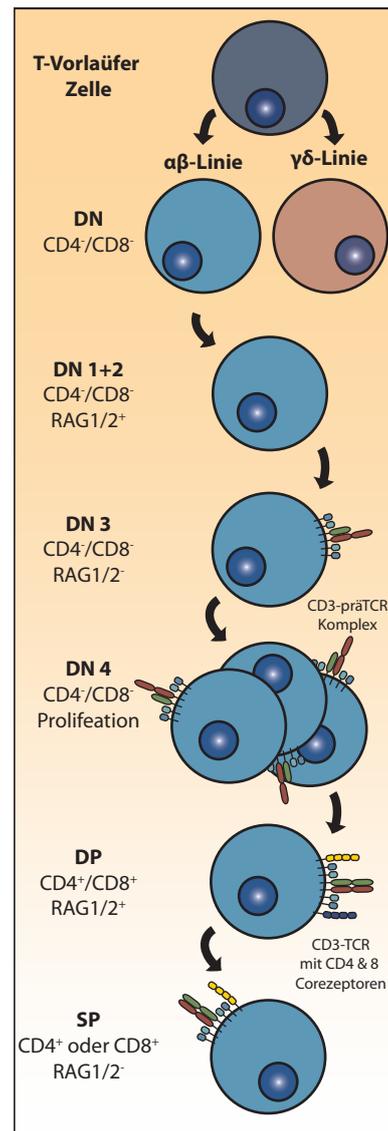


Abbildung 1.3.:

Die Reifung der T-Zellen

Die Stadien der T-Zell Reifung von der T-Vorläuferzelle (oben) bis zur „single positive“ T_{Eff} -Zelle (unten). Alle Stadien laufen dabei im Thymus ab. Erstellt nach BEVAN ET AL. (2012, IN JANEWAY'S IMMUNOBIOLOGY).

und CD8 definiert. Die erste Phase wird als „*double negative*“ (DN) bezeichnet, da hier weder CD4 noch CD8 exprimiert werden. Außerdem fehlt zu diesem Zeitpunkt auch der für T-Zellen charakteristische Oberflächenmarker CD3. Diese Zellpopulation enthält Vorläuferzellen zweier verschiedener T-Zelllinien, die später unterschiedliche TCR exprimieren werden. Dies sind zum einen die $\gamma\delta$ T-Zellen, welche ihren TCR aus der γ - und δ -Kette bilden. Diese Zellen verlassen den Thymus direkt und wandern in die Peripherie (BEVAN ET AL. 2012). Ihre Funktion ist bisher noch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass sie eine Rolle bei der Vernetzung des angeborenen mit dem adaptiven Immunsystem (HOLTMEIER UND KABELITZ 2005, BORN ET AL. 2006) spielen. Diese Zellen machen aber nur einen sehr geringen Teil der heranreifenden T-Zellen aus. Der Großteil wird am Ende der Reifung die α - und β -Kette des TCR exprimieren und dementsprechend als $\alpha\beta$ T-Zellen bezeichnet werden. Die weiteren Schritte werden in vier Stadien unterteilt und als DN1–4 bezeichnet. In DN1 und 2 werden die Rekombinasen RAG1 und 2 (*Recombination-Activating Protein*) exprimiert. Sie leiten die Rekombination der V, D und J Segmente des Gens der β -Kette des TCR ein. Wenn durch die Rekombination der einzelnen Gensegmente keine funktionelle β -Kette zu Stande kommt, wird die Zelle durch Apoptose vernichtet. Kann eine funktionelle β -Kette gebildet werden, paart sie sich mit der noch nicht rekombinierten α -Kette (prä- α -Kette) an der Zelloberfläche und bildet den prä-TCR Komplex. Dieses Stadium wird als DN3 beschrieben. Zu diesem Zeitpunkt wird auch der intrazelluläre Abbau der Rekombinasen RAG1 und 2 eingeleitet und die Rekombination der β -Kette beendet. Dies geht einher mit der Expression von CD3, welches an der Oberfläche den prä-TCR Komplex bindet und eine massive Zellproliferation einleitet. Der anschließende Zeitraum von ca. 3 bis 4 Tagen wird als DN4 bezeichnet. Am Ende der Proliferationsphase beginnt die Zelle die beiden Corezeptoren CD4 und CD8 zu exprimieren, sodass ab diesem Zeitpunkt von einer „*double-positive*“ (DP) Population gesprochen wird. Ab jetzt werden erneut RAG1 und 2 exprimiert um den Genlocus der α -Kette des TCR neu zu rekombinieren. Dies geschieht solange, bis ein funktioneller TCR aus reifer α - und β -Kette in der Lage ist ein MHC(*major histocompatibility complex*)-Eigenpeptid-Komplex zu binden. Die MHC-Eigenpeptid-Komplexe werden von DCs, Makrophagen oder epithelialen Zellen innerhalb des Thymus gestellt. Gelingt eine Interaktion zwischen TCR und MHC-Eigenpeptid-Komplex nicht, wird Apoptose in der entsprechenden Zelle eingeleitet. Dieser Vorgang wird als positive Selektion bezeichnet, da nur Zellen überleben, die positiv für die Erkennung von MHC-Eigenpeptid Komplexen sind. Zu diesem Zeitpunkt entscheidet sich zudem, ob sich die DP T-Zellen zur CD4 oder CD8 Linie differenzieren. Ist ihr TCR in der Lage an den MHC I zu binden wird die Expression von CD4 herunter reguliert und die von CD8 verstärkt. Die Zelle verlässt den Thymus als CD8 „*single-positive*“ (SP) T_{Cyt}-Zelle. Bindet der TCR an den MHC II so wird das CD4 Signal verstärkt und die Zelle entwickelt sich in Richtung der T_H-

Linie. Sollte jedoch während dieser Phase eine zu starke Bindung vom TCR zum MHC auftreten, führt dies ebenso zu einer Induktion von Apoptose, als hätte keine Bindung stattgefunden. Dieser Vorgang wird negative Selektion genannt und dient zur Elimination von autoreaktive T-Zellen, da sie das Potential besitzen, Autoimmunreaktionen hervorzurufen. Eine dritte Variante, nämlich eine mittelstarke Interaktion vom TCR zu einem MHC II–Eigenpeptid–Komplex, führt zur Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3. Dieser Transkriptionsfaktor bindet an die Konsensussequenz GTAAACAA und induziert über seine Zielgene einen regulatorischen Phänotyp in diesen CD4⁺ T-Zellen (WU ET AL. 2006, SADLON ET AL. 2010). Zudem wird der Oberflächenmarker CD25 stark hochreguliert und die Zelle als natürlicher T_{Reg} (nT_{Reg}) bezeichnet, nachdem sie den Thymus verlassen hat.

1.2.2. Regulatorische T–Zellen (T_{Regs})

T-Zellen mit einer immunsuppressiven Funktion wurden bereits in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts beschrieben (CANTOR ET AL. 1976). Dabei wurden verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Markern als T-Suppressorzellen diskutiert. Darunter waren eine Vielzahl an Zelltypen, wie CD8⁺, CD4⁻CD8⁻ und $\gamma\delta$ T-Zellen. Da in den folgenden Jahren trotz intensiver Forschung keine schlüssigen Marker zur endgültigen Definition gefunden wurden, konnte ihre Existenz schließlich nicht belegt werden. Anfang der 80er Jahre wurde unter der Leitung von SHIMON SAKAGUCHI (1982) die Existenz von T_{Regs} in der CD4⁺ T-Zellpopulation von Mäusen nachgewiesen; außerdem konnten diese Zellen als CD4⁺CD25⁺ Zellen identifiziert werden (SAKAGUCHI ET AL. 1995). Dabei stellte sich heraus, dass T_{Regs} maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz beteiligt sind und eine wichtige Rolle bei der Prävention von Autoimmunerkrankungen spielen (SAKAGUCHI ET AL. 1985).

Die rezessiv vererbte Mausmutante „*Scurfy*“ stellt für das Verständnis der Immunregulation ein hervorragendes Beispiel dar. Im homozygoten Zustand erleiden die betroffenen Tiere 16–25 Tage nach der Geburt Entzündungsreaktionen in den verschiedensten Organen und sterben. Diese starken Autoimmunreaktionen werden durch den kompletten Verlust von T_{Regs} ausgelöst. Eine genetische Analyse dieser Mutante zeigte eine *loss-of-function* Mutation im Gen FoxP3 (BRUNKOW ET AL. 2001). Das menschliche Äquivalent zum *Scurfy*-Phänotyp ist die angeborene Autoimmunerkrankung IPEX (*immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*). Auch hier ist eine *loss-of-function* Mutation im FoxP3 Gen für das vollständige Fehlen von T_{Regs} verantwortlich (WILDIN ET AL. 2001). Die besondere Bedeutung von FoxP3 für den regulatorischen Phänotyp wurde durch die retrovirale Transfektion von FoxP3 in T_N-Zellen bestätigt.

Die ektopische Expression von FoxP3 erzeugte in diesen Zellen einen regulatorischen Phänotyp. Somit kann Foxp3 als maßgeblicher Transkriptionsfaktor in T_{Regs} bezeichnet werden (HORI ET AL. 2003). Durch Inkubation von T_{N} -Zellen mit Interleukin-2 (IL-2) und dem *transforming growth factor* β (TGF- β) war es ebenso möglich eine Expression von FoxP3 und einen regulatorischen Phänotyp zu induzieren (CHEN ET AL. 2003). Zudem stabilisiert IL-2 und TGF- β den regulatorischen Phänotyp in nT_{Regs} . Es muss somit zwischen zwei Spezies von T_{Regs} unterschieden werden. Dies sind zum einen die bereits im Thymus aktivierten, natürlichen nT_{Regs} und die in der Peripherie durch Cytokine induzierten iT_{Regs} (LAURENCE ET AL. 2007). Beide Gruppen sind unabhängig voneinander in der Lage den *Scurfy*-Phänotyp zu retten (FONTENOT ET AL. 2003, HUTTER ET AL. 2008). T_{Reg} Transferversuche mit nT_{Regs} und iT_{Regs} im Zusammenhang mit induzierter Colitis sprechen zudem für unterschiedliche, beziehungsweise sich ergänzende Regulationsmechanismen (HARIBHAI ET AL. 2009). Ähnliches konnte in Tumoren gezeigt werden, in denen T_{Regs} die Tumortoleranz induzieren. Hier tragen beide T_{Reg} Populationen unabhängig zur Tumortoleranz bei (ZHOU UND LEVITSKY 2007). Generell spielt eine verminderte regulatorische Kapazität von T_{Regs} nachweislich bei Psoriasis (SUGIYAMA ET AL. 2005), Diabetes Typ 1 (LINDLEY ET AL. 2005), Multipler Sklerose (HAAS ET AL. 2005), Rheumatoider Arthritis (EHRENSTEIN ET AL. 2004), Systemischem *Lupus Erythematosus* (ALVARADO-SANCHEZ ET AL. 2006) und dem Autoimmunen Polyglandulären Syndrom Typ 2 (KRIEGEL ET AL. 2004) eine Rolle.

Um auf zellulärer Ebene ihre suppressive Funktion ausführen zu können sind T_{Regs} auf direkten Zell-Zell Kontakt angewiesen (JONULEIT ET AL. 2001). Dabei nehmen sie neben T_{Eff} -Zellen und DCs auch direkten Einfluss auf den Aktivierungsgrad und die Vitalität von B-, N_{K} - und Mastzellen (LU ET AL. 2006, ZHAO ET AL. 2006, GIROUX ET AL. 2007). Das allgemein gültige Modell der T_{Reg} vermittelten Inhibition schließt eine Interaktion zwischen T_{Reg} , DC und T_{Eff} -Zelle mit ein. In diesem Szenario binden T_{Regs} und T_{Eff} -Zellen an derselben DC. Durch die höhere Affinität des T_{Reg} -TCR zu seinem spezifischen MHCII-Peptidkomplex ist für eine Aktivierung eine 10-fach geringere Peptidkonzentration nötig (TAKAHASHI ET AL. 1998). Hierdurch erhalten T_{Regs} einen Vorsprung bei der Aktivierung. Sie können so die DCs an der Reifung hindern oder bindende T_{Eff} -Zellen an der Proliferation beziehungsweise T_{N} -Zellen bei der Reifung stören. Auf welche Weise T_{Regs} dabei mit den Zielzellen interagieren ist umstritten. Es haben sich jedoch im Laufe der Zeit vier Modelle etabliert: Die Inhibition durch Cytokine, durch Membranlyse, durch metabolische Störung oder durch die Modulation von DCs.

Im Zuge der **Modulation von DCs** scheint der inhibitorische Oberflächenrezeptor CTLA4 eine maßgebliche Rolle zu spielen. Ein *knockout* dieses Rezeptors induziert in

Mäusen einen *Scurfy*-ähnlichen Phänotyp (WATERHOUSE ET AL. 1995). Dabei wird die Expression von costimulatorische Faktoren auf der Oberfläche der DCs inhibiert (ODERUP ET AL. 2006). Durch Modulation des Tyrosin-Stoffwechsels und Induktion der Expression des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase werden T-Zell cytotoxische Moleküle produziert (FALLARINO ET AL. 2003). Außer CTLA4 wurden weitere Cytokine identifiziert, die die Aktivierung von T_N -Zellen an DCs beeinflussen. Unter diesen Cytokinen befinden sich vor allem IL-10 und TGF- β (MISRA ET AL. 2004), die später unter dem Abschnitt der „inhibitorischen Cytokine“ näher erläutert werden. Ein weiteres von T_{Regs} sezerniertes und DCs modulierendes Protein ist LAG3. Es zählt aber nicht, wie TGF- β oder IL-10 zu den Cytokinen sondern ist ein Transmembranprotein, homolog zu CD4. Es ist in der Lage an MHCII-Komplexe zu binden und so die Aktivität von DCs negativ zu beeinflussen (LIANG ET AL. 2008).

Der Mechanismus der **metabolischen Störung** lässt sich in zwei Abschnitte aufteilen. Einerseits konkurrieren T_{Regs} mit T_{Eff} -Zellen um IL-2. Da jedoch T_{Regs} wesentlich

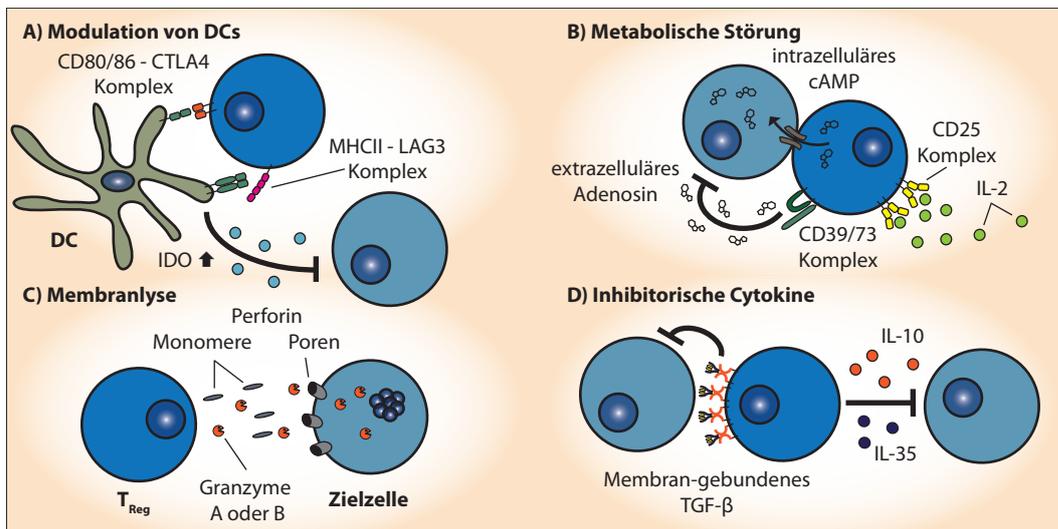


Abbildung 1.4.: **Immunsuppressive Mechanismen der T_{Regs}**

A) T_{Reg} CTLA4 (orange) bindet an den CD80/86 Komplex und LAG3 (pink) an den MHC II der DC. Dadurch wird das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) exprimiert, welches immunsuppressive Substanzen synthetisiert. **B)** T_{Regs} können durch den CD39/73 Komplex (grün) extrazelluläres Adenosin produzieren. Zusätzlich können sie über *Gap-Junctions* (grau) cAMP in die Zielzelle leiten. Beides führt zu einer Störung des Stoffwechsels. Außerdem vermindern sie durch die starke Expression des Interleukin-2 Rezeptors CD25 den IL-2 Spiegel. **C)** Durch die Expression von Perforin als auch der Granzyme A und B können T_{Regs} ihre Zielzellen lysieren und durch intrazelluläre Degradation Apoptose einleiten. **D)** T_{Regs} sind in der Lage inhibitorische Cytokine, wie IL-10 und IL35 zu sezernieren. Zusätzlich besitzen sie membran-gebundenes, latentes TGF- β , das bei Kontakt mit der Zielzelle aktiviert wird. Verändert nach VIGNALI (2008).

früher aktiviert werden und den IL-2 Rezeptor (CD25) überexprimieren, können sie den IL-2 Spiegel lokal senken (FONTENOT ET AL. 2005). Durch die Verringerung der IL-2 Konzentration ist die Proliferation von T_{Eff} -Zellen gehemmt und die Vitalität der Zellen nimmt ab. Andererseits wird cAMP gebildet, ein intrazellulärer *second-messenger* für viele G-Protein gekoppelte Rezeptoren. T_{Regs} sind in der Lage über die Oberflächenmarker CD39 und 73 (Ectonukleosid Triphosphat Diphosphohydrolase 1 und 5'-Nukleotidase) die Bildung von Adenosin zu katalysieren (DEAGLIO ET AL. 2007). Zum anderen wird cAMP direkt über *Gap-Junctions* in das Cytoplasma der Zielzelle geleitet und inhibiert so als *second-messenger* die Reifung zur T_{Eff} -Zelle (BOPP ET AL. 2007).

Außer in die Aktivierungs- und Erhaltungsvorgänge von T_{Eff} -Zellen einzugreifen sind T_{Regs} auch in der Lage, **Membranlyse** und proapoptotische Enzyme zu induzieren. Hierfür sezernieren sie die Proteasen Granzym A und B, sowie das porenbildende Perforin (GROSSMAN ET AL. 2004). Perforin lagert sich an die Membran der Zielzellen an und bildet dort Poren aus. Durch diese Poren gelangen die Granzyme A und B in die Zelle und leiten dort Apoptose ein. T_{Regs} können zudem durch die Expression von TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand superfamily member 10*) an den *Death-Receptor 5* auf den Zielzellen andocken und so einen Signalweg auslösen, der ebenfalls zur Apoptose führt (REN ET AL. 2007). Ein dritter Weg zur Induktion von Apoptose ist die Sekretion von Galectin-1. Dieses Protein kann über die Bindung an CD45, CD43 und CD7 einen Zellzyklus-Stopp einleiten, was schlussendlich zur Apoptose der Zielzelle führt (GARIN ET AL. 2007).

Der letzte für T_{Regs} beschriebene Inhibierungsmechanismus wird durch die Ausschüttung **inhibitorischer Cytokine** hervorgerufen. Eine besondere Bedeutung kommt den Cytokinen IL-10, IL-35 und TGF- β zu. Inwieweit diese Cytokine zur T_{Reg} vermittelten Immunregulation beitragen wird kontrovers diskutiert. So ist publiziert, dass *in vitro* der Einsatz von IL-10, beziehungsweise TGF- β neutralisierenden Antikörpern keinen Einfluss auf die supprimierende Aktivität von T_{Regs} hat (JONULEIT ET AL. 2001). *In vivo* konnte jedoch eine Beteiligung von IL-10 an der Immunregulation gezeigt werden. Es ist an der Regulation von T-Zell induzierter Colitis (ASSEMAN ET AL. 1999), der Tumortoleranz (LOSER ET AL. 2007) und dem Mausmodell für MS, der experimentellen autoimmunen Encephalitis (EAE) (MANN ET AL. 2007) beteiligt. Bei IL-35 handelt es sich um einen erst im Jahr 2007 beschriebenes Interleukin der IL-12 Familie. IL-35 ist für die maximale suppressive Aktivität von T_{Regs} nötig und ist bei Etablierung der Toleranz gegenüber Tumoren wichtig (COLLISON ET AL. 2007). Ebenfalls spielt es wie IL-10 bei Autoimmunerkrankungen des Darms (COLLISON ET AL. 2010) und bei rheumatoider Arthritis (RA) (NIEBALA ET AL. 2007) eine Rolle.

TGF- β ist ein ubiquitär exprimierter Wachstumsfaktor, dessen *knockout* in der Maus einem *Scurfy*-ähnlichen Phänotyp induziert (SHULL ET AL. 1992). T_{EFF}-Zellen, die einen *knockout* für die TGF- β Signaltransduktion tragen, sind zudem nicht in der Lage, auf die supprimierenden Signale von T_{Regs} zu reagieren (FAHLEN ET AL. 2005). Dies unterstreicht die besondere Bedeutung von TGF- β in der Immunregulation. Wenn TGF- β eine maßgebliche Rolle in der Immunregulation spielt, ergibt sich jedoch die Frage, warum T_{Regs} auf einen Zell-Zell Kontakt angewiesen sind. TGF- β sollte als lösliches, sezerniertes Cytokin keinen Zell-Zell Kontakt für seine Wirkung benötigen. T_H-Zellen, die durch T_{Regs} supprimiert wurden, zeigen auf mRNA-Ebene das gleiche Expressionsprofil wie solche, die mit rekombinantem TGF- β behandelt wurden. Und dies obwohl im Überstand der Zellen aus der Cokultur kein reifes TGF- β detektiert werden konnte (STOCKIS ET AL. 2009A). Die Erklärung dieses Phänomens lieferte NAKAMURA ET AL. (2001), die zeigten, dass latentes TGF- β nicht von T_{Regs} aktiviert und in den extrazellulären Raum sezerniert wird. Stattdessen wird es von einem damals noch unbekanntem Oberflächenrezeptor auf der Zelloberfläche gebunden und gespeichert und erst später an der Zielzelle aktiviert. Dieser Oberflächenrezeptor ist heute unter dem Namen *glycoprotein A repetitions predominant* (GARP) bekannt. Die Bedeutung der TGF- β vermittelten Immunregulation wurde inzwischen anhand verschiedener Krankheitsbilder verifiziert. T_{Regs} inhibieren über TGF- β zum Beispiel N_K-Zellen und andere T_{EFF}-Zellen in der Tumormikroumgebung (LI ET AL. 2007, STRAUSS ET AL. 2007). Außerdem konnte der Einfluss auf CD8⁺ T_{Cyt}-Zellen in Diabetes Typ I gezeigt werden (GREEN ET AL. 2003).

1.3. *Glycoprotein A Repetitions Predominant (GARP)*

GARP steht für „*glycoprotein A repetitions predominant*“ und gehört zur Familie der „*leucin-rich repeat (LRR) containing proteins*“. Es wird alternativ auch als LRRC32 (*leucine-rich repeat containing protein 32*) bezeichnet. Das GARP-Gen wurde 1994 entdeckt. Es liegt in der Genregion 11q13-q14, die bei Brustkrebs oft amplifiziert vorliegt. Eine Analyse der DNA-Sequenz zeigte, dass das Gen aus zwei Exons besteht und die resultierende mRNA ein 80 kDa großes Transmembranprotein codiert (OLLENDORFF ET AL. 1994). GARP besteht auf Proteinebene aus einem Signalpeptid, 20 LRRs, einer LRR C-terminal flankierenden Domäne, einem Transmembranbereich und einer intrazellulären Domäne (Abb. 1.5). Die extrazellulären Domänen bilden eine für aus LRR-Proteine typische Hufeisenform (PROBST-KEPPER ET AL. 2009B). Diese Form kommt durch die LRRs zustande, die durch ihren spulenartigen Aufbau eine Krümmung der Peptidkette erzeugen. Der Radius und Winkel des Hufeisens hängt dabei maßgeblich

von der Anzahl und dem Aufbau der einzelnen LRRs ab (BELLA ET AL. 2008). *In situ* Hybridisierungsstudien und die *Northern-Blot* Analysen zeigten eine Lokalisation von GARP-RNA in Plazenta, Lunge, Niere, Herz, Leber, Skelettmuskel, Pankreas, Haut, Megakaryocyten, sowie in weiteren Organen während der Organogenese bei Mensch und Maus (OLLENDORFF ET AL. 1994, ROUBIN ET AL. 1996). Auf Proteinebene konnte GARP erst viel später und nur auf Thrombocyten (MACAULAY ET AL. 2007) und T_{Regs} (WANG ET AL. 2008) nachgewiesen werden. Ein *Morpholino knock-down* von GARP im Zebrafährbling (*Danio rerio*) zeigte nach Laser-induzierter, arterieller Verletzung eine vermindertes Thrombuswachstum (O'CONNOR ET AL. 2009).

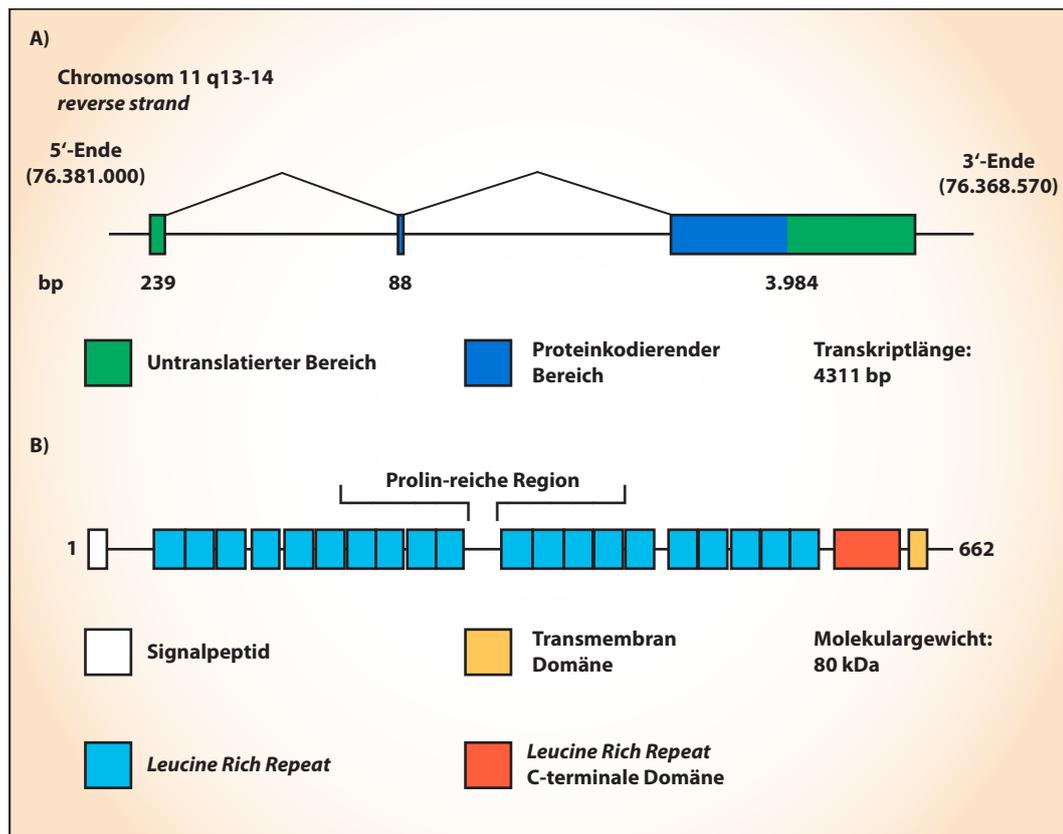


Abbildung 1.5.: Die GARP-Domänenstruktur auf DNA und Proteinebene

A) Das menschliche GARP Gen liegt auf Chromosom 11 im Abschnitt q13-14. Es besteht aus 3 Exons, von denen 2 für das Protein codieren. Das Gesamttranskript hat eine Länge von ca. 4.4 kbp. B) Auf Proteinebene besteht GARP aus einem Signalpeptid, 20 LRRs, einer LRR C-terminalen Domäne und einem Transmembranbereich. Zwischen LRR 10 und 11 ist eine prolinreiche Region zu finden. Das funktionelle Protein hat *in vivo* ein Molekulargewicht von 80 kDa.

1.3.1. GARP auf der Oberfläche von T_{Regs}

Da GARP außer von T_{Regs} nur von Thrombocyten exprimiert wird, eignet er sich als *bona fide* Marker. Aber nicht alle T_{Regs} exprimieren GARP. In iT_{Regs} konnte bisher GARP nicht nachgewiesen werden, sodass mit GARP-spezifischen Antikörpern nur nT_{Regs} detektierbar sind. Zusätzlich stellen GARP⁺ T_{Regs} eine Zellpopulation dar, die sich *in vitro* durch eine besonders hohe Stabilität und immunsuppressive Kapazität auszeichnen (TRAN ET AL. 2009, WANG ET AL. 2009). Die transgene Überexpression von GARP unter dem Promoter von CD2 (GARP wird somit in allen T-Zellen exprimiert) führt zu einer starken Reduktion der T-Zellen während ihrer Entwicklung im Thymus. Zusätzlich kommt es zu einer Anhäufung von FoxP3⁺ T_{Regs} in der Peripherie (ZHOU ET AL. 2013A). Die Expression von GARP führt somit zur Induktion des T_{Reg} spezifischen Phänotyps. Auch *in vitro* führt eine ektopische Expression von GARP in T_H- und T_N-Zellen zur Induktion von FoxP3 und einem identischen Phänotyp (PROBST-KEPPER ET AL. 2009B, WANG ET AL. 2008). Im Gegenzug ist aber auch eindeutig belegt, dass die Expression von GARP durch FoxP3 induziert wird (WANG ET AL. 2009). Um diese Kontroverse aufzulösen wurde eine positive Rückkopplungsschleife vorgeschlagen, bei der GARP und FoxP3 sich gegenseitig stimulieren und durch weitere *downstream* Elemente den regulatorischen Phänotyp von T_{Regs} aufrechterhalten. Für diesen Mechanismus spricht, dass der *knock-down* von GARP mittels siRNA in T_{Regs} und in FoxP3 transgenen T-Zellen zu einer Reduktion ihrer suppressiven Kapazität auf 40–50 % führt (WANG ET AL. 2008, 2009). Des Weiteren wird GARP auch auf vielen Tumorzelllinien überexprimiert und *in vitro* Experimente zeigen, dass es die Proliferationsrate von HeLa-Zellen positiv beeinflusst. Neben einer regulatorischen Funktion wird daher auch eine Rolle als Onkogen diskutiert (ZHOU ET AL. 2013B). Auf molekularer Ebene ist eine solche Funktion schwer zu erklären, da die Deletion des intrazellulären Teils von GARP, keine bekannte Signalfunktion, beziehungsweise Signalweiterleitungsfunktion beeinträchtigt (WANG ET AL. 2008).

1.3.2. GARP ist ein Rezeptor für latenten TGF-β

Die einzige, bisher bekannte Funktion von GARP besteht darin, TGF-β in seiner latenten Form zu binden (STOCKIS ET AL. 2009B, TRAN ET AL. 2009). TGF-β wird als Proprotein, bestehend aus dem reifem Wachstumsfaktor und seinen Propeptid (LAP, *latency associated peptide*) in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert. Über Disulfidbrücken dimerisiert proTGF-β durch Cysteine im LAP als auch im reifen Wachstumsfaktor. Auf dem sekretorischen Weg bindet das proTGF-β Dimer

dann an den ebenfalls in das ER exprimierte GARP. Auch hier wird eine kovalente Bindung zwischen den Proteinen über ihre Cysteinreste hergestellt (WANG ET AL. 2012). Im *trans*-Golgi wird das TGF- β Dimer von der Serinprotease Furin geschnitten. Demzufolge liegen LAP und reifen TGF- β anschließend nicht mehr kovalent verbunden vor (DUBOIS ET AL. 1995), bleiben jedoch über nichtkovalente Bindungen verknüpft und bilden den *small latent complex* (SLC), der einer weiteren Aktivierung zur Freisetzung des aktiven Wachstumsfaktors bedarf. GARP verstärkt bei diesem Prozess die Effizienz der proteolytischen Prozessierung von TGF- β , bindet aber selbst nicht an Furin (GAUTHY ET AL. 2013). Der *knockout* von TGF- β führt zu gravierenden Autoimmunreaktionen in verschiedenen Organen (KULKARNI UND KARLSSON 1993).

Neben GARP existieren noch weitere TGF- β bindende Proteine. Das am besten untersuchte ist das „*latent TGF- β binding protein*“, kurz LTBP. Es ist ebenso wie GARP und TGF- β ein sezerniertes Protein, das über das ER und den Golgi-Apparat aus der Zelle geschleust wird. Dabei bindet TGF- β ähnlich wie im GARP TGF- β Komplex über Disulfidbrücken an LTBP (GLEIZES ET AL. 1996). Der Komplex aus LTBP und TGF- β wird als Gegenüberstellung zum SLC als „*large latent complex*“ (LLC) bezeichnet. Werden LTBP und GARP in derselben Zelle coexprimiert, besitzt GARP die höhere Affinität zum SLC und bindet es bevorzugt (WANG ET AL. 2012). Liegt TGF- β an LTBP gebunden vor bindet der LLC an Proteine der extrazellulären Matrix (ECM), wie Fibrillin oder Fibronectin.

1.3.3. Nicht-proteolytische Aktivierung von TGF- β

Aufgrund seines grundlegenden Einflusses auf die Homöostase wird TGF- β auf mehreren Ebenen strikt reguliert, und muss in mehreren Schritten aktiviert werden. Der erste Schritt beinhaltet die Prozessierung des proTGF- β zu LAP und reifem TGF- β (SLC) durch Furin (s.o.). Die weiteren Schritte gliedern sich in drei Stufen: Die Aktivierung durch physikalische Extreme, die Aktivierung durch Konformationsänderung und die Aktivierung durch Proteolyse.

In vitro kann durch **physikalische Extreme** eine Denaturierung des LAP induziert werden, sodass der reife TGF- β aus dem SLC gelöst und somit aktiviert wird. Der reife TGF- β ist hierbei wesentlich stabiler als das LAP und übersteht die Prozedur ohne selbst denaturiert zu werden. In der Praxis haben sich extrem saure oder basische pH-Werte (<4 und >11) mit anschließender Neutralisation als Aktivierungsbedingungen etabliert. Auch die Inkubation des SLC bei Temperaturen >60 °C aktivieren den SLC (BROWN ET AL. 1990).

Ein weiterer Mechanismus, der zu einer Aktivierung des SLC führt, verläuft über eine **Konformationsänderung** im LAP. Der reife TGF- β wird darauf aus dem Komplex entlassen und kann an seine Rezeptoren binden. Solch ein Mechanismus ist für die Aktivierung durch Thrombospondin I und Integrine beschrieben. Thrombospondin I bindet über das K₄₃₀RFK₄₃₃ Motiv die Aminosäuren L₅₄SKL₅₇ des LAP (RIBEIRO ET AL. 1999). Der *knockout* von Thrombospondin I in Mäusen führt zu Entzündungen in Lunge, Leber, sowie im Pankreas und spiegelt somit partiell den TGF- β *knockout* wieder (CRAWFORD ET AL. 1998). Jedoch ist für die Lunge gezeigt, dass dieser Phänotyp nicht mit veränderten TGF- β Konzentrationen korreliert (EZZIE ET AL. 2011). $\alpha_V\beta_6$ Integrin kann auf einem ähnlichen Weg TGF- β aktivieren (MUNGER ET AL. 1999). Es bindet LAP jedoch an einer anderen Stelle, dem R₂₄₄GD₂₄₆ Motiv. Für diese Art der Aktivierung muss der SLC aber an LTBP gebunden vorliegen (ANNES ET AL. 2004). Nötig ist hierbei nämlich eine mechanische Kraft von mehr als 40 pN, die auf den SLC ausgeübt werden muss. Das an der ECM gebundene LTBP fungiert hier als Anker und kann die Aktivierung zusätzlich regulieren (BUSCEMI ET AL. 2011). Auf der Zelloberfläche von T_{Regs} kann GARP diese Ankerfunktion übernehmen. Der an GARP gebundene TGF- β wird in diesem Fall von $\alpha_V\beta_6$ -Integrinen aktiviert, die auf der Zielzellmembran verankert sind (WANG ET AL. 2012). $\alpha_V\beta_8$ -Integrin ist ebenfalls in der Lage an das RGD-Motiv des LAP zu binden, was aber alleine nicht zu einer Aktivierung führt. Es benötigt zusätzlich die membrangebundene Matrix-Metalloprotease 14 (MMP14) (MU ET AL. 2002). Eine Punktmutation der RGD Sequenz des LAP zu RGE führt zu einem Phänotyp, der dem kompletten TGF- β *knockout* gleicht (YANG ET AL. 2007). Dies lässt vermuten, dass Integrine, mit oder ohne anschließende Proteolyse, *in vivo* in großem Umfang für die Aktivierung von TGF- β verantwortlich sind.

1.3.4. Proteolytische Aktivierung von TGF- β

Wie im vorigen Abschnitt bereits erwähnt, sind auch Proteasen an der Aktivierung von TGF- β beteiligt. Die erste Protease, die für die Aktivierung von TGF- β beschrieben wurde, war Plasmin (SATO UND RIFKIN 1989). **Plasmin** ist eine Serinprotease, die am Abbau von Fibrin beteiligt ist. Die Theorie besagt, dass Plasmin nach einer Verletzung für die langsame Freisetzung von TGF- β aus Thromben verantwortlich ist (GRAINGER ET AL. 1995). Jedoch zeigen Plasmin *knockout* Mäuse keinen gemeinsamen Phänotyp mit TGF- β *knockout* Tieren, sodass eine *in vivo* Rolle für Plasmin bei der TGF- β Aktivierung fraglich ist (BUGGE ET AL. 1995). Eine weitere Serinprotease, die in der Blutgerinnungskaskade eine Rolle spielt, ist **Thrombin**. Für Thrombin wird ein ähnlicher TGF- β Aktivierungsmechanismus vorgeschlagen. Ebenso ist aber hier die *in vivo*

Relevanz fraglich (TAIPALE ET AL. 1992). Zwei weitere Serinproteasen, die spezifisch im Immunsystem vorkommen, sind die von Mastzellen und Neutrophilen sezernierten Enzyme **Chymase und Elastase**. Beide sind zwar nicht in der Lage TGF- β direkt zu aktivieren, können jedoch den LLC aus der ECM lösen. Somit steht dieser Komplex weiteren Aktivatoren auf der Zelloberfläche, wie Integrinen, zur Verfügung (TAIPALE ET AL. 1995). Der *knockout* von Neutrophiler Elastase, beziehungsweise deren spezifischen Inhibitor SLPI (*secretory leukocyte protease inhibitor*) führt zu verringerten, beziehungsweise erhöhter TGF- β Aktivität *in vivo* (CHUA ET AL. 2007, ASHCROFT ET AL. 2000).

Neben Serinproteasen sind auch einige Metalloproteasen, vor allem solche der MMP-Familie, dafür bekannt, TGF- β zu aktivieren. Von besonderer Bedeutung scheint hier die membranständige **MMP14** zu sein. Sie colokalisiert mit $\alpha_V\beta_8$ Integrinen auf der Zelloberfläche und schneidet LAP (MU ET AL. 2002). $\alpha_V\beta_8$ Integrin fungiert hierbei als Vermittler, welcher für den Transport des SLC nötig ist und die Schnittstelle für die MMP14 präsentiert. Ein spezifischer *knockout* von $\alpha_V\beta_8$ Integrin in DCs führt zu schweren Autoimmunerkrankungen. Dies zeigt die besondere Relevanz der $\alpha_V\beta_8$ Integrin/MMP14 vermittelten TGF- β Aktivierung *in vivo* (TRAVIS ET AL. 2007). Ob auch andere MMPs auf diesem Wege in der Lage sind TGF- β zu aktivieren ist unklar. Für **MMP9** ist allerdings belegt, dass es in der Lage ist TGF- β und die verwandten Wachstumsfaktoren TGF- β 2 und 3 zu aktivieren. Die proteolytische Spaltung ist hier nur für TGF- β 2 gezeigt. Zudem ist die gemessene TGF- β Aktivierung nach MMP9 Inkubation im Vergleich zu TGF- β 2 nur gering (YU UND STAMENKOVIC 2000). Für **MMP2** ist eine Prozessierung von LAP jedoch beschrieben, aber nur im Kontext mit einer anderen Metalloprotease der Astacin Familie. Bei dieser Protease handelt es sich um **BMP1**. BMP1 ist für das Lösen des LLC von der ECM durch Prozessierung von LTBP am N- und C-Terminus verantwortlich. Zudem können BMP1 und MMP2, nur wenn sie zusammen vorliegen LAP schneiden. Der zugrunde liegende Mechanismus sowie die Schnittstellen sind noch nicht bekannt (GE UND GREENSPAN 2006).

1.4. Proteasen

Proteasen spalten Peptidbindungen hydrolytisch und funktionieren je nach Spaltungsort als Endo- oder Exopeptidasen. Exopeptidasen sind in der Lage Proteine von ihren Enden her abzubauen, Endopeptidasen schneiden innerhalb des Peptidstranges. Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung besteht darin Proteasen nach der Beschaffenheit ihres katalytischen Zentrums zu klassifizieren. Man unterscheidet zwischen Aspartat-,

Glutamat-, Cystein-, Serin-, Threonin- und Metalloproteasen. Bei Cystein-, Threonin und Serinproteasen greift die namensgebende Aminosäure selbst die Peptidbindung nukleophil an. Bei den restlichen Proteasen wird zuvor ein Wassermolekül aktiviert, welches als Nukleophil wirkt.

Proteasen übernehmen *in vivo* mannigfaltige Funktionen. Sie sind genauso an der Verdauung und Degradierung von Proteinen beteiligt, wie an der Aufrechterhaltung der Homöostase, dem Auf- und Umbau der ECM oder der Organogenese. Oftmals sind Proteasen an der Prozessierung, beziehungsweise Aktivierung von Cytokinen, Rezeptoren und Oberflächenmolekülen beteiligt. Somit spielen sie eine maßgebliche Rolle in der Immunregulation. Viele pathologische Defekte des Immunsystems sind auf proteolytische Fehlregulation zurückzuführen oder korrelieren mit erhöhten Proteasespiegeln, rezensiert von LOPEZ-OTIN UND BOND (2008).

1.4.1. Serin- und Metalloproteasen

Das menschliche Genom enthält insgesamt 569 Gene, die für Proteasen codieren. Darunter sind sowohl Proteasen, die im Inneren der Zelle verbleiben, als auch solche die ausgeschleust werden. Diese extrazellulären Proteasen sind für die im vorigen Abschnitt genannten Vorgänge maßgeblich verantwortlich. Den größten Anteil an extrazellulären Proteasen haben Serin- (49 %) und Metalloproteasen (43 %) (LOPEZ-OTIN UND MATRISIAN 2007).

Serinproteasen zeichnen sich durch eine über Wasserstoffbrücken verknüpfte katalytische Triade aus den Aminosäuren Aspartat, Histidin und Serin aus. Die dadurch bewirkte starke Polarisierung der OH-Bindung in der Seitenkette des Serins ermöglicht den nukleophilen Angriff der zu spaltenden Peptidbindung. Die Serinproteasen lassen sich in mehrere Gruppen einteilen, deren größte die Trypsin/Chymotrypsin ähnlichen Proteasen ausmachen (Merops-Datenbank; www.merops.sanger.ac.uk). Proteasen des Trypsin/Chymotrypsin Typs besitzen zwar alle eine sehr ähnliche Tertiärstruktur, ein doppeltes „ β -barrel“ (Abb. 1.6 A & B), lassen sich aber aufgrund ihrer Substratspezifität in weitere Fraktionen unterteilen. Dies sind auf der einen Seite die trypsinartigen Serinproteasen. Sie spalten ihre Substrate ausschließlich auf der carboxy-terminalen Seite der Aminosäuren Arginin oder Lysin; P1-Position nach SCHECHTER UND BERGER (2012, ORIGINAL: 1967) auf. Dem gegenüber stehen die Serinproteasen vom Chymotrypsin-Typ, die eine Substratspezifität für große hydrophobe Aminosäuren (Abb. 1.6 C), wie Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin in P1-Position aufweisen (PAGE UND DI CERA 2008).

Metalloproteasen enthalten in ihrem aktiven Zentrum fast ausnahmslos ein zweifach geladenes Zinkkation. Es ist für die Polarisierung eines am Zinkion gebundenen Wassermoleküls mitverantwortlich. Die größte Superfamilie der Metalloproteasen sind die Metzinkine, die durch die zinkbindende Konsensussequenz HE_{xx}H_{xx}G_{xx}H (Ein-Buchstabencode siehe (S. 129)) und einen so genannten Methionin-*Turn* (Met-*Turn*) gekennzeichnet sind. Die drei Histidine (H) der Konsensussequenz koordinieren das katalytische Zinkion (Zn) und der Glutamatrest (E) ist an der Polarisierung des katalytisch aktiven Wassermoleküls beteiligt. Das Methionin des Met-*Turns* steht nicht direkt mit dem Zinkanion in Kontakt. Ihm wird vielmehr eine stabilisierende Wirkung auf die drei Histidine der Konsensussequenz zugeschrieben (Abb. 1.7 A & B) (BODE ET AL. 1993). Die Metzinkine teilen sich weiter in mindestens sechs Proteasefamilien auf. Dies sind die Adamalysine, Astacine, Leishmanolysine, Matrix-Metalloproteasen, Serralysine und Snapalysine. Sie besitzen zwar untereinander nur geringe Sequenzidentitäten, ähneln sich in ihrer dreidimensionalen Struktur aber signifikant. Die Struktur der Metzinkine be-

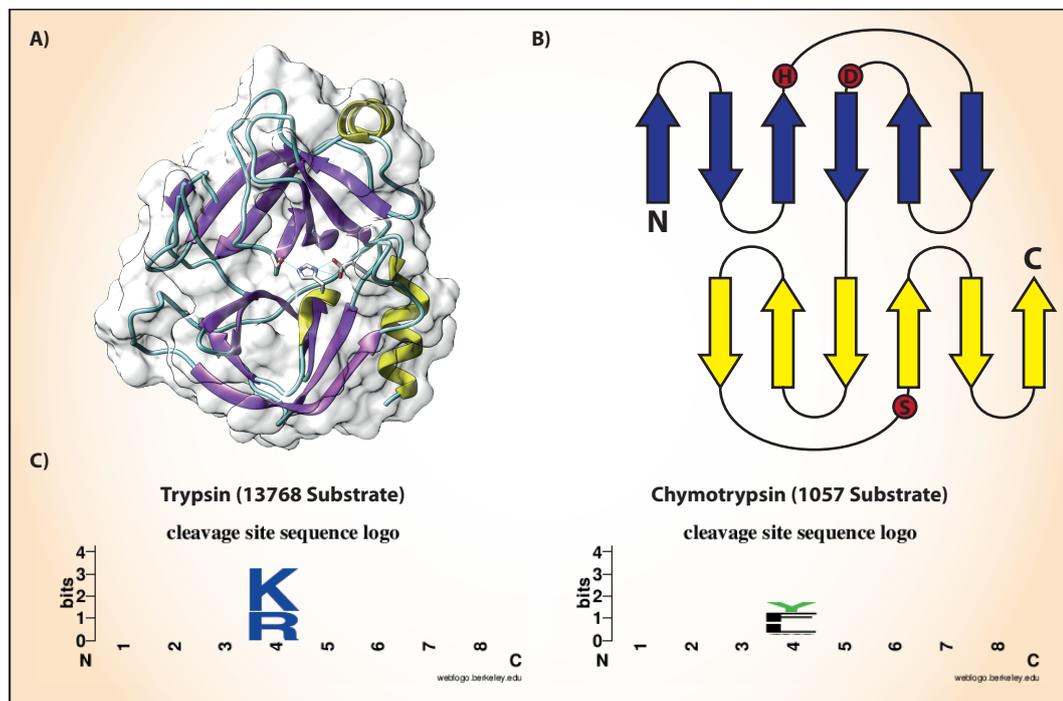


Abbildung 1.6.: **Eigenschaften der Serinproteasen**

A) Röntgenkristallstruktur von Trypsin aus dem Schweinepancreas (PDB Id: 4DOQ). β -Faltblätter in Violett und α -Helices in Gelb dargestellt. Horizontal zentral befindet sich das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade aus Histidin, Aspartat und Serin. **B)** Architektur der Sekundärstrukturelemente. Gelb = N-terminales β -barrel, violett = C-terminales β -barrel. In Rot: Die drei Aminosäuren der katalytischen Triade. **C)** Spaltspezifität von Trypsin und Chymotrypsin. Abgerufen von www.merops.sanger.ac.uk (26.12.2013).

steht aus einer „oberen“ und „unteren“ Subdomäne. Dazwischen liegt das katalytische Zentrum. Die obere Subdomäne besteht aus fünf β -Faltblättern und zwei α -Helices. Die untere Subdomäne enthält relativ wenig Sekundärstrukturelemente, lediglich eine konservierte α -Helix (Abb. 1.7) (GOMIS-RÜTH 2003). Auf zwei Familien der Metzinkine soll im Folgenden näher eingegangen werden, da sie in der vorliegenden Arbeit Untersuchungsgegenstand waren. Dies sind die Astacine und die Matrix-Metalloproteasen.

1.4.2. Proteasen der Astacin-Familie

Namensgebend für diese Familie ist die Metalloprotease „Astacin“ aus dem Edelflusskrebis *Astacus astacus* (STÖCKER ET AL. 1988). Es war die erste eukaryotische Protease der Metzinkin-Superfamilie, deren Struktur aufgeklärt werden konnte (BODE ET AL. 1992). Im menschlichen Genom codieren sechs Gene für Astacinproteasen. Diese lassen

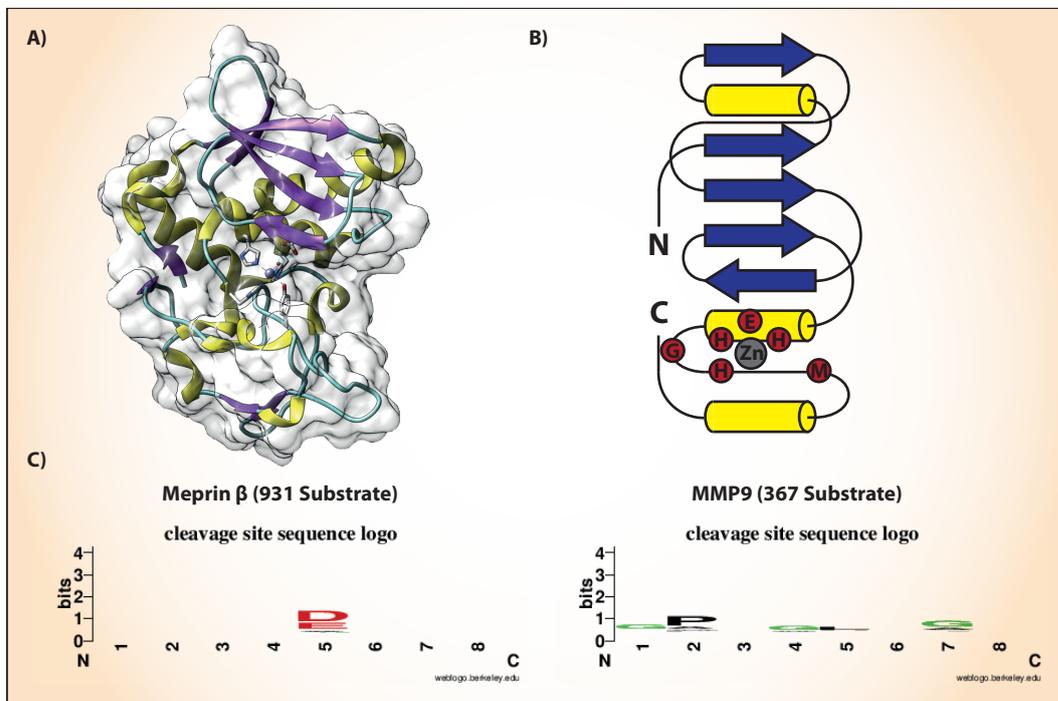


Abbildung 1.7.: **Eigenschaften der Metzinkine**

A) Röntgenkristallstruktur von Astacin aus dem Magen des Edelflusskrebises (*Astacus astacus*) (PDB Id: 1AST). β -Faltblätter in Violett und α -Helices in Gelb dargestellt. Horizontal in der Mitte befindet sich das aktive Zentrum mit dem katalytischen Zinkion, das von drei Histidinen komplexiert wird. Dazu das für die Polarisierung des Wassers wichtige Glutamat und das Methionin des *Met-turns*. **B)** Architektur der Sekundärstrukturelemente der Astacine. Gelb = α -Helices, violett = β -Faltblätter. In Rot: die Aminosäuren des katalytischen Zentrums **C)** Spaltspezifität von Meprin β und MMP9. Abgerufen von www.merops.sanger.ac.uk (26.12.2013).

sich durch ihren Multidomänen-Aufbau in drei Untergruppen einteilen. Mit drei Genen sind die Tolloide vertreten und die Meprine mit zwei weiteren. Ein Gen codiert für eine Protease, die eine bisher unbekannte C-terminale Erweiterung besitzt. Aufgrund ihrer Sequenzidentität zu den embryonalen *Hatching*-Enzymen basaler Wirbeltiere wird sie zu dieser am Schlüpfvorgang beteiligten Proteasegruppe gezählt und aufgrund ihres Vorkommens in den Eizellen von Wirbeltieren als Ovastacin bezeichnet (GOMIS-RÜTH ET AL. 2012). Allen Astacinen gemein ist, dass sie als inaktive Zymogene exprimiert werden und nachträglich durch andere Proteasen aktiviert werden müssen. Dabei bindet ein im Propeptid vorhandener Aspartatrest an das Zinkion des aktiven Zentrums. Das Propeptid verläuft dabei in umgekehrter Orientierung eines Substrates durch den katalytischen Spalt und sorgt für die Latenz der Protease (GUEVARA ET AL. 2010). Durch massenspektrometrische Untersuchungen wurde die Spaltspezifität der Astacine ermittelt. Sie zeigen eine starke Präferenz für saure Aminosäuren in der P1'-Position. Befindet sich jedoch ein Prolin in P2' werden in P1' keine sauren Aminosäuren, sondern kleine ungeladene Reste bevorzugt (Abb. 1.7 C) (BECKER-PAULY ET AL. 2011).

Tolloide besitzen C-terminal der Proteasedomäne noch weitere CUB (*complement sub-components Clr/Cls, uegf, and bone morphogenic protein 1*) und EGF (*epidermal growth factor*)-Domänen. Die am besten untersuchte Protease der Tolloid-Untergruppe stellt BMP1 dar. Es ist die kurze Spleißvariante des BMP1 Gens und enthält neben der Proteasedomäne drei CUB- und eine EGF-Domäne. Die längere Spleißvariante, *mammalian Tolloid* und die beiden anderen humanen Tolloide *mammalian Tolloid-like 1* und *2* besitzen zusätzlich zwei weitere CUB- und eine zusätzliche EGF-Domäne. Diese Domänen vermitteln die Substratspezifität und -regulation (HINTZE ET AL. 2006, WERMTER ET AL. 2007, BERRY ET AL. 2009). Aktiviert werden die Tolloide bereits im Golgi-Netzwerk durch die Serinprotease Furin. Die Hauptaufgabe der Tolloide *in vivo* ist die Prozessierung, beziehungsweise Aktivierung von Prokollagenen, Proteinen der Basalmembran, Wachstumsfaktoren und kleiner LRR-haltiger Proteine. Daraus resultieren wichtige Rollen im Aufbau und Erhalt der ECM, des Muskelwachstums, sowie der Embryo-, Neuro- und Angiogenese; zusammengefasst von HOPKINS ET AL. (2007).

Meprine besitzen als einzige Vertreter der Astacine eine Transmembrandomäne, wobei im reifen Zustand nur Meprin β membrangebunden vorliegt. Sowohl Meprin α und β besitzen neben der Proteasedomäne noch weitere Domänen, die als MAM (*meprin, A5 protein, tyrosine phosphatase μ*), TRAF (*tumour necrosis factor-receptor associated factor*)- und EGF-Domäne bezeichnet werden. Meprin α besitzt zusätzlich noch einen weiteren Proteinabschnitt (*inserted-domain*), der eine Furinschnittstelle enthält, sodass Meprin α noch während der Sekretion prozessiert wird. Da die *inserted-domain* N-terminal der Transmembranregion liegt hat diese Prozessierung die Freisetzung der

Protease von der Zellmembran zur Folge. Aber auch humanes Meprin β kann nach Phosphorylierung seines cytosolischen Teils von der Membran durch die Metalloprotease ADAM17 solubilisiert werden (HAHN ET AL. 2003). Die Meprine liegen entweder als große, lösliche Homomultimere aus Meprin α oder als membrangebundene Dimere vor. Die Dimere bestehen entweder aus je einer Meprin α und β Untereinheit oder zwei β Untereinheiten, zusammengefasst von BOND UND BEYNON (1995). Meprine werden vornehmlich von Serinproteasen wie Trypsin, Plasmin oder Kallekreinen extrazellulär aktiviert (BECKER ET AL. 2003, OHLER ET AL. 2010). Die für Meprin α und β identifizierten Substrate sind unter anderem Cytokine, Matrixproteine, Proteasen und deren Inhibitoren (JEFFERSON ET AL. 2013).

Ovastacin, das jüngste Mitglied der humanen Astacinfamilie, wurde *in vivo* bislang nur in der Eizelle nachgewiesen (QUESADA ET AL. 2004) und scheint dort für den langsamen Block gegen Polyspermie verantwortlich zu sein. Es schneidet, nachdem es kurz nach der Befruchtung aus den Cortikalgranula ausgeschleust wurde, ZP2 (*zona pellucida protein 2*). Dies führt zu einer Verhärtung der *Zona Pellucida*, sodass das Eindringen weiterer Spermien verhindert wird (BURKART ET AL. 2012). Ein endogener Inhibitor für Ovastacin ist das Plasmaprotein Fetuin-B, welches die *Zona Pellucida* vor frühzeitigem Aushärten schützt. Ein *knockout* von Fetuin-B führt zu Infertilität, da Ovastacin in der unbefruchteten Eizelle bereits in kleinen Mengen die Zelle verlässt, aber nicht durch Fetuin-B gehemmt werden kann. Es kommt zur frühzeitigen Verhärtung der *Zona Pellucida*, sodass eine Befruchtung nicht mehr möglich ist (DIETZEL ET AL. 2013). Des Weiteren gibt es Indizien dafür, dass Ovastacin auch außerhalb der Eizelle gebildet wird. Massenspektrometrische Untersuchungen detektierten Ovastacin Fragmente im Serum, der Leber und in Herzmuskelzellen (ZGODA ET AL. 2009, YIN ET AL. 2010).

1.4.3. Matrix-Metalloproteasen (MMPs)

Auf Proteinebene wurden 23 verschiedene humane MMPs gefunden. Wie die Astacine besitzen auch MMPs ein N-terminales Propeptid, das aber im Gegensatz zu den Astacinen über ein Cysteinrest das Zink im aktivem Zentrum bindet (VAN WART UND BIRKEDAL-HANSEN 1990). Die Aktivierung der MMPs verläuft ähnlich, wie die der Astacine über proteolytische Spaltung des Propeptids. Die Familie der MMPs kann auf zwei Wegen weiter unterteilt werden. Zum einen über ihre präferierten Substrate und Domänenzusammensetzung, oder über bioinformatische Analyse der Primärstruktur. Die erste, ältere Nomenklatur teilt die MMPs in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, membrangebundene MMPs und „übrige MMPs“ ein. In der zweiten, neueren Nomenklatur werden die Untergruppen A bis F unterschieden. Für mehr Informationen

zur neuen Einteilung siehe HUXLEY-JONES ET AL. (2007). Im Weiteren soll in dieser Arbeit die zuerst genannte Nomenklatur verwendet werden.

Aus der Minimalstruktur der MMPs (Signalpeptid, Propeptid und katalytischer Domäne) bestehen die **Matrilysine**. Zu ihnen zählen MMP7 und MMP26. MMP7 ist an der Bildung von antibakteriellen Peptiden im Darm beteiligt und kann als *Sheddase* Zelloberflächen-Proteine freisetzen. MMP26 ist an der Prozessierung einer Vielzahl an ECM Proteinen beteiligt; zusammengefasst von PARKS ET AL. (2004). Die Gruppe der **Kollagenasen** beinhaltet die Proteasen MMP1, 8 und 13. Sie besitzen neben der Minimalstruktur zusätzliche eine Hemopexindomänen. Diese Domäne ist für die Bindung von triplehelikalem Kollagen verantwortlich. Sie sorgen für dessen partielle Entwindung, sodass die Kollagenasen die einzelnen Peptidstränge der Kollagen-Triplehelix spalten können (MANKA ET AL. 2012). Zu den **Stromelysinen** zählen die MMPs 3, 10 und 11. Sie besitzen den gleichen Domänenaufbau wie die Kollagenasen, weisen aber ein anderes Substratspektrum auf. Sie spalten vor allem Proteine der ECM, außer Kollagen, wobei MMP11 aber nur eine geringe Aktivität aufweist (MURPHY ET AL. 1993).

Membrangebundene MMPs sind entweder über einen Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-Anker oder eine Transmembrandomäne an der Zelloberfläche verankert. Zu ihnen zählen die MMPs 14 bis 17, sowie 24 und 25. MMP17 und 25 sind mit einem GPI-Anker versehen, wogegen die restlichen eine Transmembrandomäne besitzen. Alle diese MMPs besitzen eine Schnittstelle für Furin in ihrem Propeptid und werden somit bereits intrazellulär aktiviert. Sie sind für die Aktivierung anderer MMPs, wie zum Beispiel MMP2 verantwortlich. Von den membrangebundenen MMPs ist MMP14 die einzige Kollagenase (ENGLISH ET AL. 2001, OHUCHI ET AL. 1997). Zu den **Gelatinasen** zählen MMP2 und MMP9, welche alternativ als Gelatinase A und B bezeichnet werden. Sie besitzen als Besonderheit in ihrer katalytischen Domäne eine Insertion von drei Fibronectin-Typ 2 ähnlichen Wiederholungen. MMP2 ist nur geringfügig, MMP9 hingegen überhaupt nicht in der Lage, triplehelikales Kollagen zu spalten (AIMES UND QUIGLEY 1995). Vielmehr degradieren sie die Spaltprodukte der Kollagenasen weiter zu kleineren Fragmenten. Das gespaltene Kollagen denaturiert nämlich schon bei Körpertemperatur und wird dadurch zum Substrat für viele nachfolgende Proteasen (MURPHY ET AL. 1985). Die restlichen sieben MMPs werden in der Gruppe der „**übrigen MMPs**“ zusammengefasst.

1.4.4. Die Rolle von Metalloproteasen in der Autoimmunität am Beispiel der Gelatinasen und Rheumatoider Arthritis (RA)

Zu den am besten untersuchten Metalloproteasen im Immunsystem gehören die Gelatinasen MMP2 und 9. Ihnen wird eine maßgebliche Rolle in Autoimmunerkrankungen wie

der Rheumatoiden Arthritis (RA) zugeschrieben. *Knockout* Studien an Mäusen zeichnen für diese beiden Proteasen ein unterschiedliches Bild. Der *knockout* von MMP9 führt zu einem milderem Verlauf von induzierter autoimmuner Arthritis. Im gleichen Krankheitsmodell hat der *knockout* von MMP2 einen umgekehrten Effekt (ITO ET AL. 2002). Somit scheint MMP9 den Ausbruch und den Verlauf von RA negativ, MMP2 dagegen positiv zu beeinflussen. Die Rolle von MMP9 wurde daher intensiv im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen untersucht. MMP9 wird in großem Maße von Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sezerniert (GRILLET ET AL. 1997). Aber auch T-Zellen können die beiden Gelatinasen nach Stimulation sezernieren (LEPPERT ET AL. 1995). Ein Schlüsselmediator für die Zerstörung des Gelenkknorpels während der RA ist Interleukin-17, das von autoreaktiven T_H17-Zellen sezernierte Signalcytokin. Es wirkt proinflammatorisch und ist an der Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten beteiligt. Der *knockout* des IL-17 Rezeptors führt in Tieren, in denen experimentell RA induziert wurde, zu einer verminderten MMP9 Expression und geringerer Zerstörung des Gelenkknorpels (KOENDERS ET AL. 2005). Im Gegenzug führt der *knockout* oder die Inhibition von MMP9, nicht aber von MMP2, in T-Zellen zu einer erhöhten Expression von FoxP3 (BENSON ET AL. 2011). Somit scheint es, als sei MMP9 an der Unterdrückung von T_{Regs} beteiligt. Ein gesicherter Zusammenhang zwischen MMP9 und RA besteht in der Produktion von autoimmunogenen Epitopen aus dem Kollagenabbau. Das unterliegende Prinzip wird auch als REGA (*remnant epitopes generate autoimmunity*) Modell beschrieben (OPDENAKKER ET AL. 2006). In diesem Modell wandern nach einem Auslöser, zum Beispiel einer bakteriellen Infektion, Neutrophile Granulozyten in die Gelenkkapsel ein. Die Ausschüttung von MMP8 als Kollagenase und MMP9 als Gelatinase führen zum Abbau des Kollagens Typ 2. MMP9 degradiert aufgrund seiner Spaltspezifität (Abb. 1.7 C) dabei das Kollagen derart, dass immundominante Epitope erhalten bleiben. Diese können dann auf dem MHC-II Komplex präsentiert werden, was zu einer Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen führt, die schließlich die Entzündungsreaktion im Gelenk chronisch manifestiert (VAN DEN STEEN ET AL. 2002).

Dieser Mechanismus ist nicht nur für RA gezeigt. Ähnliche Vorgänge sind auch bei Multipler Sklerose (MS) beobachtet worden. Hier zeigte der *knockout* von MMP9, dass in Jungtieren gar keine EAE induziert werden kann (DUBOIS ET AL. 1999). Bei der Multiplen Sklerose, beziehungsweise der EAE spaltet MMP9 zwei Proteine, die an der Entstehung und Manifestation der Autoimmunreaktion beteiligt sind. Zum einen ist dies das *myelin basic protein* (GIJBELS ET AL. 1993) zum anderen α B-Crystallin. Für α B-Crystallin konnte gezeigt werden, dass die durch die MMP9 Prozessierung entstandenen Epitope mit denen in der EAE vorkommenden übereinstimmen (STARCKX ET AL. 2003).

1.5. Zentrale Fragestellung dieser Arbeit

Autoimmunerkrankungen sind immer noch schwer bis gar nicht behandelbar. Die gängigen Therapieformen begrenzen sich auf die Behandlung der Symptome. Dies liegt vor allem daran, dass die genauen Vorgänge, die zum Ausbruch und Fortbestand der Krankheit beitragen weitgehend unbekannt sind. Eine Aufklärung der zugrunde liegenden zellulären und molekularen Prozesse ist daher seit vielen Jahren ein Forschungsschwerpunkt der Immunologie. Regulatorische T-Zellen werden seit geraumer Zeit als aussichtsreiches Target eingestuft. In einem *Review*-Artikel von PROBST-KEPPER ET AL. (2009A) wurden ausführlich die Möglichkeiten einer T_{Reg} basierten T-Zell Therapie erläutert. Mögliche Einsatzgebiete sind Transplantationen oder die Behandlung von Autoimmunreaktionen generell. Zudem unterstreicht der Artikel die Bedeutung von GARP im Erhalt der regulatorischen Fähigkeit.

GARP beeinflusst in diesem Zusammenhang über den TGF- β Signalweg das immunologische Gleichgewicht. Durch Freisetzung von TGF- β wird der regulatorische Phänotyp von T_{Regs} gestärkt und die Proliferation, sowie Ausbildung von T_H17 Zellen inhibiert. Auf welche Weise die TGF- β Freisetzung reguliert wird ist nur ansatzweise bekannt. Besser untersucht ist die Regulation von extrazellulär vorliegendem TGF- β . Hier spielen Proteasen eine maßgebliche Rolle. Sie sind in der Lage TGF- β Adapterproteine wie Decorin, Biglycan oder LTBP zu schneiden und so das TGF- β Signal zu modulieren. dabei sind vor allem zwei Proteasefamilien beteiligt. Dies sind zum einen Serinproteasen und zum anderen Metalloproteasen vom Typ der Astacinproteasen und Matrix Metalloproteasen (s. S. 15 und 16). Hieraus ergibt sich die Frage ob und inwieweit Proteasen auch an der Regulation der GARP vermittelten TGF- β Freisetzung beteiligt sind.

Um die möglichen Auswirkungen einer Prozessierung durch Proteasen abschätzen zu können ist ein detailliertes Wissen über die strukturellen und biochemischen Eigenschaften von GARP wichtig. Hierfür soll zunächst die Phylogenie des GARP untersucht werden um mögliche Homologe zu erkennen, die eventuell besser charakterisiert sind. Zudem können Modellierungsversuche Aufschluss darüber geben, ob bestimmte Bereiche besonders für Proteolyse anfällig sind und wie sich eine Spaltung auf mögliche TGF- β Bindungsstellen auswirkt.

Die Expression von Proteasen in T_{Regs} ist bisher nicht untersucht. Es soll eine cDNA Bank angelegt werden, um die Transkription von Proteasen-mRNA zu untersuchen und mit nativen T-Zellen zu vergleichen.

Schließlich sollen verschiedene Proteasen, die mit Autoimmunerkrankungen und oder mit der TGF- β Freisetzung in Verbindung stehen daraufhin getestet werden, ob sie in der

Lage sind GARP zu prozessieren. Anschließend ist geplant, die Auswirkung der GARP Prozessierung auf das TGF- β Signal zu untersuchen.

2. Material und Methoden

Falls nicht anders beschrieben, wurden die verwendeten Materialien von folgenden Anbietern bezogen: Chemikalien über *Applichem* oder *Carl-Roth*; Medien und Reagenzien für die eukaryotische Zellbiologie von *Life Technologies (Invitrogen, bzw. Gibco)* und die Kulturbehälter von *Sigma-Aldrich (Nunc)*. Die Anschriften aller hier genannten Produzenten finden sich im Anhang G auf Seite 155. Alle Lösungen, falls nicht anders beschrieben, wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$. (Milli-Q Anlage, Merck Millipore) als Lösungsmittel angesetzt.

2.1. Gentechnische Methoden

In diesem Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten Methoden erläutert, die zur Anfertigung der Expressionsvektoren verwendet wurden. Außerdem finden sich hier die Anweisung zur Vermehrung von Plasmiden, sowie die Kultivierungsbedingungen der verwendeten Bakterienstämme.

2.1.1. Verwendete Plasmide

In Tabelle 2.1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide verzeichnet. Übersichtskarten und eine genaue Beschreibung des Plasmidaufbaus sind im Anhang (S.147) zu finden.

2.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase-chain-reaction*) ist *eine in vitro* Methode zur Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte (SAIKI ET AL. 1985). Sie beruht auf dem repetitivem Abwechseln zweier Schritte. Zunächst wird die doppelsträngige Ursprungs-DNA bei hoher Temperatur in die Einzelstränge getrennt. Anschließend wird die Temperatur so weit gesenkt, dass kurze Oligonukleotide als sogenannte Primer an definierte Zielsequenzen der

Tabelle 2.1.: **Verwendete Plasmide**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide samt ihrer Größe, sowie enthaltene Resistenzgene, die entweder unter pro- oder eukaryotischen Promotoren stehen.

NAME	GRÖSSE (bp)	RESISTENZEN		QUELLE
		(prokaryotisch)	(eukaryotisch)	
pGEM-T	3000	Ampicillin	-	<i>Promega</i>
pCMV-Sport6	4396	Ampicillin	-	<i>ImaGenes</i>
pBluescriptR	2998	Ampicillin	-	<i>ImaGenes</i>
		Zeocin		
pIRES-neo2	5295	Ampicillin	Neomycin	<i>Life Technologies</i>
pFastBacI	4775	Ampicillin	-	<i>Life Technologies</i>
		Gentamicin		

Einzelstrang DNA anlagern können (Annealing). Die Primer ermöglichen der zugesetzten hitzestabilen DNA-Polymerase, den definierten DNA Abschnitt zu synthetisieren. Nach einer vorgegebenen Elongationsdauer wird durch Temperaturerhöhung der nächste Zyklus eingeleitet. In Tabelle 2.2 ist der Ablauf des PCR-Programms aufgeführt, das standardisiert in dieser Arbeit verwendet wurde. Hierbei handelt es sich um eine klassische zwei-Stufen PCR, bei der die Annealing-Temperatur und die Elongationszeit auf das jeweilig verwendete Primerpaar angepasst wurde. Die Annealing-Temperatur betrug in der Regel 62 °C und die Elongationszeit 1 Minute pro angefangene 1000 Basenpaare. Für die PCR wurde der „OneTaq-Polymerase 2x Master-Mix“ (*New England Biolabs*) verwendet. Dieser enthielt bereits, Polymerase, Puffer und Nukleotide, sodass lediglich die Primer und die Template DNA hinzugefügt werden musste. Alle Primer wurden von der Firma *Biomers.net* bezogen und in einer Endkonzentration von 1 µM eingesetzt. Die genaue Sequenz und die Lokalisation der „Tag“-Sequenzen (spezielle Aminosäureabfolge zur späteren affinitätschromatografischen Reinigung), sowie der Restriktionsschnittstellen sind auf Seite 149 im Anhang E zu finden.

2.1.3. Agarose Gelelektrophorese

Zur Analyse von Nukleinsäuren wurde die Agarose Gelelektrophorese verwendet, bei der sie aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrückgrates im elektrischen Feld zur Anode wandern. Lineare DNA-Fragmente können so voneinander getrennt und ihre Größe bestimmt werden. Um die DNA im Agarose-Gel sichtbar zu machen, wurde dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt, das zwischen die Basen der DNA interkaliert und bei Anregung im ultravioletten (UV) Spektralbereich fluoresziert.

Tabelle 2.2.: **Standardisiertes PCR-Programm**

Ein standardisiertes PCR-Programm, welches zur Amplifikation der rekombinanten cDNA der zu exprimierenden Proteine verwendet wurde. Annealing-Temperatur und Elongationszeit wurden individuell an das verwendete Primerpaar angepasst.

SCHRITT	TEMPERATUR [°C]	DAUER [s]	
Initiale Denaturierung	96	120	
Denaturierung	96	30	↻ x 30
Annealing	62	30	
Elongation	72	je kbp 60	
Finale Elongation	72	490	

Zur Herstellung des Agarosegels wurde eine 1 %ige Agaroselösung in TAE-Puffer (2,5 mM EDTA; 40 mM TRIS/Essigsäure pH 8,5) hergestellt. Als Laufpuffer wurde ebenfalls der TAE-Puffer verwendet. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 10x Probenpuffer (50 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 1 mM EDTA) gemischt. Die Proben wurden anschließend bei 120 V im Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht analysiert.

2.1.4. Klonierung von DNA-Fragmenten

Den Vorgang, ein DNA-Fragment in ein Zielplasmid einzubringen, um es anschließend in Bakterienzellen zu vermehren, nennt man molekulares Klonieren. Dazu müssen zuerst Vektor und DNA-Fragment in einer linearen Form vorliegen und kompatible Enden aufweisen. Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde hier der pGEM-T Vektor (*Promega*) verwendet. Durch Thymidin, bzw. Adenin Überhänge an den Enden von Vektor und PCR-Produkt kann ohne weitere Zwischenschritte kloniert werden. Bei allen anderen Klonierungen werden die Ziel-DNA und der Vektor mit kompatiblen Restriktionsenzymen (*New England Biolabs*) geschnitten. Der Vektor wurde, um eine Religation zu verhindern, mit Antarctic Phosphatase (*New England Biolabs*) behandelt. Die somit linearisierten Fragmente wurden durch eine Agarose Gelelektrophorese (2.1.3) mit anschließender Gelextraktion mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*) gereinigt.

Die Menge der DNA wurde photometrisch über die Absorption der DNA-Lösung bei 260, 280 und 320 nm bestimmt. Dabei wird der 320 nm Wert zur Korrektur verwendet und von den beiden anderen Werten abgezogen (SAMBROOK ET AL. 1989). Die DNA-Menge errechnet sich wie folgt (Gl. 2.1):

$$c_{\text{DNA}} = OD_{260\text{nm}} \cdot 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \quad (2.1)$$

Zusätzlich kann über den Quotienten $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$ die Reinheit der Probe bestimmt werden. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen Quotienten von 1,8 .

Für die abschließende Ligation wurde T4-Ligase (*New England Biolabs*) verwendet. Sie verbindet freie 3' und 5'-Enden unter ATP-Verbrauch. Die für die Reaktion einzusetzenden Mengen wurden nach Gleichung 2.2 berechnet.

$$\text{Insert (ng)} = \frac{\text{Vektor (ng)} \cdot \text{Insert (bp)}}{\text{Vektor (bp)}} \cdot 4 \quad (2.2)$$

Wenn nicht anders beschrieben wurde nach den Angaben der Hersteller gearbeitet.

2.1.5. Transformation von Bakterien

Bei Bakterienzellen wird der Vorgang der Plasmidaufnahme allgemein als Transformation bezeichnet. *In vitro* kann dieser Vorgang über verschiedene Wege, wie chemische Agenzien, elektrischen Strom oder Hitze exogen induziert werden. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Hitzeschocktransformation angewendet. Dazu wurden 50 μl kompetente *Escherichia coli* Zellen vom Stamm JM109 (*Promega*) mit 2,5 bis 5 μl ($\hat{=}$ 100 ng) Plasmidlösung vermischt. Darauf folgten eine Inkubation von 30 min auf Eis und ein anschließender Hitzeschock von 1 bis 2 min bei 42 °C im Wasserbad. Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz mit 1 ml SOC-Medium (10 mM MgCl_2 ; 10 mM MgSO_4 ; 40 mM Glucose; 2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,06 % (w/v) NaCl; 0,05 % (w/v) KCl; mit NaOH auf pH 7,5) gemischt und für 3 h bei 37 °C und 180 rpm im Inkubator geschüttelt. Danach wurden die Zellen bei Raumtemperatur (RT) und 2000 x g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 ml SOC-Medium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde schließlich auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte (1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; mit NaOH auf pH 7,5; dazu 1‰ Ampicillin-Stocklösung (10 % (w/v) steril filtriert) und 1,5 % (w/v) Agar Agar) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4 °C, um das weitere Wachstum der Bakterien zu unterdrücken.

2.1.6. Plasmidisolierung aus Bakterienkulturen

Um Plasmide aus Bakterienzellen zu isolieren wurde das Kit Nucleo Spin Quick Pure (*Macherey–Nagel*) verwendet. 10 ml ampicillinhaltiges LB–Medium (1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; mit NaOH auf pH 7,5; dazu 1 ‰ Ampicillin–Stocklösung (10 % (w/v) steril filtriert) wurden mit den entsprechenden Bakterien beimpft und über Nacht bei 180 rpm und 37 °C im Bakterienschüttler inkubiert. Die anschließende DNA–Aufreinigung erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Einzig die Elution wurde mit zweimal 30 µl auf 70 °C erwärmten Elutionspuffer durchgeführt. Die DNA Menge und Reinheit wurden wie unter 2.1.4 beschrieben, bestimmt.

2.1.7. Isolation und reverse Transkription von RNA

Ob ein gewisses Protein in einer speziellen Zellpopulation exprimiert, wird lässt sich am schnellsten und einfachstem über die Analyse der mRNA bestimmen. Hierbei werden die zu untersuchenden Zellen lysiert und die RNA isoliert. Es wurde für diesen Schritt das Kit PeqGold Total RNA von (*Peqlab*) verwendet und nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Anschließend wurde die isolierte mRNA mittels poly–dT Primern (*Roth*) und der M–MuLV reversen Transkriptase (*New England Biolabs*) in cDNA umgeschrieben. Für die reverse Transkription wurden 455 ng Gesamt RNA eingesetzt; berechnet nach (Gl. 2.1), Umrechnungsfaktor $OD_{260nm} \triangleq 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Ansonsten wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die so gewonnene cDNA Bibliothek kann anschließend über eine PCR (2.1.2) auf das Vorhandensein von Transkripten der zu untersuchenden Gene analysiert werden. Als Annealing–Temperatur wurde der durchschnittliche T_m –Wert des Primerpaars (Tab. E.2) weniger 2 °C eingestellt.

2.2. Eukaryotische Zellbiologie

Im Abschnitt „Eukaryotische Zellbiologie“ werden die Haltungsbedingungen für die in dieser Arbeit verwendeten Säuger– und Insektenzelllinien beschrieben. Zudem finden sich hier die Anweisung zur Durchführung von Transfektionen und einem Assay zur Bestimmung der TGF– β Aktivität.

2.2.1. Verwendete Zelllinien

In Tabelle 2.3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sowie die Zusammensetzung der benutzten Nährmedien beschrieben. Zusätzlich finden sich dort Angaben wie

oft und in welchem Verhältnis die Zellen gesplittet wurden. Allen Nährmedien wurde 1 % (v/v) einer Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml) Stocklösung zugesetzt. Die Säugerzelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und Wasserdampf gesättigter Atmosphäre gehalten. Die Insektenzellen wurden bei normaler Luftzusammensetzung und 25 °C (SF9) und 28 °C (BTI-Tn-5B1-4, im Folgenden als Hi5-Zellen bezeichnet) gehalten.

Tabelle 2.3.: **Verwendete Zelllinien**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien samt dem verwendeten Nährmedium, sowie Angaben zur Kultivierungsdauer, dem Splittingsverhältnis und der Bezugsquelle. HEK = *human embryonic kidney cells*, Mv1Lu = *mustela vision 1 lung cells*, DMEM = *Dulbecco's modified eagle medium*, FCS = *fetal calf serum*, NEAA = *non essential amino acids*.

ZELLINIE	NÄHRMEDIUM	SPLITTING	VERHÄLTNIS	QUELLE
HEK293 H	DMEM + 10 % (v/v) FBS	3-4 d	1:3	Life Technologies
Mv1Lu	DMEM + 10 % (v/v) FBS + 1 % (v/v) NEAA	2-3 d	1:3	Friedrich-Löffler Institut
SF9	Grace's Medium + 10 % (v/v) FCS	3-4 d	1:3	Friedrich-Löffler Institut
BTI-Tn 5B1-4 (Hi5)	Express Five Medium	3-4 d	1:6	Friedrich-Löffler Institut

2.2.2. Splitten der Zellen

Das Umsetzen von Zellen in ein neues Kulturgefäß mit einhergehender Verminderung der Zellzahl wird als Splitten bezeichnet. Adhärent wachsende Zellen müssen von der Zellkulturschale abgelöst werden. Hierzu wird der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer 0,05 %igen Trypsin/EDTA Fertiglösung überschichtet. Unter mikroskopischer Beobachtungen wurden die Zellen so lange inkubiert, bis sie sich abzukugeln begannen. Darauf folgend wurden sie mit frischem Nährmedium von der Schale gespült und im in Tabelle 2.3 beschriebenen Verhältnis in eine neue Zellkulturschale überführt. Eine Ausnahme bildeten hier die SF9 und Hi5 Insektenzellen. Sie mussten nicht mit Trypsin behandelt werden, sondern konnten direkt, nach der Abnahme des verbrauchten, mit frischem Nährmedium abgespült und in ein neues Gefäß überführt werden.

2.2.3. Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Um Zellklone für längere Zeit zu konservieren können sie eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Die einzufrierenden Zellen wurden falls nötig trypsiniert und

anschließend bei 100 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit Einfriermedium (40 % (v/v) DMEM, 50 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO) auf eine Zelldichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen eingestellt. Es wurden je 1 ml der Zellsuspension in ein Schraubdeckel–Einfrierrohrchen überführt und mit einer Abkühlgeschwindigkeit von 1 °C/min eingefroren. Hatten die Cryogefäße -80 °C erreicht, konnten sie in flüssigen Stickstoff umgelagert werden.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und so schnell wie möglich bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension in einem 10 ml Schraubdeckelgefäß überführt und auf 10 ml mit PBS aufgefüllt. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 100 x g bei RT wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet im entsprechenden Nährmedium resuspendiert und in einer TC 75 Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.4. Transfektion von Säugerzellen

Als Transfektion wird der Vorgang bezeichnet, indem zusätzliche DNA in die Zielzelle eingeschleust wird. Hierfür wurde das Transfektionsreagenz „Extreme Gene HP“ von Roche verwendet. $0,8 \cdot 10^5$ Zellen wurden am Vorabend der Transfektion in ein Well einer 6–Well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und durch 1,8 ml frisches Nährmedium ersetzt. Es wurden 2 µg Plasmid DNA mit 200 µl FCS freiem Nährmedium gemischt und anschließend 6 µl Transfektionsreagenz hinzugegeben. Der Ansatz wurde kurz geschüttelt und dann für 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die 200 µl komplett auf die 6–Well Platte pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken mit dem vorhandenen Nährmedium gemischt.

Für eine transiente Expression wurde nach 48 h das Medium komplett entfernt, die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und 2 ml Expressionsmedium (DMEM, 1 % (v/v) NEAA, 1 % (v/v) Insulin–Transferrin Lösung) hinzu pipettiert. Nach weiteren 48 h konnte der Überstand abgenommen, beziehungsweise die Zellen für weitere Analysen mit RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay*) Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 % (v/v) Triton X–100, 1 % (w/v) Na–Deoxycholat, 0,1 % (w/v) SDS) lysiert werden.

Für die Generierung von stabilen Klonen wurde ausschließlich das Plasmid pIRES–neo2 verwendet (s. Tab. 2.1 und Abb. D.4). Um die Integrationsrate des Vektors in das Genom zu erhöhen wurde dieser zuvor mit dem Restriktionsenzym *NruI* (*New England Biolabs*) linearisiert. Da durch das Plasmid pIRES–neo2 ein Resistenzgen (Aminoglykosid-Phosphotransferase) zusammen mit dem Wunschgen coexprimiert wird, sind alle Zellen,

die das Plasmid erfolgreich in ihr Genom integriert haben resistent gegen das Antibiotikum Geneticin (G418). Nach der 48 stündigen Transfektionsdauer wurde das Medium komplett gegen neues Nährmedium ersetzt, welches 500 µg/ml Geneticin enthielt. Im Lauf der nächsten 5 Tage starben alle untransfizierten Zellen ab und es bildeten sich Zellinseln. Wenn gewünscht konnten diese isoliert und so monoklonale Zelllinien etabliert werden.

2.2.5. TGF-β Aktivitätsassay

TGF-β wird als inaktiver Komplex aus dem reifen Wachstumsfaktor und seinem eigenen Propeptid exprimiert. Es kann über verschiedene Aktivatoren aus dem latenten in seinen aktiven Zustand überführt werden (1.3.2 ff.). TGF-β besitzt die Eigenschaft auf bestimmte, sensitive Zelllinien proliferationsinhibierend zu wirken. Eine solche Zelllinie sind die Mv1Lu Zellen, die aus der Lunge des nordamerikanischen Nerzes (*Neovison vison*, früher: *Mustela vison*) etabliert wurden (TUCKER ET AL. 1984, HENDERSON ET AL. 1974). Die Proliferation der Zellen kann durch Quantifizierung des DNA Gehalts mittels einer Färbung mit Methylenblau berechnet werden (FINLAY ET AL. 1984). Diese Methode kann genutzt werden um die Menge an aktivem TGF-β bis zu einer Konzentration von 0,3 ng/ml zu bestimmen. In diesem Konzentrationsbereich arbeitet diese Methode genauso sensitiv wie die gängige Prozedur mit radioaktiv markiertem Thymidin, ohne jedoch radioaktiven Abfall zu verursachen (ABSHER ET AL. 1991).

$2,5 \cdot 10^4$ Mv1Lu Zellen wurden in 100 µl DMEM mit 1 % (w/v) FCS, 1 % NEAA in ein Well einer 96-Well Platte gegeben und für 2 h zum Anwachsen im Inkubator gestellt. Nach 2 h wurde der Analyt hinzugegeben und die Zellen für weitere 48 h inkubiert. Um die Zellen zu quantifizieren wurden sie mit einer 10 %igen Formalin-Lösung 30 min fixiert und anschließend mit einer Methylenblau-Lösung (1 % (w/v) Methylenblau, 10 mM Borax pH 8,5) 30 min gefärbt. Die nachfolgenden Waschschrte wurden vier Mal in einer mit Borat-Puffer (10 mM Borax pH 8,5) angefüllten Schale durchgeführt. Die 96-Well Platten wurden komplett in den Puffer eingetaucht, sodass ein gleichmäßiges Waschen aller Wells gewährleistet war. Danach wurden die Wells umgekippt und ausgeleert. Die Platte wurde anschließend getrocknet. An die DNA gebundenes Methylenblau wurde durch 100 µl einer 1:1 Mischung aus Ethanol und 0,1 M HCl gelöst und anschließend die Absorption bei 658 nm gemessen. Die Absorption verhält sich hierbei linear proportional zur Zellzahl im Well. Die Ergebnisse wurde mittels des Shapiro-Wilk Tests auf eine Normalverteilung getestet. Lagen sie normalverteilt vor, wurden Proliferationsunterschiede mittels eines einseitigen, gepaarten t-Tests überprüft. Waren die Werte

nicht normalverteilt wurde der Mann–Whitney U Test verwendet. Zwei Gruppen wurden als signifikant unterschiedlich eingestuft, wenn der Signifikanzwert α kleiner als 0,05 war.

2.3. Proteinexpression und Reinigung

In diesem Teil der Arbeit wird beschrieben, wie die rekombinanten Proteine exprimiert und gereinigt wurden. Alle Proteine wurden mit Hilfe des Baculovirus Expressionssystems in Hi5 Insektenzellen hergestellt und mittels einer zweistufigen Chromatografie gereinigt.

2.3.1. Das Baculovirus Expressionssystem

Das Baculovirus Expressionssystem (*Life Technologies; Invitrogen*) beinhaltet die Generation und Amplifikation von rekombinanten Baculoviren in Sf9, sowie der Infektion und anschließender Expression in Hi5 Zellen. Die rekombinanten Zielgene GARP_{TS} und TGF- β _{Strep} wurden mittels Restriktion und Ligation in den pFastBac Vektor kloniert und durch Hitzeschock in DH10Bac–Zellen transformiert. In diesen Zellen findet die Transposition der Expressionskassette des pFastBac–Vektors in das Virusgenom statt. Aus diesen Zellen wurde das rekombinante Baculovirusgenom isoliert, in Sf9 Zellen transfiziert und anschließend bis zum Quartärvirus amplifiziert. Mit den Quartärviren wurden 400 ml Hi5 Suspensionskultur ($1,2 - 1,4 \cdot 10^6$ Zellen/ml) infiziert und 96 h lang inkubiert.

Alle Schritte wurden gemäß dem Handbuch „Bac–to–Bac Expression System“ von *Invitrogen* durchgeführt.

2.3.2. Vorreinigung des konditionierten Mediums

Da das Medium zur Proteinexpression (Express Five), Substanzen wie Biotin oder Detergenzien enthält, welche die affinitätschromatografische Reinigung der Wunschproteine stören, wurde eine Vorreinigung durchgeführt. Hierfür wurde das Säulenmaterial Affi–Gel Blue (*Biorad*) verwendet. Es bindet sowohl über ionische, als auch hydrophobe Wechselwirkungen an Proteine verschiedener Art.

Das konditionierte Express Five Medium wurde mit einer 1 M Na–Acetat Stocklösung auf 20 mM Acetat und anschließend mit Eisessig auf einen pH–Wert von 5,5 eingestellt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei und 4 °C für 15 min entfernt. 25 ml des

Affi-Gel Blue Säulenmaterials wurden mit Auftragspuffer (150 mM NaCl, 20 mM Acetat/Essigsäure pH = 5,5) equilibriert und mit dem Überstand gemischt. Die Proteine aus dem Überstand wurden über Nacht unter ständiger Rotation im Batch-Verfahren an die Säulenmatrix gebunden. Am nächsten Tag wurde der Batch in eine Säule („Econo Column“; *Biorad*) gefüllt und der Durchlauf gesammelt. Es wurde so lange mit Auftragspuffer gewaschen bis die OD_{280nm} unter 0,05 lag. Dann wurde die Elution mit Elutionspuffer (2 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH = 8,0) eingeleitet. Es wurde solange eluiert, bis die OD_{280nm} unter 0,1 fiel. Alle Fraktionen mit einer $OD > 0,1$ wurden vereinigt und über Nacht gegen 100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH = 8,0 dialysiert.

Nach der Elution wurde die Affi-Blue Säulenmatrix regeneriert. Dazu wurde mit dem fünffachen Säulenvolumen einer 2 M Guanidinium Hydrochlorid Lösung gewaschen. In diesem Puffer wurde auch das Säulenmaterial gelagert. Vor einer erneuten Reinigung wurde dann das Material erneut mit jeweils dem fünffachen Volumen des Elutionspuffers und anschließend mit Auftragspuffer equilibriert.

2.3.3. Affinitätschromatografische Reinigung von GARP_{TS} mittels einer Ni-NTA Säule

Das Konstrukt GARP_{TS} wurde im zweiten Reinigungsschritt über seinen His-Tag affinitätschromatografisch gereinigt. Dazu wurde das Dialysat aus 2.3.2 mit einer 1 M Imidazol/HCl pH = 8,0 Lösung auf eine Konzentration von 25 mM Imidazol eingestellt. 2 ml Ni-NTA Säulenmaterial (*Qiagen*) wurde mit 100 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 50 mM Tris/HCl pH = 8,0 equilibriert. Das eingestellte Dialysat wurde mit einer Flussrate von maximal 1 ml/min einmal über die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit dem Waschpuffer (100 mM NaCl, 50 mM Imidazol, 50 mM Tris/HCl pH = 8,0) gewaschen, bis die OD_{280nm} unter einen Wert von 0,02 sank. GARP_{TS} wurde dann mit dem Elutionspuffer (100 mM NaCl, 100 mM Imidazol, 50 mM Tris/HCl pH = 8,0) von der Säule gelöst. Die Elutionsfraktionen mit ähnlicher OD_{280nm} wurden vereinigt und gegen 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,05 % (w/v) Brij-35 und 50 mM Tris/HCl pH = 8,0 dialysiert. Das gereinigte GARP_{TS} wurde in 100 µl Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der Aliquots wurde über die OD_{280nm} bestimmt (2.4.1).

2.3.4. Affinitätschromatografische Reinigung von TGF- β _{Strep} mittels einer Strep-Tactin Säule

Für die finale Reinigung von TGF- β _{Strep} wurde das Dialysat der Affi-Blue Reinigung (2.3.2) einmal mit einer Flussrate von maximal 1 ml/min über 4 ml Strep-Tactin Säulenmatrix (*IBA Lifesciences*) gegeben, die zuvor mit Dialysepuffer (s. 2.3.2) equilibriert wurde. Gewaschen wurde ebenfalls mit Dialysepuffer bis die OD_{280nm} unter einen Wert von 0,02 sank. Für die Elution wurde dem Dialysepuffer D-Desthiobiotin (*IBA Lifesciences*) auf eine Endkonzentration von 2,5 mM zugegeben. Elutionsfraktionen mit ähnlicher OD_{280nm} wurden vereinigt und in 100 μ l Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C für die weitere Verwendung gelagert. Die Konzentration der Aliquots wurde über die OD_{280nm} bestimmt (2.4.1).

2.4. Proteinbiochemie

Im Abschnitt „Proteinbiochemie“ werden die in dieser Arbeit verwendeten Methoden näher erläutert, die benutzt wurden, um den GARP-Rezeptor und dessen Interaktion mit TGF- β zu analysieren. Des Weiteren wird erläutert wie die proteolytische Prozessierung des GARP-Rezeptors untersucht wurde.

2.4.1. UV/Vis-Spektroskopie

Licht, das durch eine wässrige Lösung fällt, wird abhängig von der Wellenlänge unterschiedlich stark absorbiert. zusätzlich besitzen gelöste Substanzen charakteristische Absorptionsmaxima. Dies wird unter anderem bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung von DNA (s. 2.1.4) und Proteinen genutzt.

Aromatische Aminosäuren absorbieren Licht maximal bei einer Wellenlänge von 257 nm (Phe), 274 nm (Tyr) und 280 nm (Trp). Wobei von diesen drei Aminosäuren die Absorption von Tryptophan überwiegt, da die Quantenausbeuten der anderen beiden oft sehr gering ist (WINTER UND NOLL 1998).

Mit Hilfe des Gesetzes von LAMBERT-BEER (Gl. 2.3) kann so die Proteinkonzentration (c) in Lösung bestimmt werden. Oft ist die Pfadlänge der Probe (d) auf 1 cm normiert, sodass statt von der Absorption (A) von der optischen Dichte (OD) gesprochen wird.

$$A_{\lambda} = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (2.3)$$

Der proteinspezifische Extinktionskoeffizient (ϵ) errechnet sich dabei aus der Zusammensetzung der aromatischen Aminosäuren und Disulfidbrücken des Proteins. Für die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurde der molare Extinktionskoeffizient über die Web-Applikation „ProtParam“ des *SIB EXPASY Bioinformatics Resources Portal* (www.expasy.org/protparam/) errechnet.

2.4.2. Natrimdodecylsulfat–Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS–PAGE)

Tabelle 2.4.: **Puffer für die SDS–PAGE**

Puffer, die für die SDS–PAGE verwendet wurden, verändert nach Laemmli (1970). Je nachdem ob unter reduzierenden oder nicht reduzierenden Bedingungen gearbeitet werden soll, wurde dem 3x Probenpuffer Dithiothreitol (DTT) zugesetzt.

PUFFER	ZUSAMMENSETZUNG
Sammelgel–	0,5 M Tris/HCl pH = 6,8 0,4 % (w/v) SDS
Trenngel–	1,5 M Tris/HCl pH = 8,8 0,4 % (w/v) SDS
Lauf–	25 mM Tris/HCl pH = 8,3 192 mM Glycin 0,02 % (w/v) SDS
3x Proben–	200 mM Tris/HCl pH = 6,8 10 % (w/v) SDS 25 % (v/v) Glycerin 0,25 % (w/v) Bromphenolblau \pm 120 mM DTT

Während der Gelelektrophorese wandern Proteine je nach Eigenladung unterschiedlich schnell entweder zur Anode oder Kathode. Sollen alle Proteine einer Lösung aber quantifizierbar nach Größe aufgetrennt werden, müssen sie alle eine vergleichbare Konformation und Ladung aufweisen. In der SDS–PAGE übernimmt dies das Detergenz SDS. Es denaturiert die Proteine und versieht sie mit einer ihrer molekularen Größe proportionalen negativen Ladung. Sie wandern so stets zur Anode. Um die Trennschärfe zu erhöhen ist das Polyacrylamidgel aus einem niederprozentigem Sammel– und einem hochprozentigem Trenngel aufgebaut, die unterschiedliche pH–Werte besitzen. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 2.4 notiert und wurden gemäß Tabelle 2.5 für die Polyacrylamidgele gemischt. Für das Gießen der Gele und den Elektrophoreselauf wurde das „Mini Protean“ System von *Biorad* verwendet. Die aufzutrennen-

den Proteinlösung wurde 2:1 mit 3x Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Für die Fokussierung im Sammelgel wurde eine konstante Spannung von 80 V und zur Auftrennung im Trenngel 120 V angelegt.

Tabelle 2.5.: **Zusammensetzung der SDS-Gele**

Volumina der Lösungen, die für das Ansetzen der Polyacrylamidgele verwendet wurden

POLYACRYLAMID:	TRENNGEL			SAMMELGEL
	7,5 %	10 %	14 %	3,8 %
Sammelpuffer	†	—	†	1 ml
Trennpuffer	†	2 ml	†	—
H ₂ O _{dest.}	4,12 ml	3,21 ml	2,15 ml	2,44 ml
Rotiphorese 30 (Roth)	2 ml	2,66 ml	3,73 ml	0,5 ml
TEMED 10 % (v/v)	†	60 µl	†	30 µl
APS 10 % (w/v)	†	60 µl	†	30 µl

2.4.3. Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blau

Per SDS-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteinbanden wurden mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau gefärbt (KANG ET AL. 2002).

2.4.4. Färbung von Polyacrylamidgelen mit Silbernitrat

Eine sensitivere Färbemethode als die mit Coomassie Brilliant Blau ist die Färbung mit Hilfe von Silbernitrat. Dabei binden die Silberionen vor allem an die basischen und schwefelhaltigen Aminosäuren der Proteine. Während der Entwicklung werden die Silberionen im basischen zu elementarem Silber reduziert. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei bis zu 0,1 ng pro Proteinbande.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel zweimal für 15 min in Fixierlösung geschwenkt. Danach wurde die Fixierlösung durch zweimaliges Waschen, für je 15 min in H₂O_{reinst.} entfernt. Das Gel

wird nun für die Silberfärbung sensibilisiert, indem es für 1 min in Sensitizerlösung inkubiert wurde. Danach folgen zwei weitere Waschstufen für je 30 s in H₂O_{reinst.}. Für weitere 20 min wurde das Gel in der Silberlösung inkubiert, bevor es erneut dreimal für

Tabelle 2.6.: **Puffer der Silberfärbung**
Puffer, die für die Färbung von Polyacrylamidgelen mit Silbernitrat verwendet wurden.

LÖSUNG	ZUSAMMENSETZUNG
Fixier-	40 % (v/v) Ethanol
	10 % (v/v) Essigsäure
Wasch-	30 % (v/v) Ethanol
Sensitizer-	0,02 (w/v) % Na ₂ S ₂ O ₃
Silber-	100 mM AgNO ₃
	0,02 % (v/v) Formaldehyd
Entwickler-	2 % (w/v) N a ₂ CO ₃
	0,04 % (v/v) Formaldehyd

Tabelle 2.7.: **Verwendete Antikörper**

Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Angegeben sind die eingesetzten Konzentrationen und Hersteller. MP = Magermilchpulver, BSA = Bovines Serumalbumin, TBS = 150 mM NaCl, 10 mM TRIS/HCl pH 7,4, TBS-T = 500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH=7,4, 0,05 % (v/v) Tween 20, 0,2 % (v/v) Triton X-100

ANTIKÖRPER	ANTIGEN	VERDÜNNUNG	GELÖST IN	HERSTELLER
α Strep-AK	SAWSHPQFEK	1:1000	3 % BSA in TBS-T	<i>Qiagen</i>
α His-AK	HHHHH	1:1000	3 % BSA in TBS	<i>Qiagen</i>
α TGF- β AK	LAP	1:1000	1 % MP in TBS	<i>RnD Systems</i>
α Maus-AK	Maus IgG Fc-Region	1:7500	10 % MP in TBS	<i>Dianova</i>

je 15 s in $H_2O_{\text{reinst.}}$ gewaschen wurde. Abschließend wurde das Gel mit der Entwicklerlösung entwickelt. Die Reaktion kann gestoppt werden, indem das Gel kurz mit $H_2O_{\text{reinst.}}$ gespült und anschließend in eine 5 %ige Essigsäurelösung überführt wird.

2.4.5. Western-Blotting und Immundetektion

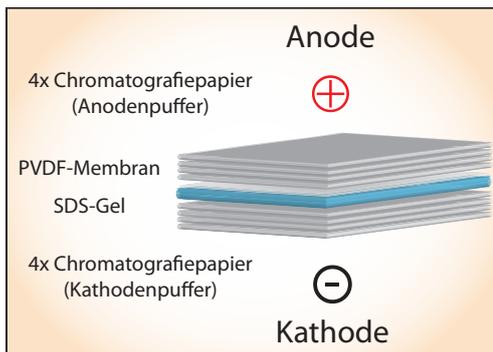


Abbildung 2.1.:

Aufbau des Blot-Sandwichs

4 Lagen in Kathodenpuffer (40 mM Glycin, 20 % (v/v) Ethanol, 25 mM Tris/HCl pH 8,0) getränkte Chromatografiepapiere, das Polyacrylamidgel, die PVDF-Membran und 4 in Anodenpuffer (20 % (v/v) Ethanol, 300 mM Tris/HCl pH=10,4) getränkte Chromatografiepapiere.

Durch Western-Blot werden Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel mittels elektrischer Spannung auf eine Membran transferiert. Hier wurde das *Semi-Dry* Verfahren nach KYHSE-ANDERSEN (1984) verwendet. Oft wird diese Methode in Kombination mit einer Immundetektion durchgeführt. Dabei werden einzelne Proteine auf der Membran durch spezifische Antikörper markiert. Ein zweiter Antikörper, der gegen die Fc-Region des ersten gerichtet ist, dient dann als Reporter, da er entweder an einen Fluoreszenzfarbstoff, eine alkalischen Phosphatase oder Peroxidase gekoppelt ist. In dieser Arbeit wurde ein Peroxidase-gekoppelter, sekundärer Antikörper als Reporter gewählt. Dieser setzt ein Substrat (Roti-Lumin, *Roth*) unter Emission von Licht um, das wiederum auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, *GE Healthcare*) detektiert werden kann.

Das so genannte „Blot-Sandwich“ wird wie in (Abb. 2.1) gezeigt aufgebaut. Dabei sind die Chromatografie-papiere (3 MM Chr, *GE Healthcare*) in Anoden- (20 % (v/v) Ethanol, 300 mM Tris/HCl pH = 10,4) und Kathodenpuffer (20 % (v/v) Ethanol, 40 mM Glycin, 25 mM Tris/HCl pH = 8,0) getränkt. Die PVDF-Membran (*Merck Millipore*) wurde zur Aktivierung für 30 s in 100 % Ethanol getränkt. Der Transfer fand bei einer konstanten Spannung von 20 V für 2 h statt. Für die Immundetektion wurden die in Tabelle 2.7 aufgeführten Antikörper wie angegeben angesetzt und verwendet. Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h in 3 %igen (w/v) bovinem Serumalbumin (BSA) in TBS-Puffer (137 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5) geblockt. Danach folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper für mindestens 1 h bis über Nacht. Anschließend wurde die Membran einmal kurz und einmal für 10 min mit TBS-T Puffer (500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20, 0,2 % (v/v) Triton X-100, 20 mM Tris/HCl pH = 7,5) gewaschen. Es folgte die gleiche Prozedur mit TBS. Die abschließende Inkubation mit dem sekundären Antikörper dauerte 1 h, wonach ungebundener, sekundärer Antikörper durch erneutes Waschen mit TBS-T Puffer (1x kurz, 1x 10 min) entfernt wurde. Vor der Detektion wurde die Membran erneut einmal kurz mit TBS-Puffer gewaschen und in diesen überführt. Die Belichtungszeit variierte je nach aufgetragener Proteinmenge und Affinität der Antikörper zwischen 30 s und 30 min.

2.4.6. Prozessierung von proTGF- β mit Furin

Nach Expression und Reinigung liegt TGF- β etwa zu gleichen Teilen in seiner pro- und latenten Form vor. Da für ausgewählte Experimente aber eine reine Proteinfraction aus latentem TGF- β nötig ist, wurde das vorhandene proTGF- β *in vitro* mit Furin prozessiert.

Eine gereinigten TGF- β Fraktion wurden mit einer zehnfach konzentrierten Stocklösung auf 0,5 % (v/v) Triton X-100, 1 mM CaCl₂, 1 mM β -Mercaptoethanol und 100 mM Hepes/NaOH pH = 7,5 eingestellt. Es wurde 1 U rekombinantes Furin (*New England Biolabs*) hinzugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4.7. Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Da alle proteinogenen Aminosäuren, bis auf Glycin, ein Chiralitätszentrum besitzen, sind sie in der Lage, die Drehrichtung von polarisiertem Licht zu ändern. Neben dieser intrinsischen optischen Aktivität besitzen Proteine zusätzlich auch eine induzierte optische Aktivität. Diese entsteht durch die Kopplung mehrerer optischer Zentren innerhalb der Protein-eigenen Sekundärstruktur und ihrer räumlichen Anordnung zueinander. Diesen

Umstand macht sich die CD-Spektroskopie zu nutze. Durch die differenzielle Absorptionsmessung von links und rechts zirkulär polarisiertem Licht kann die Wellenlängen abhängige Elliptizität θ_λ bestimmt werden. Aus dem so gewonnenem CD-Spektrum können Rückschlüsse auf die Sekundärstrukturelemente gezogen, oder die Faltungszustände eines Proteins bestimmt werden, Überblick in GREENFIELD (2006).

Die zu untersuchende Proteinlösung wurde mittels Amicon Ultra-0.5 ml 10 K (*Merck Millipore*) Filtereinheiten nach Angaben des Herstellers in CD-Puffer (100 mM NaF, 50 mM NaH_2PO_4 pH = 7,4) umgepuffert und auf die gewünschte Konzentration eingestellt. 150 μl der Proteinlösung wurde in eine 1 mm CD-Spektroskopie Küvette (*Hellma*) gefüllt und in einem *Jasco* J-810 CD-Spektrometer gemessen. Es wurde ein Spektralbereich von 300 bis 185 nm mit einer Geschwindigkeit von 1 nm/s gemessen. Alle Messungen wurden fünfmal durchgeführt und der Mittelwert aus den Einzelmessungen errechnet. Die gemessene Elliptizität θ_λ wurde anschließend über Gleichung 2.4 in die relative molare Elliptizität pro Aminosäure θ_{MRE} umgerechnet, die aus historischen Gründen die Einheit $\frac{\text{deg}\cdot\text{cm}^2}{\text{dmol}}$ trägt und sowohl die Küvettenlänge (d_{cd}), als auch die Konzentration ($C_{\text{Mol/l}}$) und Anzahl der Aminosäuren berücksichtigt (N_{AS}).

$$\theta_{\text{MRE}} = \frac{10^2 \cdot \theta_{\text{deg}}}{d_{\text{cm}} \cdot C_{\text{Mol/l}} \cdot N_{\text{AS}}} \quad (2.4)$$

2.4.8. *In vitro* Kopplung von GARP und TGF- β über Disulfidbrücken

Um GARP und TGF- β *in vitro* kovalent aneinander zu koppeln wurde ein Puffer verwendet der das Redoxpotential des ERs imitiert. Der rekombinante GARP_{TS} wurde dafür mit TGF- β _{Strep} gemischt, sodass die Bindung der Proteine stattfinden konnte. Durch die Zugabe von Cystein und oxidiertem Glutathion (2 mM und 0,5 mM Endkonzentration) wurde ein Redoxpotential eingestellt, dass etwa dem des ERs von ungefähr -0,16 V entspricht (JOCELYN 1967, HWANG ET AL. 1992). Pro Ansatz wurden je 800 ng GARP_{TS} und 400 ng TGF- β _{Strep} über Nacht inkubiert.

2.4.9. *Pull-Down Assay*

Um die Bindung zweier Proteine aneinander nachzuweisen kann ein *Pull-Down Assay* durchgeführt werden. Dabei wird versucht mit einem Protein, ein anderes aus einer Lösung zu „fischen“. Um in diesem Fall die Bindung von GARP_{TS} und TGF- β nachzuweisen wurden je 400 μg beider Proteine miteinander gemischt und über Nacht bei RT inkubiert. Da GARP_{TS} über seinen N-terminalen His-Tag in der Lage ist an Ni-NTA

Agarose zu binden, wurden diese gekoppelt an magnetische *Beads* (*Qiagen*) verwendet um GARP_{TS} aus der Lösung zu fischen. 100 µl der 5 %igen Lösung wurden mit dem Ansatz für 3 h bei 4 °C unter Rotation bei 60 rpm inkubiert. Die Kügelchen wurden zunächst mit einem Magneten im Reaktionsgefäß fixiert und nach dem Entfernen des Überstands zweimal mit 200 µl 150 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 50 mM Tris/HCl pH = 7,4 gewaschen. Die gebundenen Proteine wurde mit 20 µl 8M Harnstoff, 150 mM NaCl, 20 mM Acetat/Essigsäure pH = 4,5 von den Kügelchen gelöst und mittels der SDS-PAGE (2.4.2) mit anschließendem Western-Blot und Immundetektion (2.4.5) analysiert.

2.4.10. Proteinpräzipitation mit Trichloressigsäure und Natrium-Desoxycholat

Um Proteine zu konzentrieren, können sie mit Hilfe des schwachen Detergens Natrium-Desoxycholat (DOC) und der starken Säure Trichloressigsäure (TCA) gefällt werden. Das DOC lagert sich an die Proteine an und wirkt als Präzipitationsverstärker, was die Menge an gefälltem Protein erhöht. Die TCA entzieht während der Fällung der Protein-DOC Mischung die Hydrathülle, sodass die Proteine ausfallen. Während der Fällungsprozedur wird jedoch die native Struktur der Proteine irreversibel zerstört, sodass diese Art der Konzentrierung nicht im Vorfeld funktioneller Analysen verwendet werden kann.

Die zu fällende Proteinlösung wurde zuerst im Verhältnis 100:1 mit 2 %iger (w/v) DOC-Lösung gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurde im Verhältnis 10:1 100 %ige TCA-Lösung (angesetzt nach SAMBROOK ET AL. (1989)) hinzugefügt und für mindestens eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 15 min bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet mit 100 %igem Aceton (-20 °C) gewaschen. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 16000 x g für 10 min. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Proteinpellet bei RT getrocknet. Anschließend konnte es zur weiteren Verwendung in dem vorgesehenen Puffer aufgenommen werden.

2.5. Bioinformatik

Im Abschnitt „Bioinformatik“ werden die in dieser Arbeit verwendeten Datenbanken und Programme näher erläutert, die zur bioinformatischen Charakterisierung von GARP genutzt wurden. Darunter fallen die evolutionäre systematische Einordnung des GARP-Rezeptors in der LLR-Proteinfamilie und die Erstellung eines 3D-Modells.

2.5.1. Datenbanksuche nach GARP Genen in anderen Spezies

Um zu untersuchen in welchen Spezies des GARP-Gen vorkommt wurde die Datenbank „Ensembl Genome Browser“ (www.ensembl.org; EMBL-EBI / Wellcome Trust Sanger Institute) durchsucht. Per *Basic Local Alignment Search Tool*-Suche (BLAST) wurden alle annotierten Genome nach der GARP-Sequenz durchsucht. Dazu wurde mit der menschlichen Proteinsequenz von GARP in der genomischen DNA gesucht. Für die Datenbanksuche wurde der Algorithmus TBLASTN benutzt und dieser für „*Near-Exact-Matches*“ optimiert. Alle Gene, welche den gleichen Intron/Exon Aufbau und die gleiche Domänenzusammensetzung wie das menschliche GARP-Gen aufwiesen wurden als GARP-Gen identifiziert.

2.5.2. Erstellung von Sequenz-Alignments

Für die Erstellung der Sequenz-Alignments wurde das Programm ClustlX, Version 1.8.3 (www.clustl.org) verwendet. Für die Berechnung des Alignments wurden die von ClustlX als Standardparameter gewählten Einstellungen verwendet und aus der GARP-Sequenz die Aminosäuren 35 bis zum C-Terminus berücksichtigt. Für die Erstellung von molekularen Stammbäumen wurde das Alignment in das NEXUS-Format exportiert. Die Sequenzen sind im Anhang B.2 auf Seite 136 verzeichnet.

2.5.3. Generierung molekularer Stammbäume

Für die Erstellung molekularer Stammbäume wurde die Software „MrBayes 3.0B4“ verwendet. Das Programm beruht auf einer hierarchischen Bayes Analyse, welche die *likelihood* Funktion nutzt um in einem „*Markov Chain Monte Carlo*“-Verfahren Stammbäume mit einer möglichst hohen Wahrscheinlichkeit zu „sammeln“ (HUELSENBECK UND RONQUIST 2001). Dabei werden per Iteration mehrere neue Stammbäume aus dem Ausgangsalignment gebildet und deren Wahrscheinlichkeit in einem *a posteriori*-Verfahren bewertet. Der Stammbaum mit der höchsten Wahrscheinlichkeit dient als Ausgang der nächsten Iterationsrunde. Konvergiert die Wahrscheinlichkeitsverteilung können die Stammbäume für einen Konsensusbaum verwendet werden. Der erstellten NEXUS-Datei wurden folgende Zeilen am Ende hinzugefügt:

```
BEGIN MRBAYES;  
log start filename=filename.log.txt;  
set autoclose=yes;  
prset aamodelpr=fixed(WAG);  
showmodel;  
mcmc ngen=500000 samplefreq=100 printfreq=10 nchains=4 savebrlens=yes;  
log stop;  
END;
```

Nach der Simulation wurde mit der folgenden Kommandozeile der Konsensusbaum erstellt und die ersten 25 % der errechneten Bäume (nicht in der stationären Wahrscheinlichkeitsverteilung) verworfen:

```
sumt filename.nxs.t contype=allcompat burnin=125000
```

Die Darstellung des Konsensusbaums erfolgte mit dem Programm „Dendroscope“ (HUSON UND SCORNAVACCA 2012).

2.5.4. Modellierung des GARP Rezeptors

Um ein dreidimensionales Modell von GARP zu erstellen wurde das Programm „Modeller 9v8“ (ESWAR ET AL. 2006) verwendet. Es beruht auf der so genannten Homologie-Modellierung. Dabei wird aus einem Alignment zwischen Zielprotein und einem Protein mit ähnlicher, bereits aufgeklärter Struktur ein Modell erstellt, das sich an der Struktur des bekannten Proteins orientiert.

Als Vorlage für die Ektodomäne des GARP Rezeptors dienten die LRRs des variablen Lymphocyten Rezeptors (VLR) aus dem Neunauge *Petromyzon marinus* (PDB ID = 29RU). Für den Transmembranbereich wurde der Integrin α II β 3 Transmembrankomplex genutzt (PDB ID = 2K9J). Das genaue Alignment ist im Anhang B.3, S. 143 verzeichnet. Die erstellte PDB-Datei wurde über den Webserver „PDBsum“ (www.ebi.ac.uk/pdbsum/, EMBL-EBI) auf ihre Integrität überprüft und Bereiche die als „*generously allowed*“ und „*disallowed*“ angezeigt wurden mittels Modeller und dem Befehl „refine.loop“ neu berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Bioinformatische Analyse von GARP

Um Informationen über die strukturellen Eigenschaften von GARP zu erlangen wurde zunächst versucht GARP bioinformatisch zu charakterisieren.

3.1.1. Verbreitung des GARP-Gens

Über den molekularen Ursprung von GARP ist bisher wenig bekannt. Weder wann es evolutionär entstanden ist, noch ob es auf Proteinebene ein „Vorläufer-GARP“ gibt. Die Genomdatenbank „Ensembl“ wurde nach GARP-Genen durchsucht. In den 50 untersuchten Spezies konnte in 30 ein GARP-Gen identifiziert werden. In *Phyla* unterteilt konnte kein GARP-Gen in Invertebraten entdeckt werden. Auch das einzige Genom der Agnathen (*Petromyzon marinus*) wies kein GARP-Gen auf. Die identifizierten GARP-Gene konnten wie folgt den verschiedenen *Phyla* zugeordnet werden: Vier in Teleostiern, fünf in der Gruppe der „Lissamphibia und Sauropsida“, drei in der Großgruppe der Pro- und Metatheria, sowie 18 Genome unter den untersuchten Placentalia wiesen ein GARP-Gen auf (Tab. 3.1). Ein Großteil der identifizierten Gene wurde bereits *in silico* als GARP-Gen beschrieben, einige jedoch nicht. Diese waren zu diesem Zeitpunkt (7.10.2011) noch als „uncharacterized protein“ annotiert. Dies wird ebenfalls in Tabelle 3.1 durch ein Stern* deutlich gemacht. Die zu den Genen korrespondierenden Protein-Identifikationsnummern wurden im Anhang, in Tabelle B.1 verzeichnet.

Tabelle 3.1.: Nach einem GARP-Gen durchsuchte Genome

Alle Genome, die nach dem Vorhandensein eines GARP-Gens durchsucht wurden. Zusätzlich angegeben ist der Anteil an gleichartigen (\approx) und identischen (=) Aminosäuren zur GARP-Sequenz des *Homo sapiens*. Bei den mit einem Stern* gekennzeichneten Spezies war das identifizierte GARP-Gen noch als „*Uncharacterized Protein*“ annotiert. Das Raute# Symbol markiert Spezies, bei denen zwar ein GARP-Gen identifiziert werden konnte, aber die Sequenz nicht komplett und so nicht für die Stammbaumrekonstruktion zu verwenden war. ✓ zeigt das Vorhandensein, ☒ das Fehlen eines GARP-Gens an.

DT. NAME	WISS. NAME	GARP	\approx	=
Rotkehlantilope	<i>Anolis carolinensis</i>	✓	62 %	43 %
Großer Panda*	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	✓	90 %	85 %
Rind*	<i>Bos taurus</i>	✓	90 %	85 %
Fadenwurm	<i>Caenorhabditis elegans</i>	☒		
Zweifinger Faultier	<i>Choloepus hoffmanni</i>	☒		
Seescheide	<i>Ciona intestinalis</i>	☒		
Meerschweinchen	<i>Cavia porcellus</i>	✓	89 %	84 %
Zebrabärbling	<i>Danio rerio</i>	✓	58 %	40 %
Fruchtfliege	<i>Drosophila melanogaster</i>	☒		
Gürteltier	<i>Dasypus novemcinctus</i>	☒		
Kängururatte#	<i>Dipodomys ordii</i>	✓		
Hauspferd*	<i>Equus caballus</i>	✓	91 %	87 %
Igel	<i>Erinaceus europaeus</i>	✓	85 %	76 %
Igeltennik	<i>Echinops telfairi</i>	☒		
Hauskatze	<i>Felis catus</i>	✓	90 %	84 %
Stichling	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	✓	46 %	29 %
Huhn*	<i>Gallus gallus</i>	✓	63 %	46 %
Mensch	<i>Homo sapiens</i>	✓	100 %	100 %
Elefant	<i>Loxodonta africana</i>	✓	89 %	83 %
Truthahn*	<i>Meleagris gallopavo</i>	✓	63 %	46 %
Spitzmausbeuterlatte	<i>Monodelphis domestica</i>	✓	72 %	57 %
Känguru	<i>Macropus eugenii</i>	☒		
Mausohrfledermaus	<i>Myotis lucifugus</i>	✓	90 %	83 %
Hausmaus	<i>Mus musculus</i>	✓	89 %	80 %
Weißwangen-Gibbon	<i>Nomascus leucogenys</i>	✓	98 %	98 %
Schnabeltier	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	☒		
Kaninchen#	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	✓		
Reisfisch*	<i>Oryzias latipes</i>	✓	46 %	28 %
Pfeifhase	<i>Ochotona princeps</i>	☒		
Urang Utan	<i>Pongo abelii</i>	✓	98 %	98 %

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 3.1 – Fortsetzung

DT. NAME	WISS. NAME	GARP	≈	=
Klippschliefer	<i>Procavia capensis</i>	☒		
Neunauge	<i>Petromyzon marinus</i>	☒		
Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>	✓	99 %	99 %
Flughund	<i>Pteropus vampyrus</i>	✓	90 %	83 %
Wanderratte	<i>Rattus norvegicus</i>	✓	88 %	81 %
Spitzmaus	<i>Sorex araneus</i>	☒		
Bierhefe	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	☒		
Beutelteufel	<i>Sarcophilus harrisii</i>	✓	73 %	59 %
Hausschwein	<i>Sus scrofa</i>	✓	89 %	84 %
Ziesel	<i>Spermophilus tridecemlineatus</i>	☒		
Tupaia	<i>Tupaia belangeri</i>	☒		
Zebrafink*	<i>Taeniopygia guttata</i>	✓	64 %	46 %
Kugelfisch	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	☒		
Fugu	<i>Takifugu rubripes</i>	✓	56 %	37 %
Großer Tümmler	<i>Tursiops truncatus</i>	✓	91 %	86 %
Vikunja	<i>Vicugna pacos</i>	☒		
Krallenfrosch	<i>Xenopus tropicalis</i>	✓	58 %	41 %

Neben GARP konnten keine weiteren Gene identifiziert werden, die für ein Protein codieren, das die gleiche Domänenzusammensetzung besitzt und so ein Homolog, eine Genduplikation oder einen Vorläufer darstellen könnte. Die ähnlichsten LRR Proteine sind die Toll-ähnlichen Rezeptoren 8 und 9, sowie das LRRC Protein 33. Die Toll-ähnlichen Rezeptoren 8 und 9 besitzt extrazellulär drei, beziehungsweise vier LRR- und intrazellulär eine zusätzliche „Toll Interleukin-1 Rezeptor-ähnliche“ Domäne. Im Fall des LRRC 33 ist lediglich eine extrazelluläre LRR-Domäne mehr vorhanden, wo hingegen die LRRC-terminale Domäne fehlt. Außerdem fehlen allen drei Proteinen die charakteristischen Merkmale der prolinreichen Region und des Cystein-*loops* (vergleiche Abb. 3.2). Mit den anderen Toll-ähnlichen Rezeptoren oder LLR Proteinen wies GARP nur eine geringe Ähnlichkeit auf.

3.1.2. Stammbaumrekonstruktion durch die GARP-Proteinsequenz

Aus den in Tabelle 3.1 identifizierten GARP-Genen (außer *Dipodomys ordii* und *Oryzotolagus cuniculus* s.o.) wurde mittels des Programms „MrBayes“ und den abgeleiteten Proteinsequenzen ein molekularer Stammbaum errechnet (Abb. 3.1). Generell sammeln sich die GARP-Proteine aus Spezies ähnlicher *Phyla* auch in gemeinsamen Gruppen. Die vier Teleostier GARP-Proteine (blau) zweigen basal am Stammbaum ab und bilden zwei

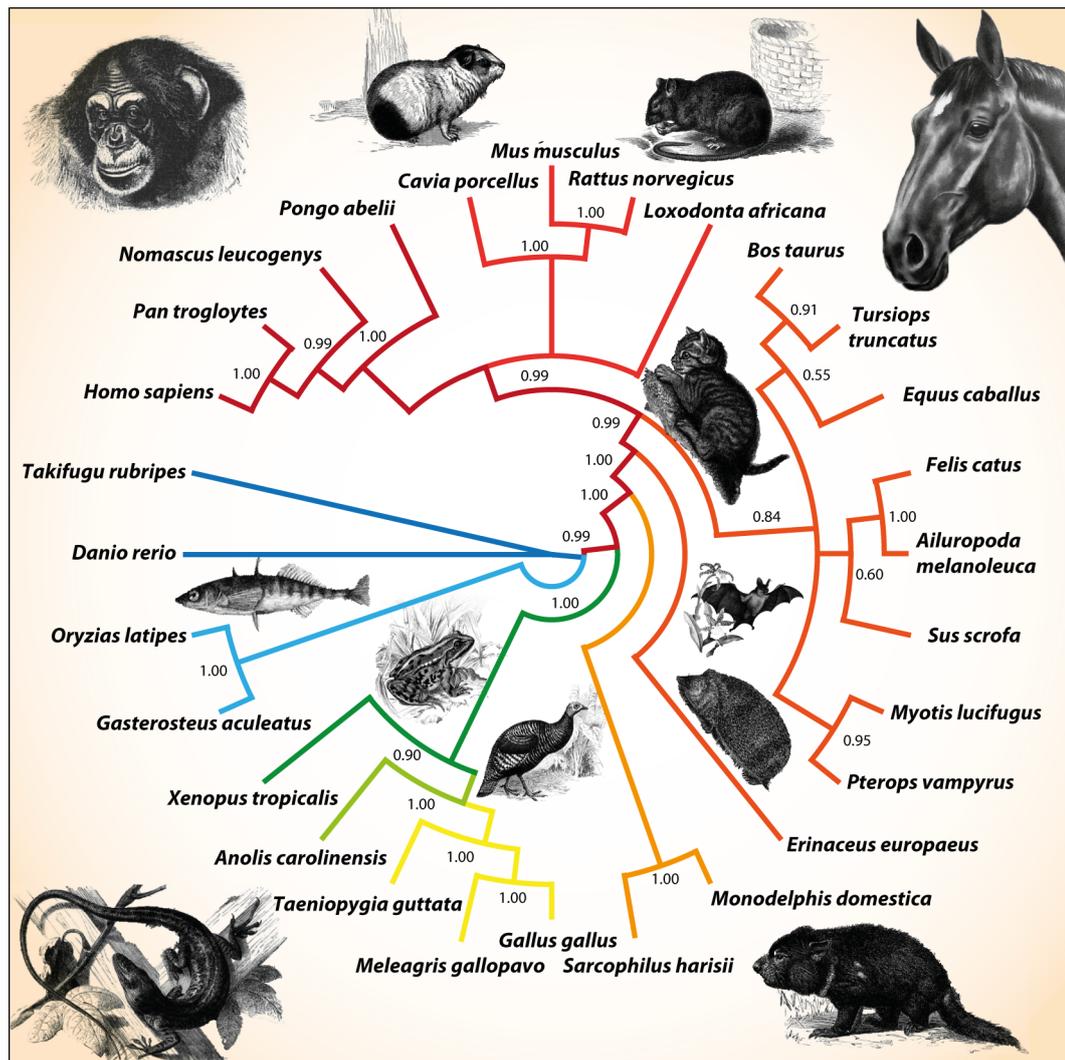


Abbildung 3.1.: Konsensusbaum des GARP-Proteins ausgewählter Spezies

Zirkuläres Kladogramm der GARP-Proteinsequenzen ausgewählter Spezies. Färbung der Äste nach dem Zeitpunkt ihrer Differenzierung (nach den Spektralfarben, blau = frühe Differenzierung, Rot = spätere Differenzierung. Für die grafische Darstellung wurde das Programm „Dendroscope“ (HUSON UND SCORNAVACCA 2012) gewählt. Abbildungen der Tiere aus „Brehms Thierleben“ 2. Auflage, 1883-1887

getrennte Äste. Einen gemeinsamen Ast bilden auch die GARP-Proteine der Lissamphibien und Sauropsiden (grün bis gelb). Die Säugetiere bilden zusammen einen weiteren Ast, der sich gut in weitere Untergruppen aufteilen lässt (orange bis dunkelrot). Es stehen hier die Marsupialia (orange) am basalen Ende und dem einzigen Insectivora (*Erinaceus europaeus*) am nächsten. Die restlichen Säuger teilen sich in zwei Großgruppen auf. Dies sind zum einen Laurasiatherie (Carnivora, Chiroptera, Cetartio- und Perisso-

dactyla) und der Großgruppe aus Primaten und Rodentia, in der sich basal auch der afrikanische Elefant (*Loxodonta africana*) einordnet. Bis auf wenige Ausnahmen werden alle Verzweigungen sehr gut („credibility score“ > 0,95) bis gut („credibility score“ > 0,75) unterstützt. Lediglich zwei Gabelungen innerhalb der Gruppe der Laurasiatheria werden mit „credibility“-Werten von 0,6 und 0,55 nur mäßig unterstützt.

3.1.3. Modellierung des GARP-Rezeptors

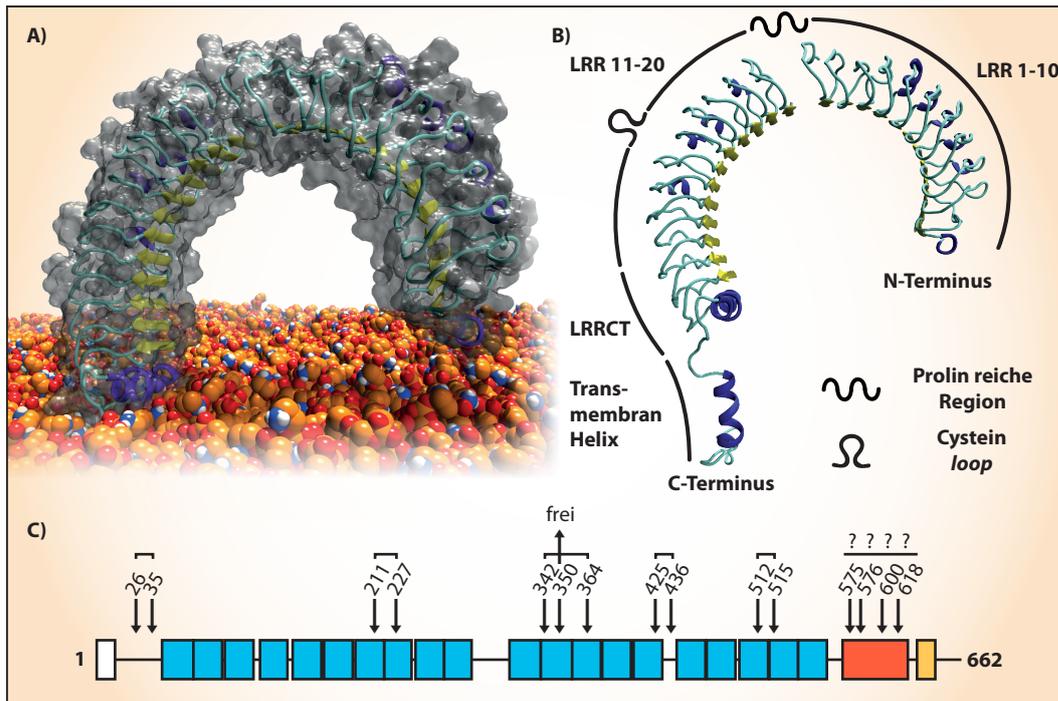


Abbildung 3.2.: 3D-Modell und Domänenzusammensetzung von GARP

A) In der Membran verankertes GARP-Modell. Das 3D-Modell wurde in einen Phospholipid-Bilayer (pope.pdb; (Hub et al. 2010)) eingepasst und die für Wasser zugängliche Oberfläche (grau) angezeigt. Färbung der Tertiärstrukturelemente: Faltblätter = violett, Helices = gelb. B) 3D-Modell mit zugeordneten Domänen und wichtigen Bereichen. LRR = Leucin reiche Region, LRRCT = LRR C-terminale Domäne, Färbung der Sekundärstrukturelemente siehe A). C) Domänenzusammensetzung mit den sich aus dem Modell ergebenden Disulfidbrücken. Zahlen geben die Position der verantwortlichen Cysteine an. Klammern zeigen die verbundenen Cysteine. Färbung der Domänen: weiß = Signalpeptid, blau = LRR-Domäne, orange = LRRCT-Domäne, gelb = Transmembranregion.

Für die Modellierung des GARP-Rezeptors wurden seine Domänen wie folgt aligniert. Als Vorlage für die LRRs der Ektodomäne diente die Datei 2O6Q.pdb (KIM ET AL. 2007), welche die kristallografische Struktur des Neunaugen VLRs enthält. Für die Transmembranregion wurde die Datei 2K9J.pdb gewählt (Tab. B.3). Mit diesem Ali-

gnement wurde dann, wie unter 2.5.4 beschrieben ein 3D-Modell erstellt. Die Transmembrandomäne des Modells wurde anschließend manuell in die Datei pope.pdb (Phospholipid-Bilayer) eingepasst (Abb. 3.2 A) (HUB ET AL. 2010). Die modellierte Struktur wies die für LRR typische Hufeisenstruktur auf. Dabei sind die β -Faltblätter parallel auf der Innenseite des Hufeisens angeordnet. Auf der Außenseite befinden sich helikale Strukturen mit unterschiedlicher Länge. Die Transmembrandomäne besteht aus einer durchgängigen α -Helix. Der Bereich der prolinreichen Region und des Cystein-loops konnten, da ein Template fehlte, nicht modelliert werden (Abb. 3.2 B). Die Position der Cysteine ließ sieben extrazelluläre Disulfidbrücken vermuten. Diese können zwischen den Cysteinen 26 und 35, 211 und 227, 342 und 364, 425 und 436, sowie zwischen 575, 576, 600 und 618 auf Grund ihrer räumlichen Nähe und Ausrichtung zueinander geknüpft werden. Dies gilt nicht für die letzten vier Cysteine der LRRC-terminalen Domäne. Hier konnte ihre Verknüpfung nicht aus dem Modell bestimmt werden (Abb. 3.2 C). Cystein 342 schien frei zu sein. Die vermutete Disulfidbrücke der Cysteine 425 und 436 (Cystein-loops) war ebenfalls nicht in der Struktur aufgelöst. Diese beiden Cysteine sind nur durch 11 Aminosäuren getrennt. Ihre Abfolge findet sich nicht in den PDB-Datenbanken, sodass ihr kein eindeutiges Sekundärstrukturelement zugewiesen werden kann. Dies legt den Verdacht nahe, dass es sich um eine relativ flexible loop-Struktur handelt, die eventuell durch die beiden Cysteine über eine Disulfidbrücke stabilisiert wird. Die LRRC-terminale Domäne sitzt im Modell der Membran auf. Der Innendurchmesser des „Hufeisens“ (Gly133 bis Lys541) beträgt 57 und der Außendurchmesser (Gly119 bis Ala531) 86 Å. Daraus ergibt sich für die Bogenparameter nach Enkhbayar et al. (2004) ein R -Wert von 29 Å und ein ϕ -Wert von 253°.

3.2. cDNA Screening von stimulierten und unstimulierten T-Zellen

Da ich eine proteolytische Regulation der GARP vermittelten TGF- β Aktivierung vermutete, wurde das Proteaseprofil von stimulierten und unstimulierten T-Helferzellen, sowie regulatorischen T-Zellen bestimmt. Dabei rückten vor allem Astacinproteasen in den Fokus. Von einzelnen Vertretern ist bekannt, dass sie über TGF- β und TGF- β -ähnliche Wachstumsfaktoren an der Regulation des Knochenwachstums, des Muskelwachstums und der Dicke, sowie der Elastizität der Dermis beteiligt sind. Über die Rolle dieser Proteasen im adaptiven Immunsystem existieren bisher keine Daten. Für die Matrix-Metalloproteasen, die ebenfalls mit der Aktivierung von TGF- β Signalwegen in Verbindung gebracht werden sind bereits Daten in der Fachliteratur vorhanden.

Zusätzlich wurden die Proteasen ADAM 10 und 17 als Referenz mit in die Studie einbezogen. Es ist gezeigt, dass in T-Zellen auf RNA Ebene ADAM 17 gut und ADAM 10 nicht detektiert werden kann (BRISO ET AL. 2008). RNA wurde aus den oben genannten Zellen, wie in 2.1.7 beschrieben, extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Die zuvor durchgeführte Sortierung der Zellen und die anschließende Stimulation wurde von der Arbeitsgruppe um Helmut Jonuleit aus der Dermatologie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt (JONULEIT UND SCHMITT 2005).

Das Ergebnis der PCR mit Astacin oder ADAM spezifischen Primern ist in Tabelle 3.2 und die zugehörigen Agarose-Gele in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Primer gegen ADAM10 und 17 dienten als Referenz.

In Abbildung 3.3 A und B sind die beiden Kontrollen zu sehen. ADAM 10 cDNA wird nicht detektiert, wogegen sich bei ADAM 17 Banden auf der erwarteten Höhe abzeichneten. Sowohl bei naiven T-Zellen ($CD4^+ CD25^-$) als auch bei $T_{Reg}s$ ($CD4^+ CD25^+$) waren die Signale in den stimulierten Zellen stärker. Bei den unstimulierten $T_{Reg}s$ trat eine zusätzliche Bande im Bereich von 450 bis 500 bp auf. Im Fall von BMP1 und mTolloid war das Bild differenzierter. Bei diesen beiden Proteasen handelt es sich um unterschiedlich lange Spleißvarianten desselben Gens. Für BMP1 konnten keine Primer erstellt werden, die nicht auch mTolloid cDNA detektieren. Die Primer für mTolloid dagegen können nicht an die BMP1 cDNA binden. Die Signale die mit den BMP1 Primern produziert wurden waren in beiden T-Zellpopulation zu sehen und wurden nach Stimulation der Zellen stärker (C). Für mTolloid war dies nicht der Fall. In naiven T-Zellen war das Signal stärker als in $T_{Reg}s$ aber es änderte sich nach Stimulation in beiden Populationen nicht (D). Für Ovastacin zeichnete sich ein ähnliches Bild, wie für BMP1 ab. In beiden Zellpopulationen ließen sich Signale auf der erwarteten Höhe detektieren, die nach Stimulation stärker wurden (E). Die GAPDH Kontrolle zeigt bei allen Proben die gleiche Signalintensität.

Tabelle 3.2.: cDNA Screening
Zusammengefasste Ergebnisse des cDNA Screenings aus T-Zellen. Mit Plus (+) sind Proteasen gekennzeichnet, für die mit spezifischen Primern ein Signal auf der vorhergesagten Produktgröße detektiert werden konnte.

PROTEASE	ERGEBNIS
ADAM 10	-
ADAM 17	+
BMP-1	+
mTolloid	+
mTolloid- <i>like</i> 1	-
mTolloid- <i>like</i> 2	-
Meprin α	-
Meprin β	-
Ovastacin	+

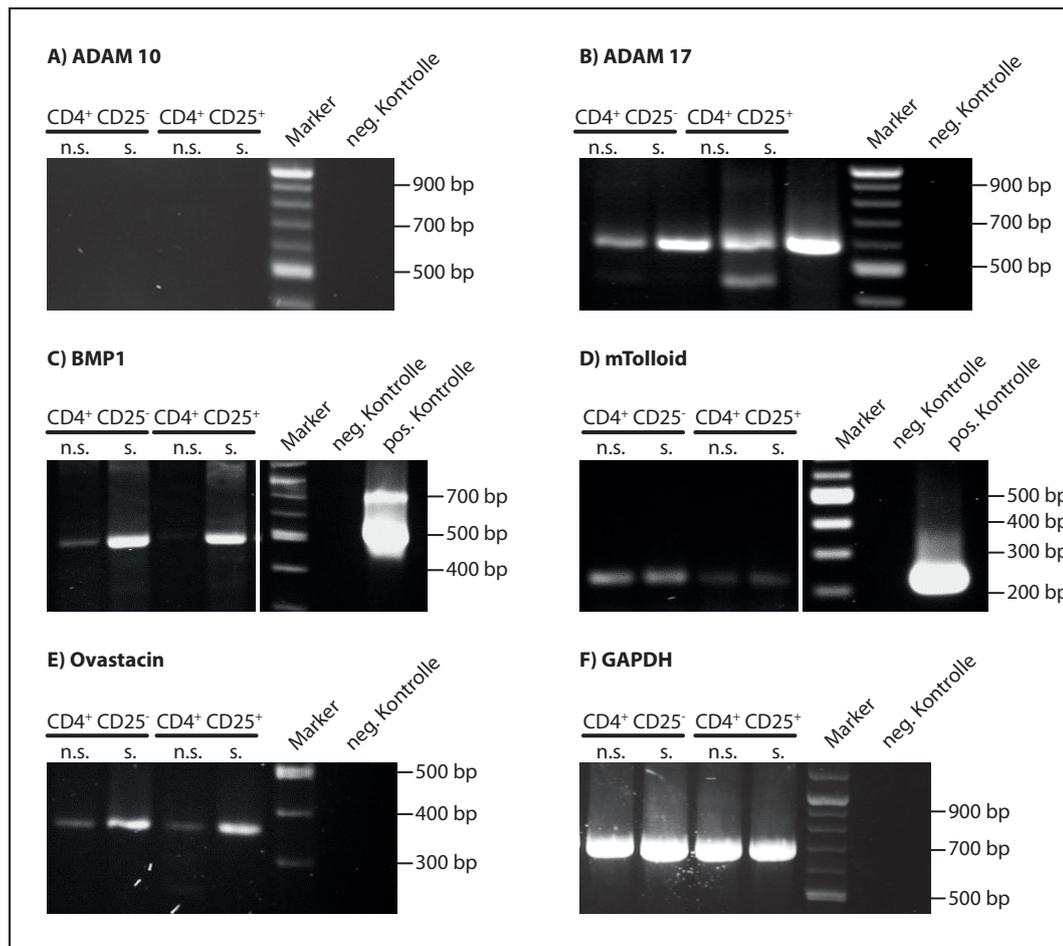


Abbildung 3.3.: Agarose Gele des cDNA Screenings

Die PCR Amplifikate des cDNA Screenings wurden in einem 1,5 %igem Agarosegel aufgetrennt. Als Marker diente der 100 bp Marker (New England Biolabs). CD4⁺ CD25⁻ = naive T-Zellen, CD4⁺ CD25⁺ = nT_{Regs}, n.s. = unstimuliert, s. = mit α CD3 und α CD28 Antikörper für 24 h stimuliert. Als negativ Kontrolle wurde statt cDNA H₂O_{reinst.} eingesetzt, als positiv Kontrolle (wenn vorhanden) 100 ng eines Vektors, der die entsprechende cDNA enthält. Erwartete Fragmentgröße für: ADAM 10 = 600 bp, ADAM 17 = 586 bp, BMP1 = 559 bp, mTolloid = 237 bp, Ovastacin = 363 bp und GAPDH = 700 bp.

3.3. Klonierung der für die Arbeit bedeutenden Gene

3.3.1. Das Konstrukt „GARP ohne Transmembranregion“ (GARP_{ΔTM})

Die Klonierung einer GARP-Variante ohne Transmembrandomäne und intrazellulärem Teil (GARP_{ΔTM}) wurde von Hagen Westphal während seines „Fortgeschrittenen Prak-

tikums 2: Synthese von Vektoren zur rekombinanten Expression von BMP1, TGF- β , LTBP und LRRC32 (GARP) in Säugerzellen“ durchgeführt. Dazu wurde das GARP Konstrukt (Aminosäure 1 bis 627) um einen His-Tag C-terminal erweitert und über die Restriktionsschnittstellen für *NheI* und *BamHI* in den pIRES-neo2 Vektor kloniert.

3.3.2. Das Konstrukt „GARP full-length“ (GARP_{FL})

Da die kommerziell käuflichen Antikörper gegen GARP in ihrer Spezifität zumindest fraglich sind wurde eine GARP-Variante erstellt, die zusätzlich einen intrazellulären Strep-Tag (im Folgenden GARP_{FL} genannt) für eine spätere Detektion trägt (Abb. 3.4 C). Hierzu wurden die in Tabelle E.1 verzeichneten Primer GARP „5' UTR“ und „C-terminus“ in einer PCR nach 2.1.2 verwendet. Das PCR-Produkt (Abb. 3.4 B links) lief auf der erwarteten Höhe von ca. 2100 bp. Es wurde nach dem Schema in Abbildung 3.4 A erst über TA-Überhänge in den pGEM-T Vektor und aus diesem mit Hilfe der Restriktionsenzymen *NheI* und *BamHI* herausgeschnitten und in den pIRES-neo2 Vektor eingefügt. Mittels *EcoRI* konnte die korrekte Insertion des Fragments in den Ex-

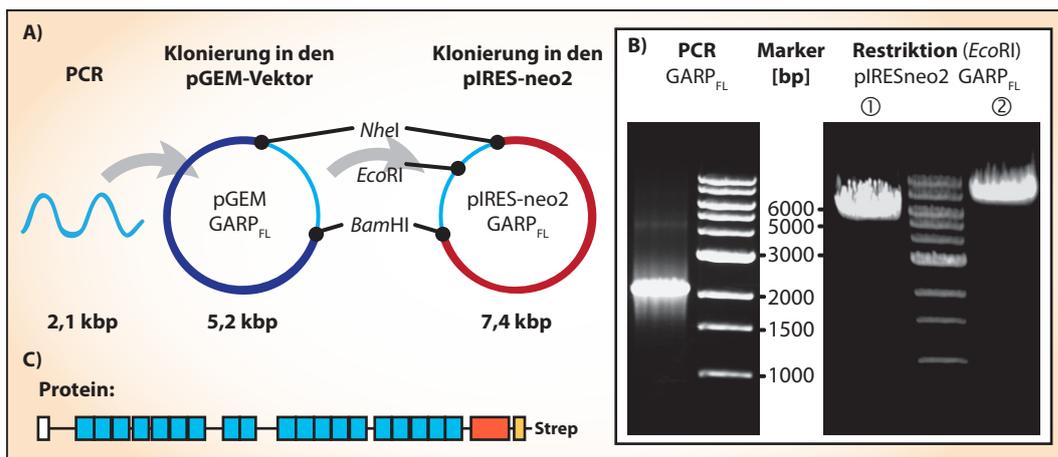


Abbildung 3.4.: Klonierungsschema des Konstrukts GARP_{FL}

A) Übersicht über die einzelnen Klonierungsschritte. Die rekombinante cDNA wurde mittels PCR amplifiziert und über TA-Überhänge in den pGEM-T Vektor inseriert. Danach folgte die Umklonierung in den Vektor pIRES-neo2 mit *NheI* und *BamHI*. Der Erfolg wurde über eine Restriktion mit *EcoRI* nachgewiesen. B) 1 %iges Agarosegel des GARP_{FL} PCR-Ansatzes (links) und Überprüfung zweier Klone, die das Konstrukts pIRES-neo2 GARP_{FL} tragen sollten (rechts), Marker: „1 kbp Marker“ (New England Biolabs) C) Domänenstruktur des kodierten Proteins: weiß = Signalpeptid, blau = LRR-Domäne, rot = LRRC-Domäne, gelb = Transmembrandomäne.

pressionsvektor pIRES-neo2 nachgewiesen werden (Abb. 3.4 B rechts). Dabei schneidet das Restriktionsenzym entweder einmal in der MCS oder, wenn GARP inseriert wurde, in der cDNA. Die *EcoRI* Schnittstelle der MCS wurde in diesem Fall durch die vorige Restriktion mit *NheI* und *BamHI* entfernt (vgl. D.4). Somit handelt es sich bei Klon 1 um den Leervektor (5,3 kbp) und bei 2 um den pIRES-neo2 mit GARP_{FL} Insert (7,4 kbp). Der Expressionsvektor enthält 3' der GARP_{FL} cDNA ein synthetisches Intron, eine IRES Struktur und eine Neomycinresistenz. Durch die simultane Expression von GARP_{FL} und der Neomycinresistenz können relativ schnell und einfach, durch Zugabe des Antibiotikums G418 in das Nährmedium, stabile Klone selektiert und anschließend isoliert werden.

3.3.3. Das Konstrukt „GARP tail-switch“ (GARP_{TS})

Das Konstrukt GARP_{ΔTM} wurde in Expressionsstudien nicht sezerniert (s. 3.4.1). Daher musste ein anderer Weg gewählt werden, um eine lösliche, sezernierte GARP-Ektodomäne zu erhalten. Marion Leuck begann im Rahmen ihrer Masterarbeit unter dem Titel „Heterologe Expression des humanen GARP-Rezeptors mit einem angehängten Meprin α-tail“ mit der Klonierung eines entsprechenden Konstrukts. Es wurde die Ektodomäne des GARP-Rezeptors (Aminosäure 1 bis 627) mit fünf zusätzlichen Histidinen zwischen Q(19) und H(20) und dem C-terminalen Teil von Meprin α (Aminosäuren 605 bis 746) verbunden. Als Linker zwischen den beiden Teilen wurde das Peptid „WSHPQFEKLE“ verwendet, welches die Sequenz des Strep-Tags beinhaltet (Abb. 3.5 C). In der Arbeit von Marion Leuck konnte das beschriebene Konstrukt amplifiziert und in den pGEM-T Vektor kloniert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Konstrukt aus dem pGEM-T Vektor in die Expressionsvektoren pIRES-neo2 und pFastBac umkloniert. Für die Klonierung wurden die Restriktionsenzyme *NheI* und *BamHI* (pIRES-neo2) oder *SpeI* und *SphI* (pFastBac) gewählt (Abb. 3.5 B). Ein präparativer Ansatz ist exemplarisch für die Restriktion mit *SpeI* und *SphI* in Abbildung 3.5 A Mitte gezeigt. Die Restriktion mit *NheI* und *BamHI* sah aufgrund der ähnlichen Fragmentgrößen vergleichbar aus. Der lineare pFastBac (grünes Dreieck) lief bei den erwarteten 4,8 kbp. Die cDNA des GARP_{TS} mit 2,6 kbp (hellblaues Dreieck) und der pGEM-T mit 3 kbp (violette Dreieck) liefen als Doppelbande, wobei die untere der beiden Banden der GARP_{TS} cDNA entspricht. Die entsprechenden Fragmente wurden extrahiert und ligiert (2.1.4).

Der Erfolg der Ligation wurde im Fall der Klonierung in den pIRES-neo2 mit *NheI* allein oder zusammen mit *BamHI* (Abb. 3.5 A links) und in den pFastBac mit *XhoI* oder *BamHI* überprüft (Abb. 3.5 A rechts). Im Falle des Konstrukts pIRES-neo2 GARP_{TS} schneidet *NheI* einmal, was zu einer Linearisierung des Vektors führt, welches auf der

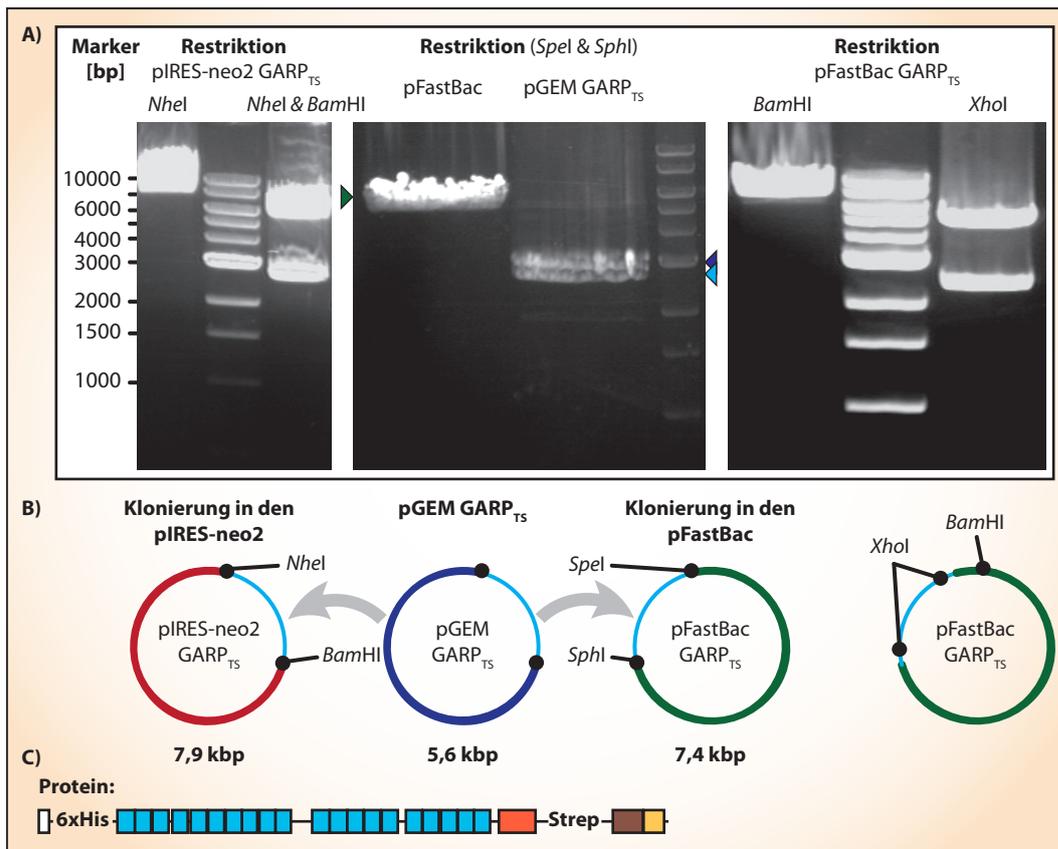


Abbildung 3.5.: Klonierungsschema des Konstrukts GARP_{TS}

A) 1 %iges Agarosegel zur Überprüfung des Konstrukts pIRES-neo2 GARP_{TS} mit *NheI* und *BamHI* (links); Präparatives Gel zur Klonierung der GARP_{TS} cDNA aus dem pGEM-T in den pFastBac Vektor mit *SpeI* und *SphI* (mitte); Überprüfung der Insertion der GARP_{TS} cDNA in den pFastBac mit *BamHI* und *XhoI* (rechts), Marker: „1 kbp Marker“ (New England Biolabs) B) Übersicht über die einzelnen Klonierungsschritte C) Domänenstruktur des kodierten Proteins: weiß = Signalpeptid, blau = LRR-Domäne, rot = LRRC-Domäne, braun = EGF-ähnliche Domäne (Meprin), gelb = Transmembrandomäne (Meprin).

Größe des Gesamtkonstrukts von knapp unter 8 kbp läuft. *NheI* und *BamHI* zusammen lösen das Insert komplett aus dem Vektor heraus. Die Fragmente entsprechen dem Restvektor pIRES-neo2 (5,3 kbp) und dem Insert GARP_{TS} (2,6 kbp). Ähnlich verhält es sich mit dem Konstrukt pFastBac GARP_{TS}. Hier wurden jedoch die Restriktionsenzyme *XhoI* und *BamHI* gewählt. *BamHI* besitzt wie zuvor gezeigt eine Schnittstelle und linearisiert das Konstrukt (7,4 kbp). *XhoI* schneidet zweimal im Insert und löst ein Teil aus dem Vektor (4,9 kbp 0 restvektor; 2,5 = Insert). Somit konnte gezeigt werden, dass es sich tatsächlich um das Konstrukt GARP_{TS} handelt. Alles in allem zeigen die

Gelbilder in Abbildung 3.5 den Erfolg der Klonierungsarbeiten.

3.3.4. Das Konstrukt „TGF- β mit Strep-Tag“ (TGF- β Strep)

Für das Konstrukt TGF- β Strep sollte ein Strep-Tag zwischen Signalpeptid und LAP kloniert werden (Abb. 3.6 C). Dazu wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die eine interne *FseI* Schnittstelle an der Grenze von Signalpeptid und LAP ausnützen (Tab. E.1). Das Klonierungsschema ist in Abbildung 3.6 B zu sehen. Der erste Primer fügte zwischen die Aminosäuren S(31) und T(32) die Strep-Tag Sequenz ein. Das PCR-Produkt konnte im Agarosegel bei ca. 1,1 kbp detektiert und extrahiert werden. Das Fragment

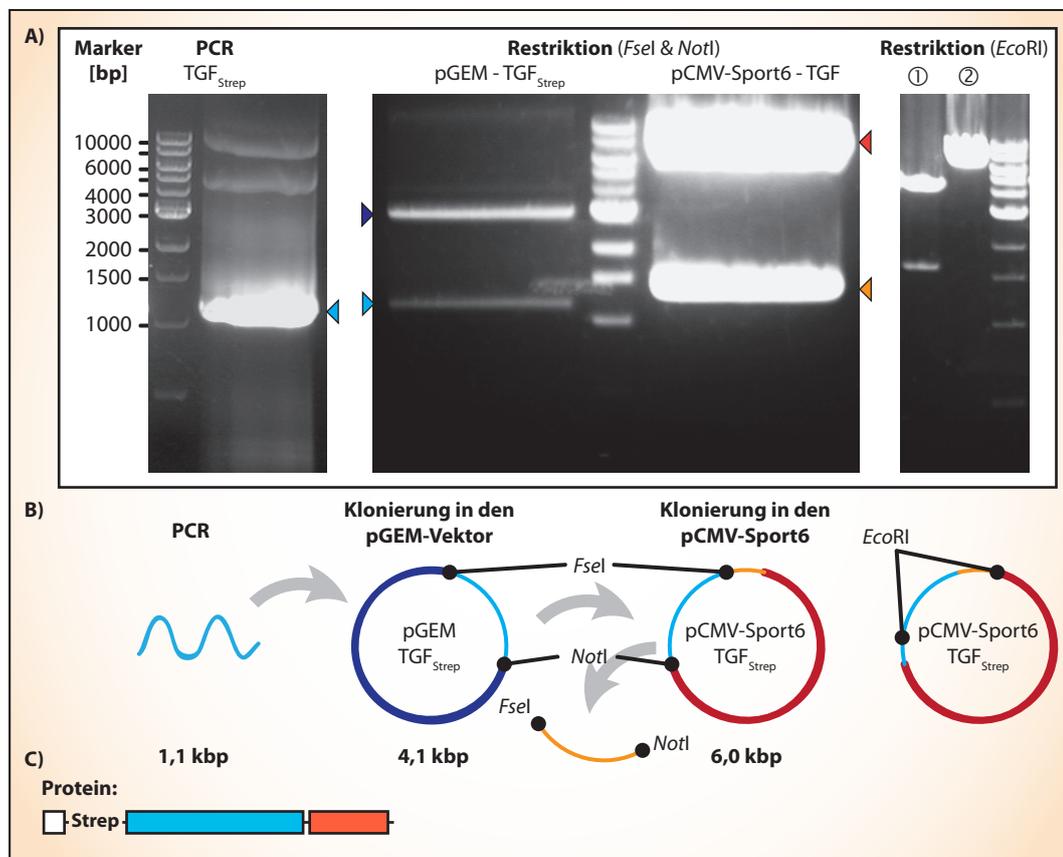


Abbildung 3.6.: Klonierungsschema des Konstrukts TGF- β Strep

A) 1 %iges Agarosegel des TGF- β Strep PCR-Ansatzes (links), präparatives Gel zur Erstellung des Vektors pCMV-Sport6 TGF- β Strep aus dem pGEM-T Vektor mit *FseI* und *NotI* (Mitte) und Überprüfung von zwei Klonen mit *EcoRI* (rechts), Marker: „1 kbp Marker“ (New England Biolabs) B) Übersicht über die einzelnen Klonierungsschritte C) Domänenstruktur des kodierten Proteins: weiß = Signalpeptid, blau = LAP, rot = reifes TGF- β .

wurde über seine TA-Überhänge in den pGEM-T Vektor kloniert. Anschließend konnte die Region ohne Tag (Aminosäuren G24 bis S390), durch die mit Tag ersetzt werden. Hierzu wurden beide Vektoren mit den Restriktionsenzymen *FseI* und *NotI* geschnitten. Die Fragmente in Abbildung 3.6 A Mitte wurden wie in Abbildung 3.6 B gezeigt, ausgetauscht. Dabei entsprechen die Farben der Dreiecke in Abbildung 3.6 A der Fragmentfarben aus B. Der Erfolg wurde über eine Restriktion mit *EcoRI* überprüft. Abbildung 3.6 rechts zeigt zwei ausgewählte Klone. Klon ① wird zweimal mit *EcoRI* geschnitten und trägt somit das rekombinante Fragment. Klon ② zeigt lediglich ein Fragment auf 6 kbp. Das auf diese Weise erstellte Konstrukt wurde außerdem in den pFastBac-Vektor kloniert (nicht gezeigt). Hierzu wurden die Restriktionsenzyme *SalI* (5'-Ende) und *NotI* (3'-Ende genutzt).

3.3.5. Transposition von GARP_{TS} und $\text{TGF-}\beta_{\text{Strep}}$ in Bacmide

Um Proteine in Insektenzellen mit dem Baculovirus Expressionssystem herzustellen muss die cDNA in das Virusgenom eingebracht werden. Dies geschieht durch Transposition in speziellen *E.coli* Zellen (DH10Bac, Invitrogen). Nach Präparation der Bacmide

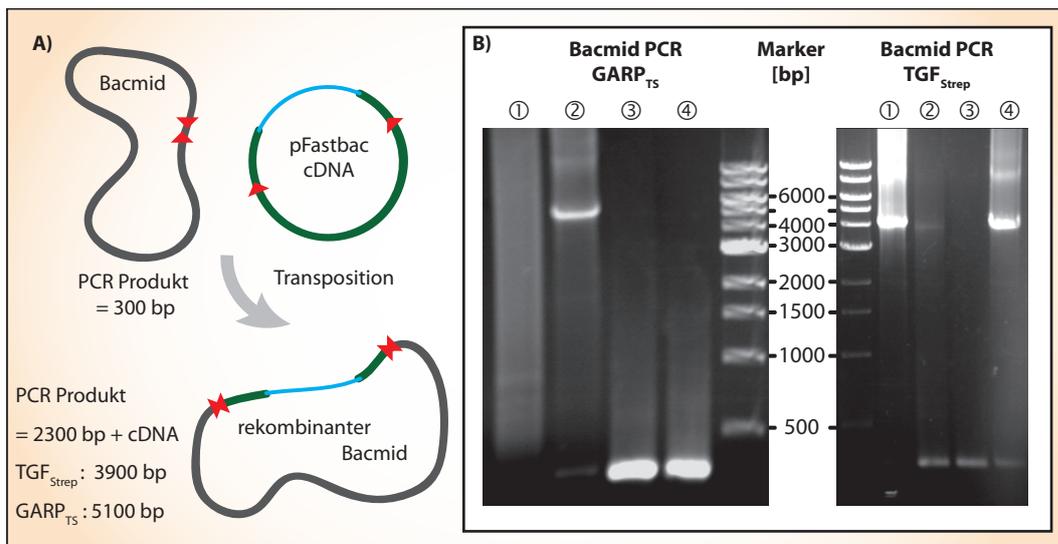


Abbildung 3.7.: Überprüfung der Transposition von $\text{TGF-}\beta_{\text{Strep}}$ und GARP_{TS} cDNA

A) Schema der Transposition der cDNA aus dem pFastBac Vektor in das Bacmid. Die gezeigten Vorgänge laufen in *E.coli* des Stamms DH10Bac ab. B) 1 %iges Agarosegel auf dem die PCR-Produkte aus der Bacmid PCR aufgetragen wurden. GARP_{TS} Bacmide links, $\text{TGF-}\beta_{\text{Strep}}$ Bacmide rechts, Marker: „1 kbp Marker“ (New England Biolabs)

kann die Transposition mittels einer PCR überprüft werden. Je nachdem ob das Zielgen erfolgreich eingebracht wurde, werden unterschiedlich große Fragmente amplifiziert (Abb. 3.7). Handelt es sich um ein „leeres“ Bacmid entsteht ein PCR-Fragment von 300 bp. Bei einer korrekten Transposition entsteht ein Fragment von 2300 bp + die Größe der cDNA (Gesamtgröße von TGF- β Strep = 3900 bp; GARP_{TS} = 5100 bp). Signale die auf eine korrekte Transposition hindeuten sind somit in Abbildung 3.7 B) Klon ② (links) bei 5,1 kbp und ① + ④ bei 3,9 kbp zu sehen. Die Klone ② und ③ enthielten eine leeren Expressionskassette (300 bp).

3.4. Expression der Konstrukte in HEK 293H Zellen

Nachdem alle Expressionsvektoren für die Konstrukte TGF- β Strep, GARP Δ TM, GARP_{FL} und GARP_{TS}, wie in 3.3 beschrieben, hergestellt wurden, sollte deren Exprimierbarkeit in HEK 293H Zellen untersucht werden. Hierfür wurden HEK 293H Zellen transfiziert. Zusätzlich wurden Lysate und Zellüberstände auf die Expression der Zielproteine hin

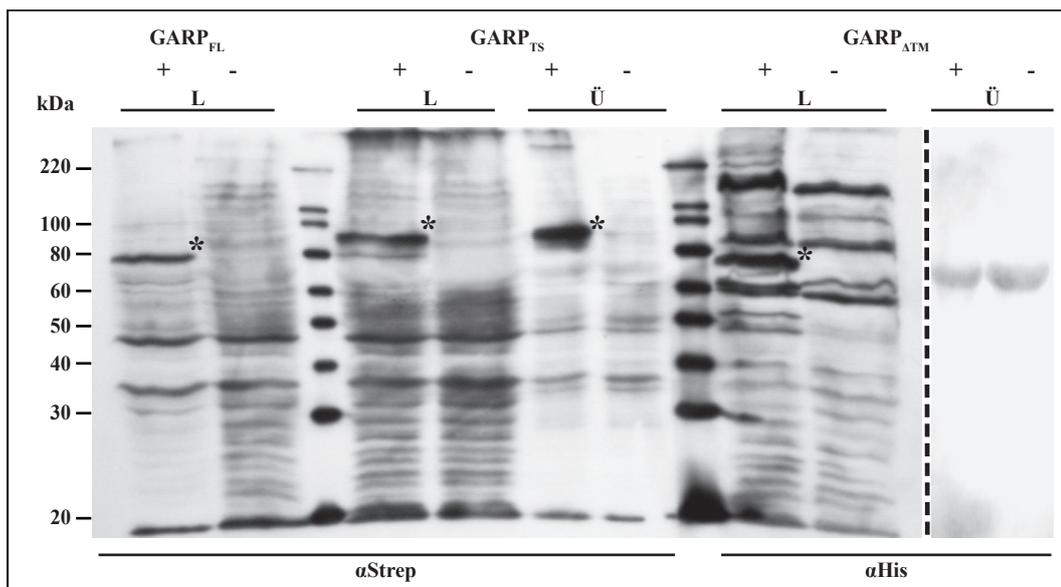


Abbildung 3.8.: **Expression der GARP-Varianten in HEK 293H Zellen**

HEK 293H Zellen wurden mit den Konstrukten für GARP_{FL}, GARP_{TS} und GARP Δ TM transfiziert (+). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf Expressionsmedium gesetzt und weitere 48 h später das Medium abgenommen und Zellysate präpariert. Der gefällte Überstand und das Lysat wurden im 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit einem α Strep-, beziehungsweise α His-Antikörper beprobt. Die Detektion erfolgte über Chemielumineszenz. Als Standard wurde der XP-Marker (Invitrogen) verwendet. Spezifische Banden der transfizierten Zellen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

untersucht (2.2.4).

3.4.1. Expression der verschiedenen GARP-Varianten

Abbildung 3.8 zeigt das Ergebnis der Immundetektion von Zelllysaten und der konzentrierten Überstände transfizierter HEK 293H Zellen. Generell erzeugten die Antikörper eine starke Hintergrundfärbung sowohl im Zelllysat, als auch im Überstand. Jedoch waren nach Transfektion und anschließender, transienter Expression spezifische Banden (*) in den Proben der transfizierten Zellen gegenüber der Negativkontrolle zu erkennen.

Im Fall des Konstrukts GARP_{FL} detektierte der α Strep-Antikörper das in der Zellmembran vorliegende GARP im Zelllysat (L) knapp unterhalb der 80 kDa Markerbande. Im Fall von GARP_{TS} wurde das rekombinante Protein mit dem α Strep-Antikörper sowohl im Zelllysat (L), als auch in sezernierter Form im Überstand (Ü) auf einem Molekulargewicht von knapp über 80 kDa detektiert, da es zuerst in die Zellmembran integriert und anschließend von Furin löslich gemacht wurde. Anders verhielt es sich mit dem Konstrukt GARP _{Δ TM}. Diese Variante sollte in den Zellüberstand sekretiert werden. Daher fehlt diesem Konstrukt eine Transmembrandomäne, sodass es erst so in das Lumen des ERs exprimiert und anschließend über den sekretorischen Weg aus der Zelle transportiert werden sollte. Im Überstand der Zellen (Ü) war jedoch kein Unterschied zwischen transfizierten Zellen (+) und Negativkontrolle (-) zu erkennen. Im Zelllysat fand sich hingegen eine Bande zwischen 70 und 80 kDa, die nur in der Probe der transfizierten Zellen vorkam, sodass der Schluss nahe liegt, dass dieses Konstrukt nicht korrekt aus der Zelle transportiert werden kann. Von den Konstrukten für GARP_{FL} und GARP_{TS} konnten durch Selektion mit 500 μ g/ml G418 Zelllinien etabliert werden, welche die Varianten des GARP-Rezeptors stabil überexprimierten.

3.4.2. Expression des Konstrukts TGF- β _{Strep}

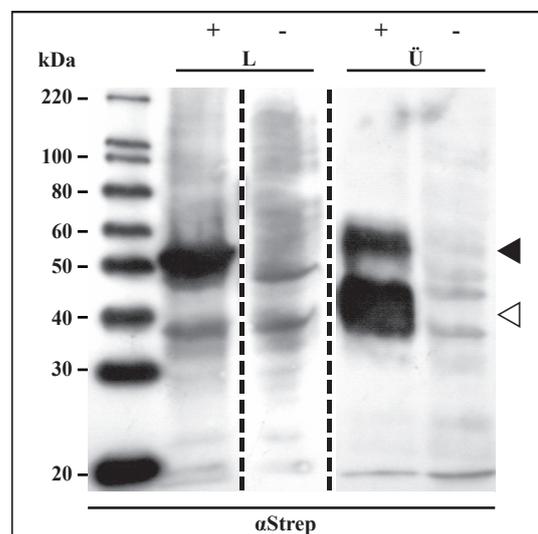
In Abbildung 3.9 ist das Ergebnis der transienten Expression von TGF- β _{Strep} dargestellt. Im Zelllysate fand sich eine spezifische Bande auf einer Höhe von ca. 50 kDa (\blacktriangleleft), was dem ProTGF- β entspricht. Im Überstand fanden sich neben dem ProTGF- β Signal eine mit circa 12 kDa kleinere Bande (\triangleleft). Sie war von stärkerer Intensität als die des ProTGF- β und entspricht aufgrund ihrer molekularen Größe und der Lokalisation der Tag-Sequenz dem LAP. Alle drei Banden waren in den Negativkontrollen von Zelllysate und Überstand (-) nicht nachweisbar.

3.4.3. Coexpression von TGF- β _{Strep} und GARP_{FL}

Nach der Coexpression von GARP_{FL} und TGF- β _{Strep} wurden die Lysate der Zellen in der nicht reduzierenden 7,5 %igen SDS-PAGE untersucht (Abb. 3.10). Nach Western-Blot und Immundetektion mit dem α Strep-Antikörper konnten zum einen Signale für ProTGF- β (\blacktriangleleft) und GARP_{FL} (\triangleleft) detektiert werden. Das ProTGF- β lag hierbei sowohl als Monomer (50 kDa) oder als Dimer vor. Die dimere Form war jedoch nur schwach zu erkennen. Des Weiteren fanden sich undeutliche TGF- β Signale zwischen 120 und 220 kDa, die keinem bekannten Komplex zugeordnet werden konnten. Im Falle der Coexpression von GARP_{FL} und TGF- β _{Strep} trat eine zusätzliche Bande im hochmolekularen Bereich über 220 kDa auf, bei der es sich vermutlich um den GARP-TGF- β Komplex handelte (\diamond).

Abbildung 3.9.: TGF- β _{Strep} Expression in HEK 293H Zellen

HEK 293H Zellen wurden mit dem Konstrukt für TGF- β _{Strep} transfiziert (+). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf Expressionsmedium gesetzt und weitere 48 h später das Medium abgenommen und Zelllysate präpariert. Der gefällte Überstand und das Lysat wurden in 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit einem α Strep-Antikörper beprobt. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz. Als Standard wurde der Magic Mark XP-Marker (Invitrogen) verwendet. ProTGF- β ist mit einem \blacktriangleleft gekennzeichnet und latentes TGF- β mit \triangleleft .



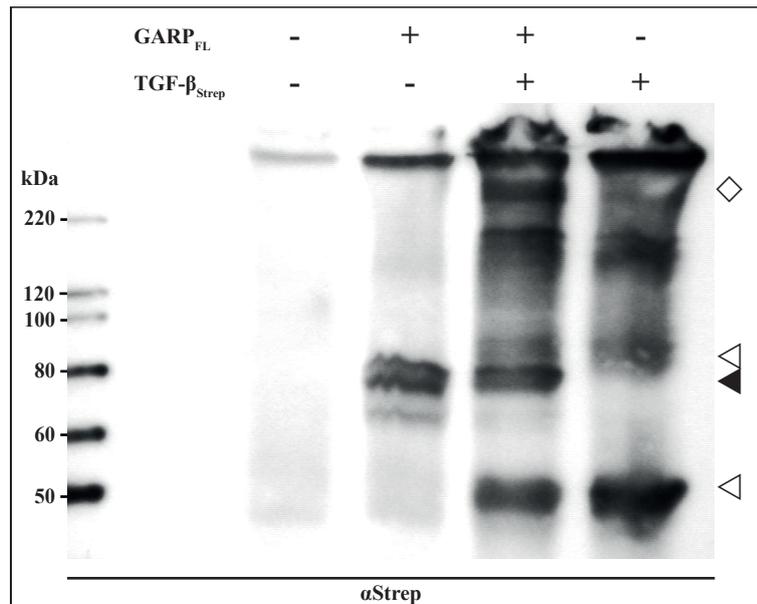


Abbildung 3.10.: **Coexpression von $GARP_{FL}$ und $TGF-\beta_{Strep}$ in HEK 293H Zellen**

HEK 293H Zellen wurden mit den Konstrukten $GARP_{FL}$ und $TGF-\beta_{Strep}$ transfiziert (+). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf Expressionsmedium gesetzt und weitere 48 h später Zellysate präpariert. Das Lysat wurde in der 7,5 %igen nicht reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit einem α Strep-Antikörper beprobt. Die Detektion erfolgte über Chemielumineszenz. Als Standard wurde der Magic Mark XP-Marker (Invitrogen) verwendet. Banden auf der erwarteten molekularen Größe sind mit einem Stern (◊, ◁ und ▷) gekennzeichnet.

3.5. Reinigung von $GARP_{TS}$ und $TGF-\beta_{Strep}$ aus Hi5-Überständen

Nach der Infektion von Hi5-Insektenzellen mit Baculoviren (2.3.1), wurde der Zellüberstand, wie in 2.3.2 beschrieben, aufbereitet und die Proteine an das Affi-Blue Säulenmaterial gebunden.

Von der Säule konnten mit Hilfe des Hochsalzpuffers zwischen 30 und 40 mg Gesamtprotein eluiert werden, welche die rekombinanten Konstrukte enthielten. Die gepoolten Elutionsfraktionen wurden weiter wie in 2.3.2 beschrieben für Ni-NTA, beziehungsweise Strep-Tactin Affinitätschromatografie dialysiert.

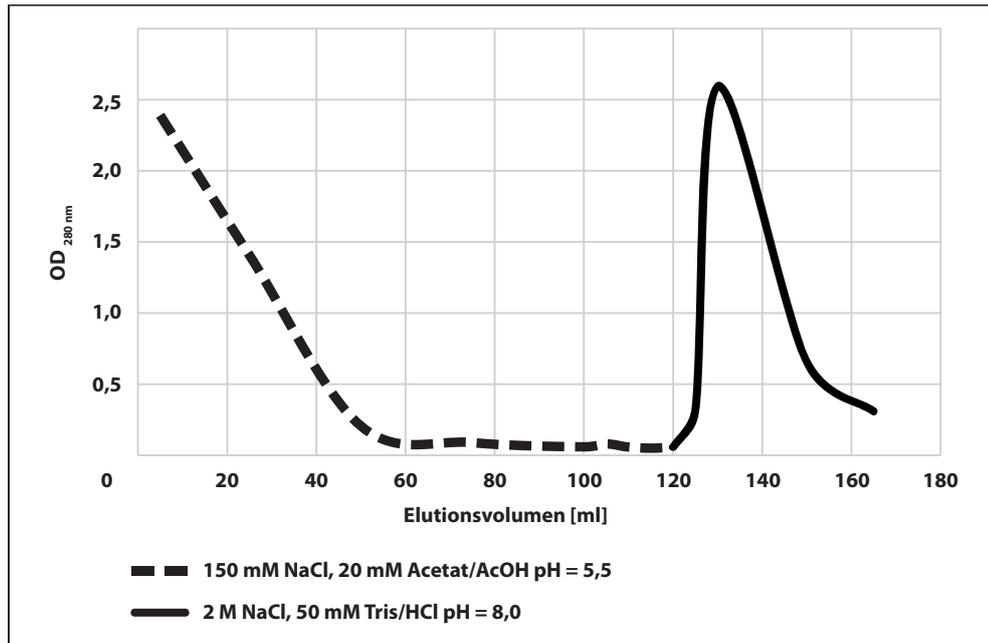


Abbildung 3.11.: **Vorreinigung von GARP_{TS} und TGF- β _{Strep} durch Affi-Blue Chromatografie**

Der zellfreie und auf pH 5,5 eingestellte Hi5-Überstand wurde über Nacht an das Affi-Blue Säulenmaterial gebunden. Es wurde mit 150 mM NaCl, 20 mM Acetat/AcOH pH 5,5 (---) gewaschen und im Anschluss mit 2 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,0 eluiert (—).

3.5.1. Ni-NTA Affinitätschromatografie von GARP_{TS}

Nach der Dialyse wurde GARP_{TS} wie in 2.3.3 beschrieben durch Ni-NTA Chromatografie gereinigt (Abb. 3.12). Im Elutionsprofil (A) sind zwei markante Peaks zu erkennen. Der erste Peak erschien bei einer Imidazolkonzentration von 50 mM und der zweite Peak eluierte bei 100 mM Imidazol. Die Intensität des zu erst eluierten Proteinpeaks war stets stärker als die des zweiten. Eine gelelektrophoretische Analyse mit anschließender Coomassie Brilliant Blau-Färbung ist in Abbildung 3.12 B zu sehen. Im Ausgangsmaterial (SM) und im Durchlauf (DL) war eine starke BSA Bande zu erkennen. Die Fraktionen, die mit 100 mM Imidazol (F24-28) eluiert wurden wiesen eine relativ reine Bande bei einem Molekulargewicht von 80 kDa auf. Diese Größe korrelierte mit der erwarteten Größe des GARP_{TS} Konstrukts. Insgesamt konnten so aus 1 l konditioniertem Hi5-Überstand insgesamt 1,6 mg rekombinantes GARP_{TS} gewonnen werden.

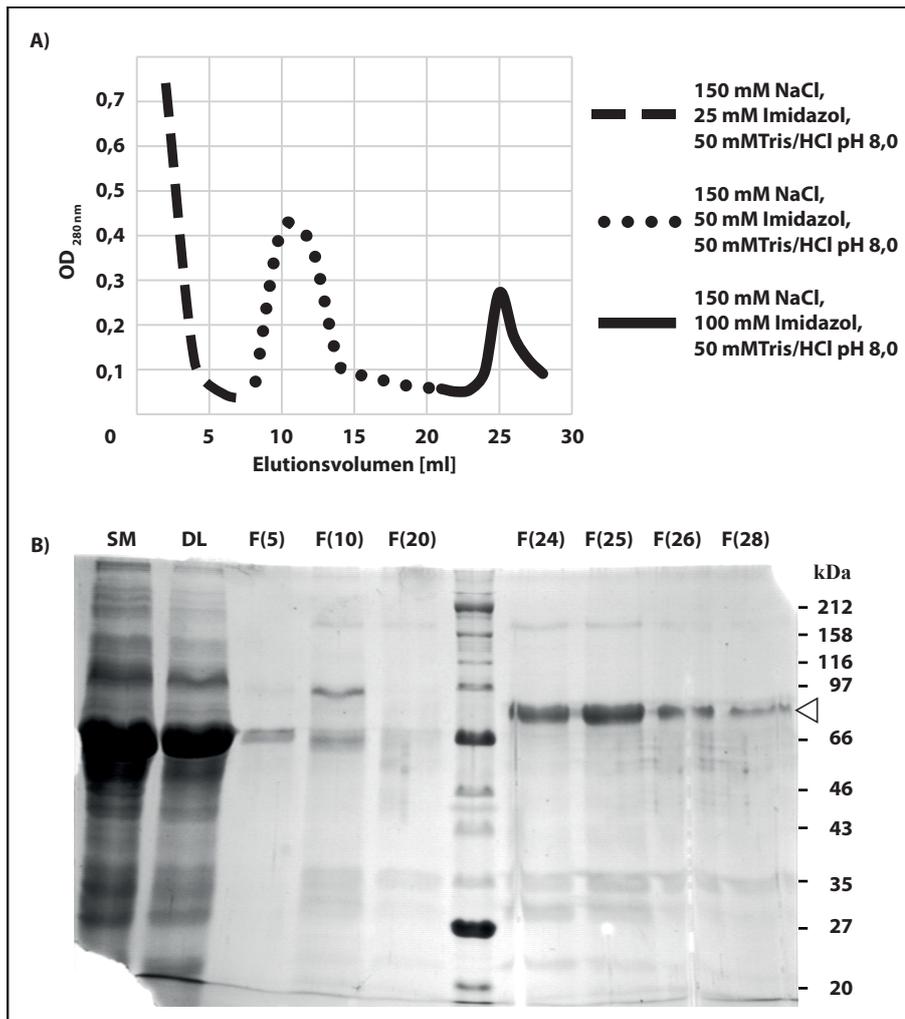


Abbildung 3.12.: **Ni-NTA Affinitätschromatografie von $GARP_{TS}$**

A) Elutionsprofil der Ni-NTA Affinitätschromatografie. Die optische Dichte bei 280 nm wurde gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Es wurde nacheinander mit Puffern gewaschen, die in aufsteigender Reihenfolge 25 (---), 50 (···) und 100 mM Imidazol (—) enthielten. B) 20 μ l des Ausgangsmaterials (SM), des Durchlaufs (DL) und der Elutionsfraktionen (F ml) wurden im 10 %igem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. ◁ markiert $GARP_{TS}$

3.5.2. Strep-Tactin Affinitätschromatografie von $TGF-\beta_{Strep}$

Ähnlich wie $GARP_{TS}$ wurde $TGF-\beta_{Strep}$ über Strep-Tactin Affinitätschromatografie (2.3.4) gereinigt (Abb. 3.13). Nachdem die Elutionsfraktionen eine $OD_{280\text{ nm}}$ nahe Null erreicht hatte, wurde durch die Zugabe von 2,5 mM D-Desthiobiotin eluiert. Die Analyse der Fraktionen mittels Immundetektion (B, links) zeigte in den Elutionsfraktionen bei 10 und 12 ml Signale für Pro- und latentes $TGF-\beta$ (◀, ◁). Durch Coomassie Brilliant

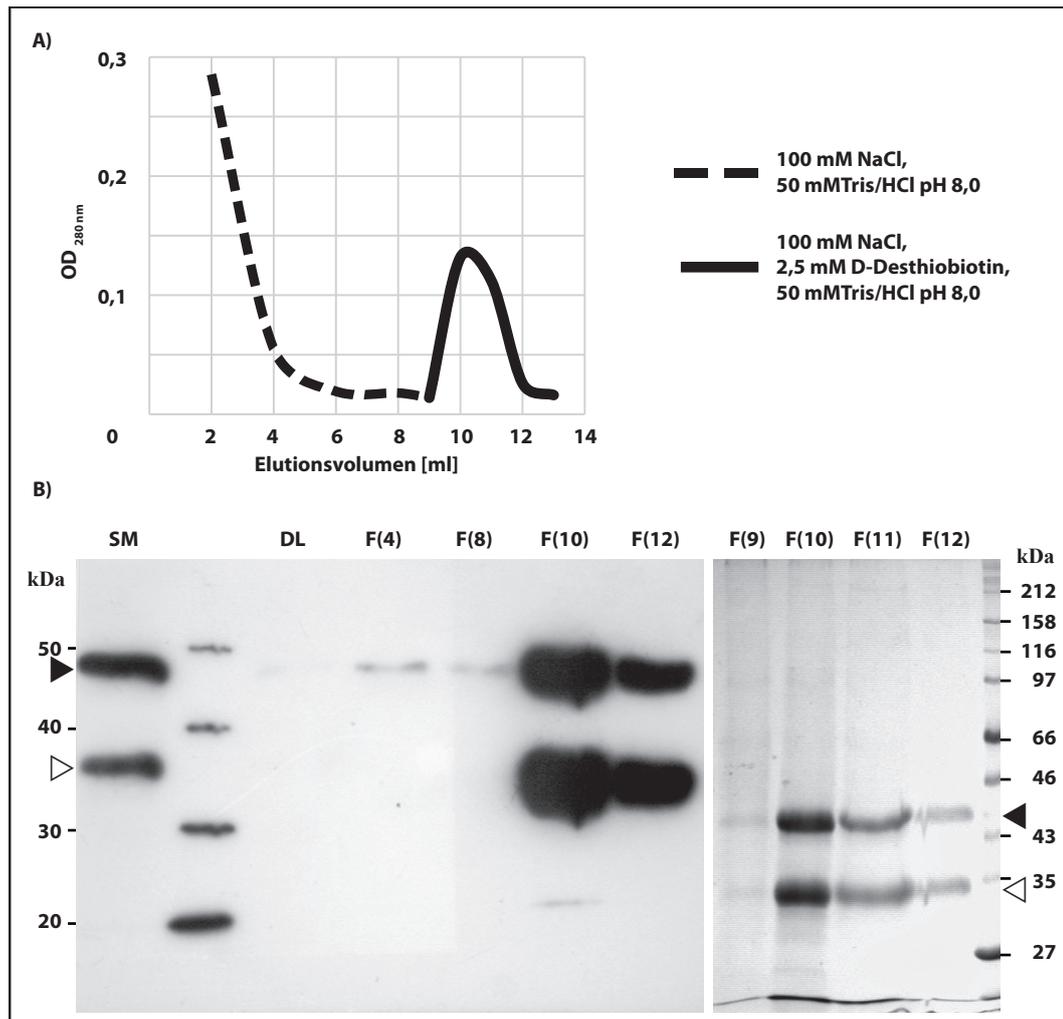


Abbildung 3.13.: **Strep-Tactin Affinitätschromatografie von TGF- β _{Strep}**

A) Elutionsprofil der Strep-Tactin Affinitätschromatografie. Die optische Dichte bei 280 nm wurde gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Es wurde mit Dialysepuffer (---) gewaschen und die Elution durch die Zugabe von 2,5 mM D-Desthiobiotin (—) eingeleitet. B) 20 μ l des Ausgangsmaterials (SM), des Durchlaufs (DL) und der Elutionsfraktionen (F ml) wurden im 10 %igem SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Immundetektion erfolgte mit dem α Strep-Antikörper (links). Zusätzlich wurden 100 μ l der Elutionsfraktionen TCA-DOC gefällt und in einem weiteren SDS-Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (rechts). Das ◀ markiert Pro- und das ◁ latentes TGF- β

Blau-Färbung (B, rechts) konnte der Nachweis erbracht werden, dass sich in den TGF- β positiven Fraktionen keine weiteren Proteine befanden. Insgesamt konnten 240 μ g rekombinantes TGF- β _{Strep} aus 1 l konditioniertem Hi5 Überstand gereinigt werden.

3.6. CD-Spektroskopie von GARP und TGF- β

Der Faltungszustand und die thermische Stabilität der rekombinanten Proteine GARP_{TS} und TGF- β _{Strep} wurden CD-spektroskopisch überprüft. Die Proteine wurden alleine oder nach Coinkubation bei verschiedenen Temperaturen gemessen.

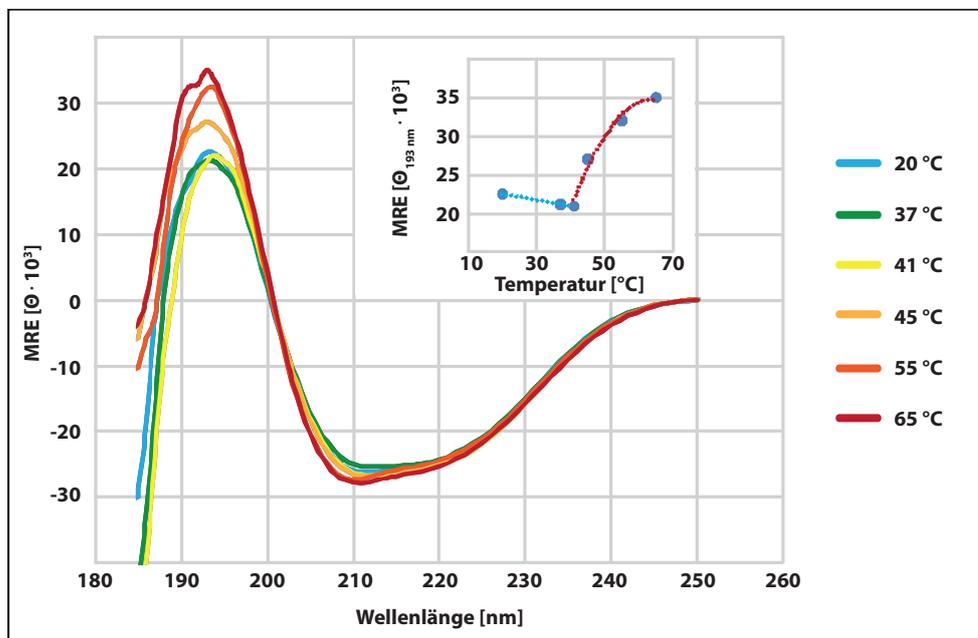


Abbildung 3.14.: CD-Spektroskopie von GARP_{TS}

CD-Spektren (300–185 nm) von 7,5 μ M GARP_{TS} in 100 mM NaF, 50 mM NaH₂PO₄ pH = 7,4 bei verschiedenen Temperaturen. 20 °C (blau), 37 °C (grün), 41 °C (gelb), 45 °C (orange), 55 °C (rot), 65 °C (dunkelrot).

Das CD-Spektrum von GARP_{TS} (7,5 μ M) wies typische Charakteristika auf (Abb. 3.14). Es besaß ein Maximum bei 193 nm und ein Minimum bei 208 nm. Die mittlere relative Elliptizität (MRE) stieg bei 193 nm bis auf einen Wert von 21000 θ und fiel auf -25000θ bei 208 nm im Temperaturbereich bis 41 °C ab (blau bis gelb). Bei einer Temperaturzunahme auf bis zu 65 °C (orange bis dunkelrot) stieg die MRE bei 193 nm weiter bis auf 35000 (+10000) θ (Abb. 3.14 oben rechts). Die MRE bei 208 nm änderte sich nur leicht um 2000 θ ins Negative. Eine weitere Besonderheit wiesen die Spektren im Bereich unter 190 nm auf. Dort fiel das Spektrum steil ins Negative ab, was sehr selten bei CD-Messungen beobachtet wird. Ähnliche CD-Spektren sind auch für andere, sekretierte LRR-Proteine, wie Decorin (KRISHNAN ET AL. 1999) oder Leureptin (ZHU ET AL. 2010) beschrieben, was eine native Faltung nahe legt.

TGF- β _{Strep} (Abb. 3.15) zeigte ein CD-Spektrum mit deutlich geringerer MRE Intensi-

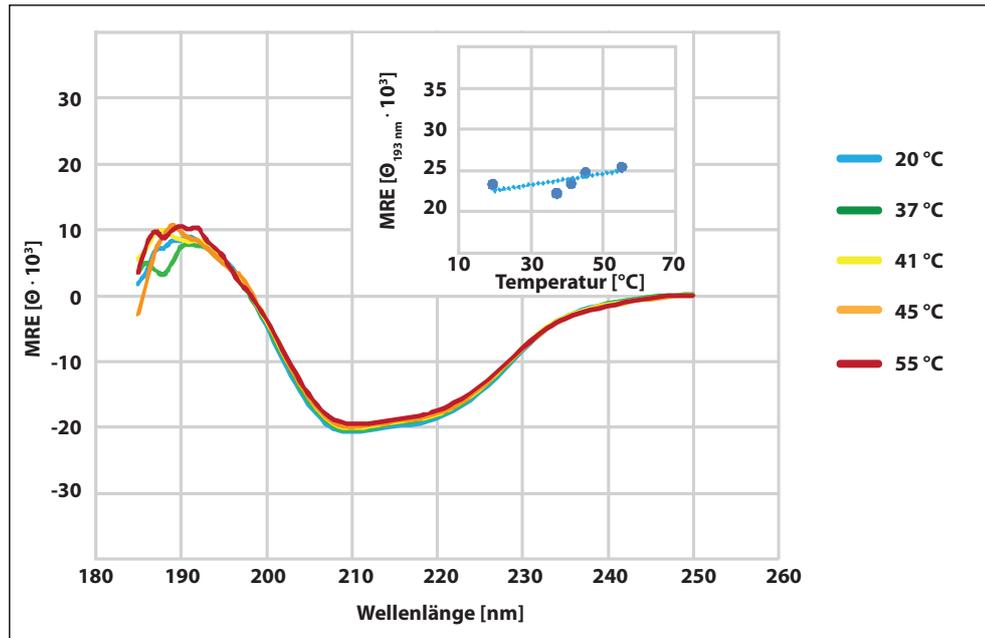


Abbildung 3.15.: **CD-Spektroskopie von TGF- β Strep**

CD-Spektren von $9,3 \mu\text{M}$ TGF- β Strep in 100 mM NaF , $50 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ pH = 7,4 bei verschiedenen Temperaturen. $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (blau), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (grün), $41 \text{ }^\circ\text{C}$ (gelb), $45 \text{ }^\circ\text{C}$ (orange), $55 \text{ }^\circ\text{C}$ (rot).

tät als das von GARP_{TS}. Die Maximalwerte betragen für TGF- β Strep lediglich $+10000 \theta$ bei 190 nm und -20000θ bei 209 nm . Bei Erhöhung der Temperatur bis auf $55 \text{ }^\circ\text{C}$ änderte sich die MRE nur geringfügig (Abb. 3.15 oben rechts). Das Spektrum war ab einer Wellenlänge von unter 190 nm stark verrauscht, sodass keine weiteren Informationen aus dem Spektralbereich kürzerer Wellenlänge gewonnen werden konnten.

Die CD-Spektren zur Untersuchung des Komplexes aus TGF- β und GARP_{TS} sind in Abbildung 3.16 dargestellt. Die blaue Kurve stellt dabei das Spektrum von GARP_{TS} alleine und die grüne Linie die des TGF- β Strep allein dar. Die theoretische MRE einer Proteinlösung aus GARP_{TS} und TGF- β Strep (MRE aus der Summe der Elliptizitäten der Einzelmessungen) ist in orange, die gemessene in rot dargestellt. Offensichtlich weichen beide Kurven voneinander ab. Während das errechnete Spektrum unter 190 nm stark ins Negative fiel, war dies für den gemessenen Komplex nicht zu beobachten. Hier weist das gemessene Spektrum eine Schulter auf und blieb im positiven MRE-Bereich. Zudem war der Peak von 193 (errechnet) nach 196 nm (gemessen) verschoben. Im Spektralbereich von 200 bis 250 nm stimmte das theoretische Spektrum mit dem gemessenen überein. Diese Unterschiede zwischen theoretischem und gemessenen Spektrum deuten auf eine Interaktion der Proteine hin.

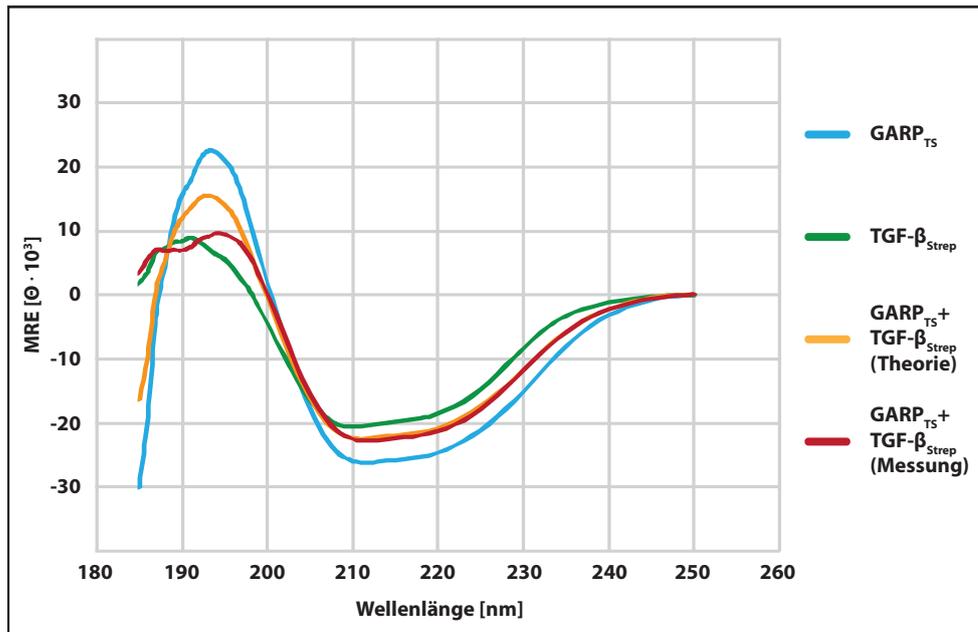


Abbildung 3.16.: **CD-Spektroskopie des GARP TGF- β Komplexes**

CD-Spektren des GARP (7,5 μ M) und TGF- β (9,3 μ M) in CD-Assay Puffer (2.4.7) sowohl allein (blau für GARP_{TS} und grün für TGF- β) als auch im Komplex (rot). Zusätzlich ist mit orange die MRE der Summe der Einzelspektren gezeigt. Die Spektren wurden zwischen 185 und 300 nm aufgenommen und der Spektralbereich von 185 bis 250 nm gezeigt. Die Messungen fanden bei 25 °C statt.

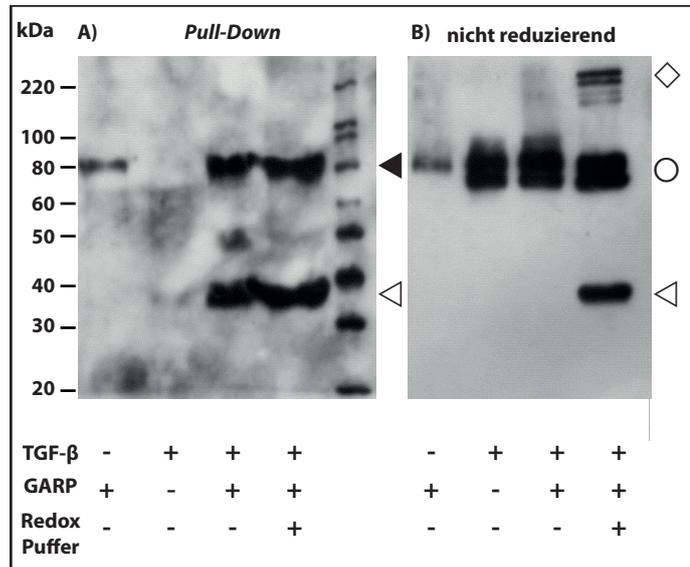
3.7. Bindung von GARP an TGF- β

Die Expressionsstudien (3.4), sowie die CD-spektroskopischen Untersuchungen (3.6) von GARP und TGF- β legen eine Bindung der beiden Proteine nahe. Von Interesse ist in diesem Fall, ob die Bindung von GARP und TGF- β das zelluläre Redox-Milieu benötigt oder ob eine Bindung auch *in vitro* stattfinden kann. Um dies zu überprüfen wurden die Ansätze wie in 2.4.8 beschrieben mit und ohne Cystein/Glutathion inkubiert. Am Folgetag wurden die Ansätze gesplittet und aus einem Teil wie in 2.4.9 beschrieben ein GARP_{TS} *pull-down* durchgeführt (Abb. 3.17 A und B).

Nach dem *pull-down* ließen sich nach Analyse des erhaltenen Komplexes Banden auf der spezifischen Höhe von GARP_{TS} (◄) und dem latenten TGF- β Strep (◄) detektieren, da beide einen Strep-Tag tragen. Dabei fand sich GARP_{TS} in allen Ansätzen, in denen es hinzugegeben wurde und TGF- β nur dann, wenn auch GARP_{TS} vorhanden war. Es spielte hierbei keine Rolle, ob die vorige Übernachtinkubation in Anwesenheit des Redox-Puffers stattfand oder nicht (Abb. 3.17 A). Im nicht reduzierenden Zustand (Abb. 3.17 B) war zu erkennen, dass die TGF- β Dimere (pro und latent) auf der gleichen Höhe

Abbildung 3.17.: *In vitro* Kopplung von GARP_{TS} und TGF- β Strep

A) GARP_{TS} und TGF- β Strep wurden über Nacht bei RT mit oder ohne Redox-Puffer inkubiert. Die Proben wurden anschließend für 1 h bei 4 °C mit magnetischen Affinitätskugeln inkubiert um GARP und mögliche GARP-TGF- β Komplexe zu isolieren. Die an den Affinitätskugeln gekoppelten Proteine wurden über Western-Blotting mit anschließender Immundetektion (α Strep-AK) identifiziert. B) Gleich behandelte Proben wurden auf einem 10 %igem, nicht reduzierenden SDS-Gel aufgetrennt und ebenfalls durch Western-Blot und Immundetektion mit dem α Strep Antikörper detektiert.



wie GARP laufen (\circ). Wurde der Redox-Puffer verwendet, so bildeten sich hochmolekulare Komplexe über 220 kDa (\diamond). Um die Bildung von unspezifische Disulfidbrücken zu vermeiden wurde ein Redoxpotential eingestellt, das dem des ER entspricht. Unter diesen Umständen bleiben stabile Disulfidbrücken intakt und nur reaktive werden aktiviert. Diese können dann zwischen GARP und TGF- β neue Disulfidbrücken ausbilden, die stabiler sind als die Ausgangsbrücken. Die beobachtete Bande eines latenten TGF- β Monomers im nicht reduzierenden SDS-Gel war ein Artefakt der Behandlung mit dem Redox-Puffer. Das enthaltene freie Cystein war anscheinend in der Lage beim Erhitzen der Proben latentes TGF- β aus dem Dimer in seine Monomer Form zu reduzieren. Latentes TGF- β scheint daher leichter zu reduzieren zu sein, als die Proform.

3.8. Prozessierung von GARP

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit galt der Untersuchung der proteolytischen Prozessierbarkeit von GARP. Das rekombinante GARP Konstrukt GARP_{TS} wurde daher zuerst *in vitro* mit den Proteasen Trypsin, Neutrophiler Elastase, Plasmin, MMP2, MMP9, Ovastacin, BMP1, Meprin α und Meprin β inkubiert (Tab. 3.3). Für die Proteasen Trypsin, Plasmin, Elastase, MMP2, MMP9 und Ovastacin konnte eine Proteolyse nachgewiesen werden. Auf diese positiv getesteten Proteasen wurde im Folgenden näher eingegangen. Dabei wurde ein besonderer Fokus auf MMP9 und Ovastacin gelegt, da es sich hier um limitierte, selektive Proteolyse handelt, nicht um komplette Degradation (Abb. 3.21, Abb. 3.26). Die Inkubation von jeweils 600 ng GARP_{TS} mit Meprin β (1 μ M, 37 °C) für verschiedene Zeitpunkte zeigt die Resistenz des Rezeptors gegen die Metalloprotease (Abb. 3.18).

Um eine proteolytische Aktivität des für die Aktivierung eingesetzten Trypsins auszuschließen wurde eine Inkubation mit 5 mM 1,10-Phenanthrolin durchgeführt. Die Aktivität von Meprin wurde separat mit einem fluoreogenen Substrat überprüft (nicht gezeigt). In keiner der Proben war eine Abnahme der Ausgangsintensität von GARP, oder das Erscheinen einer neuen Bande zu erkennen.

3.8.1. Degradierung von GARP

Im Gegensatz zu Meprin wird GARP_{TS} durch die Proteasen Neutrophile Elastase, Trypsin, Plasmin und MMP2 vielfach gespalten (Abb. 3.19). Dabei konnten für Neutrophile Elastase, Trypsin und Plasmin keine Fragmente im Silber gefärbten SDS-Gel detektiert werden. MMP2 degradierte die 3 μ g GARP_{TS} nicht komplett. Bei einer Inkubation einer größeren Menge GARP_{TS} (5 μ g) traten im Coomassie gefärbten SDS-Gel mehrere Abbaubanden im Bereich zwischen 60 und 35 kDa auf (6). Dabei konnten die Banden

Tabelle 3.3.:

Proteasescreening GARP_{TS}

Das Konstrukt GARP_{TS} wurde *in vitro* auf die Prozessierbarkeit durch die rechts angegebenen Proteasen getestet. Degradation ist durch ↓↓↓↓↓, limitierte Proteolyse durch ↓ und keine Prozessierbarkeit durch — gekennzeichnet.

PROTEASE	PROTEOLYSE
Trypsin	↓↓↓↓↓
Neutrophile Elastase	↓↓↓↓↓
Plasmin	↓↓↓↓↓
MMP2	↓↓↓↓↓
MMP9	↓
Ovastacin	↓
BMP1	—
Meprin α	—
Meprin β	—

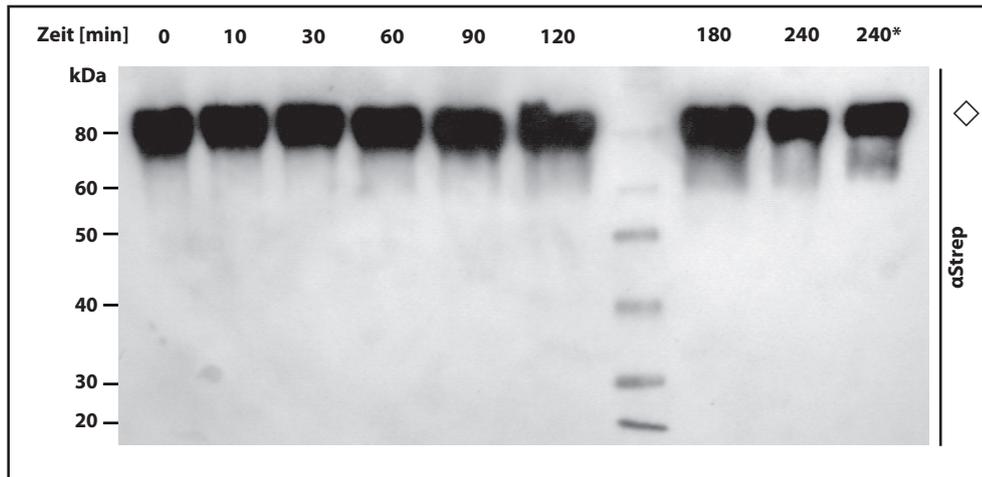


Abbildung 3.18.: Inkubation von GARP_{TS} und Meprin β

Pro Spur wurden 600 ng GARP_{TS} mit Meprin α (1 μM) bei 37 °C für die angegebene Dauer inkubiert. Die Proben wurden in einem 10%igem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Immundetektion erfolgte über einen αStrep-Antikörper. * = Inkubation mit 5 mM 1,10-Phenanthrolin. Full-length GARP_{TS} ist durch ein ◇ gekennzeichnet.

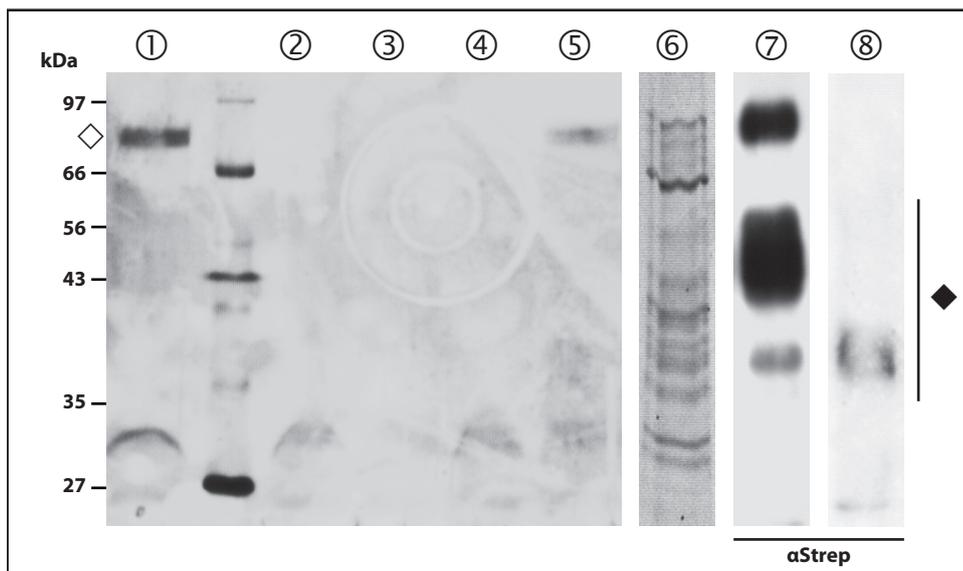


Abbildung 3.19.: Degradierung von GARP_{TS}

In Spur ① bis ⑤ wurden jeweils 3 μg GARP_{TS} mit den Proteasen (50 nM) Neutrophile Elaste ②, Trypsin ③, Plasmin ④ und MMP2 ⑤ über Nacht bei 37 °C inkubiert. In Spur ⑥ wurden 5 μg GARP_{TS} mit 20 nM MMP2 für 7 h bei 37 °C inkubiert. Die Probe nach dem Gellauf mit Coomassie gefärbt. In Spur ⑦ und ⑧ wurden 600 ng GARP_{TS} mit 20 nM ⑦ und 150 nM ⑧ nM MMP2 für 7 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung im SDS-Gel und danach der Transfer auf eine PVDF-Membran. Die Detektion erfolgte mit dem αStrep-Antikörper.

im Molekularbereich zwischen 60 und 43 kDa noch mit dem C-terminalen Strep-Tag spezifischen Antikörper detektiert werden (7) (◆). Durch eine Erhöhung der Proteasekonzentration auf 150 nM verschwanden diese Fragmente nahezu komplett (8). Lediglich ein Schatten auf der Höhe von circa 38 kDa wurde detektiert.

3.8.2. Die Prozessierung von GARP durch MMP9

Abbildung 3.20 zeigt das Ergebnis der *in vitro* Prozessierung von GARP_{TS} (600 ng) und MMP9 (50 nM, 37 °C). In A) ist zu erkennen, dass mit fortschreitender Inkubationsdauer die Bande des *full-length* GARP_{TS} verschwindet (◇) und dafür eine Doppelbande bei einer relativen Masse von circa 40–43 kDa erschien (◁). Durch Zugabe von 1,10-Phenanthrolin (5 mM) kann die Prozessierung des GARP-Rezeptors unterbunden werden. Die Untersuchung der gleichen Proben mit dem αHis-Antikörper zeigte bei kurzer Belichtungszeit lediglich den Verlust des Signals für den *full-length* GARP_{TS}. Bei längerer Entwicklungsdauer des Blots (C) erschienen jedoch ebenfalls Doppelbanden auf einer Höhe von 35–38 kDa (◀). Zu Beginn der Prozessierung traten noch weitere C-terminale Banden bei circa 60 kDa auf. Diese wurden aber mit der Zeit auch zu den prominenten 40–43 kDa Fragmenten prozessiert. Ein korrespondierendes N-terminales Fragment konnte nicht detektiert werden.

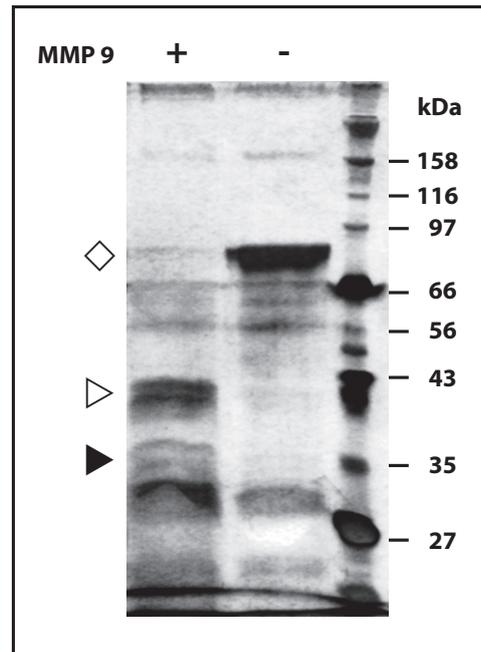


Abbildung 3.21.

Spaltung von GARP_{TS} durch MMP9 – Silberfärbung

5 µg GARP_{TS} wurden über Nacht mit (+) und ohne (-) MMP9 (50 nM) bei 37 °C inkubiert. Die Proteine wurden in einem 10 %igem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mit Silbernitrat gefärbt. *Full-length* GARP_{TS} ist durch ein ◇, die N-terminalen Fragmente durch ein ▷ und die C-terminalen Fragmente durch ein ▶ gekennzeichnet.

Durch die verwendeten Tag-Antikörper konnte zwischen N- und C-terminalen Fragmenten unterschieden werden. Die mit dem αHis-Antikörper detektierten Fragmente (Abb.

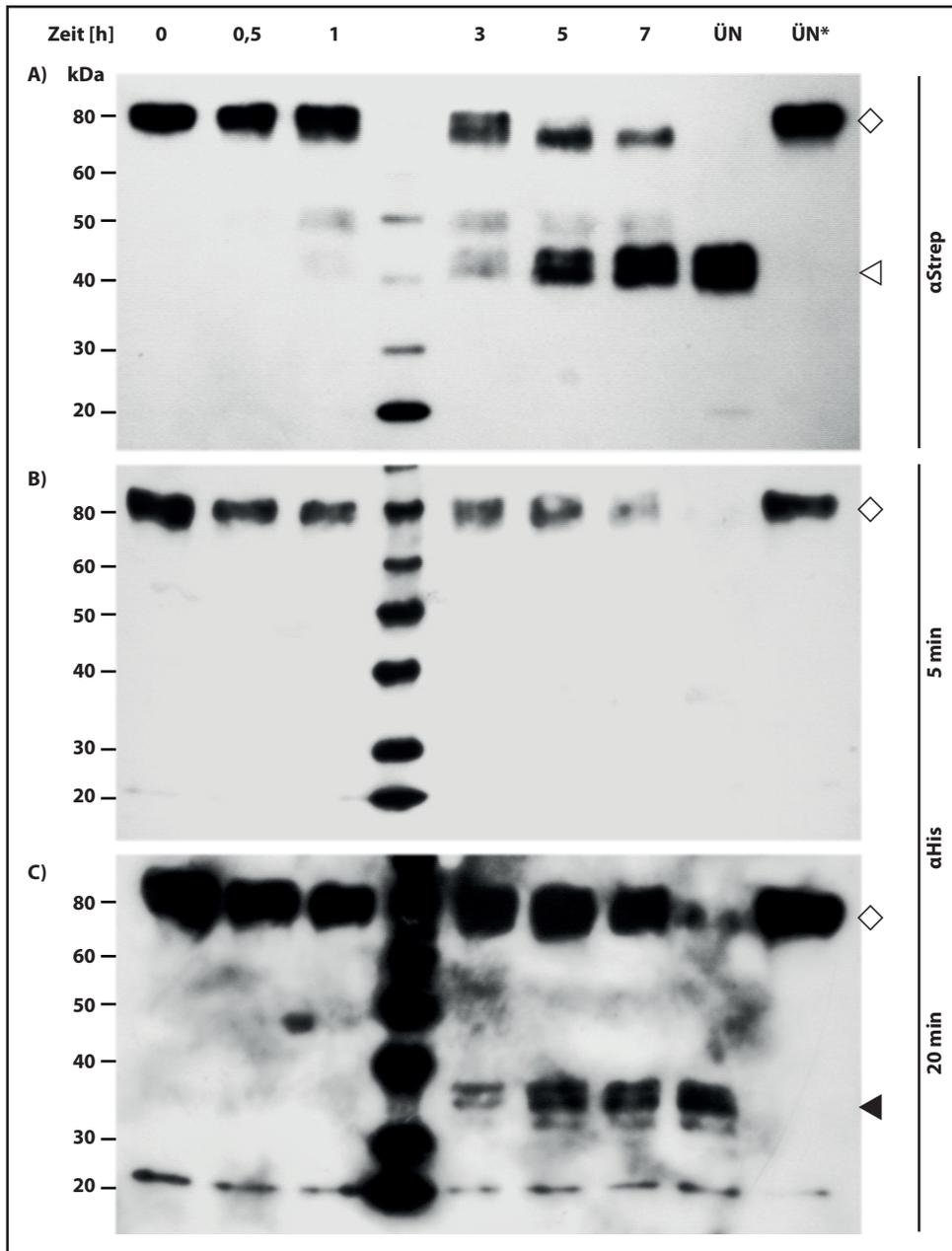


Abbildung 3.20.: Spaltung von GARP_{TS} durch MMP 9 – Immundetektion
 Pro Spur wurden 600 ng GARP_{TS} mit MMP9 (50 nM) bei 37 °C für die angegebene Dauer inkubiert. Die Proben wurden in einem 10 %igem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Immundetektion erfolgte über einen αStrep- (A), beziehungsweise αHis-Antikörper (B+C). Der mit dem αHis-Antikörper inkubierte Blot wurde einmal für 5 min (B) und einmal für 20 min (C) entwickelt. ÜN = Inkubation über Nacht, ÜN* = Inkubation über Nacht mit 5 mM 1,10-Phenanthrolin. *Full-length* GARP_{TS} ist durch ein ◇, die N-terminalen Fragmente durch ein ◁ und die C-terminalen Fragmente durch ein ◀ gekennzeichnet.

3.20 C) entsprachen hierbei N-terminalen und die in (Abb. 3.20 A) gezeigten Fragmente C-terminalen Spaltprodukten. Die Prozessierung von GARP in 2 Fragmente die jeweils als Doppelbande vorliegen implizierte, dass MMP9 an zwei benachbarten Stellen schneiden kann. Sobald es jedoch einmal geschnitten hat, könnte die andere Schnittstelle unzugänglich sein. Wäre sie weiter für die Protease zu erreichen, wären keine Doppelbanden zu detektieren, sondern es würden nur die kleineren Fragmente übrig bleiben. Eine weitere Erklärung für das Zustandekommen der Doppelbanden könnte eine unterschiedliche Glykosylierung sein. Dabei kann jedoch nicht die Gesamtanzahl der Glykosylierungen den Unterschied ausmachen, da der *full-length* GARP_{TS} als eine einzige homogene Bande vorliegt, sondern die Position der Glykosylierungsstellen. Unter der Annahme, dass es nur eine Schnittstelle für MMP9 gibt müsste eine Glykosylierungsstelle in Variante eins N-terminal und in der zweiten Variante C-terminal der Schnittstelle liegen. Bei einem Größenunterschied von 3 kDa pro Glykosylierungsstelle erscheint auch diese Erklärung möglich. Abbildung 3.22 zeigt schematisch die beiden möglichen Erklärungen des Zustandekommens der Doppelbanden.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob diese Fragmente auch ohne Antikörper im SDS-Gel sichtbar gemacht werden können. Dies war notwendig, um später die genaue Schnittstelle über Edman-Sequenzierung zu ermitteln. 5 µg GARP_{TS} wurden über Nacht mit MMP9 (50 nM, 37 °C) komplett geschnitten und im 10 %igem SDS-Gel aufgetrennt, sowie anschließend mit Silbernitrat gefärbt (Abb. 3.21). Die anschließende Edman-Sequenzierung lieferte wiederholt kein Ergebnis, da anscheinend der neo N-Terminus blockiert vorliegt. Eine solche Blockade könnte durch eine der vermuteten Glykosylierungsstellen gegeben sein (Abb. 3.22, B)

Nach 24 stündiger Inkubation mit MMP9 war die *full-length* GARP_{TS} Bande (◊) verschwunden. Dafür entstanden Doppelbanden mit relativen Molekülmassen von 40-43 kDa (▷) und 35-38 kDa (▶). Bei dem Konstrukt GARP_{TS} handelte es sich um eine lösliche Variante des GARP-Rezeptors. *In vivo* liegt der Rezeptor aber membrangebunden vor, was die Prozessierbarkeit beeinflussen könnte. Um zu untersuchen ob auch der membrangebundene GARP-Rezeptor von MMP9 prozessiert wird, wurden HEK 293H Zellen, die das Konstrukt GARP_{FL} stabil exprimieren auf 6-Well Platten ausgesät. Die Kontrollzellen wurden ohne MMP9, die anderen mit MMP9 (125 nM) für die angegebene Zeit inkubiert. Zellysate wurden wie unter 2.2.4 beschrieben hergestellt, im SDS-Gel aufgetrennt und mit dem αStrep-Antikörper detektiert (Abb. 3.23).

In den Kontrollzellen (Kontrolle) blieb die Signalintensität des GARP_{FL} Konstrukts bei circa 80 kDa unverändert (▷). Nach der Inkubation mit MMP9 (+ MMP9) trat nach circa einer Stunde ein C-terminales Fragment mit ungefähr 45 kDa auf, was dem oberen

Fragment der *in vitro* Prozessierung entsprach (Abb. 3.20). Nach fünfstündiger Inkubation verschwand sowohl das Signal des full-length Proteins und des C-terminalen Fragments. Vermutlich wurde der gesamte GARP abgebaut und das membrangebundene C-terminale Spaltprodukt endocytiziert und degradiert. Nach einer einstündigen der MMP2 Inkubation ist nur eine schwache Bande auf Höhe des kompletten GARP bei 80 kDa zu sehen. Diese Bande ist bei den Proben der drei und fünf Stundeninkubation nicht mehr sichtbar. Zudem sind keine C-terminalen Abbaubanden zu sehen. Bei den Serinproteasen zeigt die Neutrophile Elastase die geringste Aktivität. Hier ist ein Signal für den intakten GARP über den gesamten Zeitraum zu erkennen, wobei das Signal nach fünf Stunden deutlich schwächer ist. Bei allen drei Proteasen sind diverse Abbaubanden zu erkennen. Die Signale aus der Plasmin und Trypsin Inkubation zeigen beide ein starkes Signal nach einer Stunde und nur noch ein schwaches nach drei Stunden.

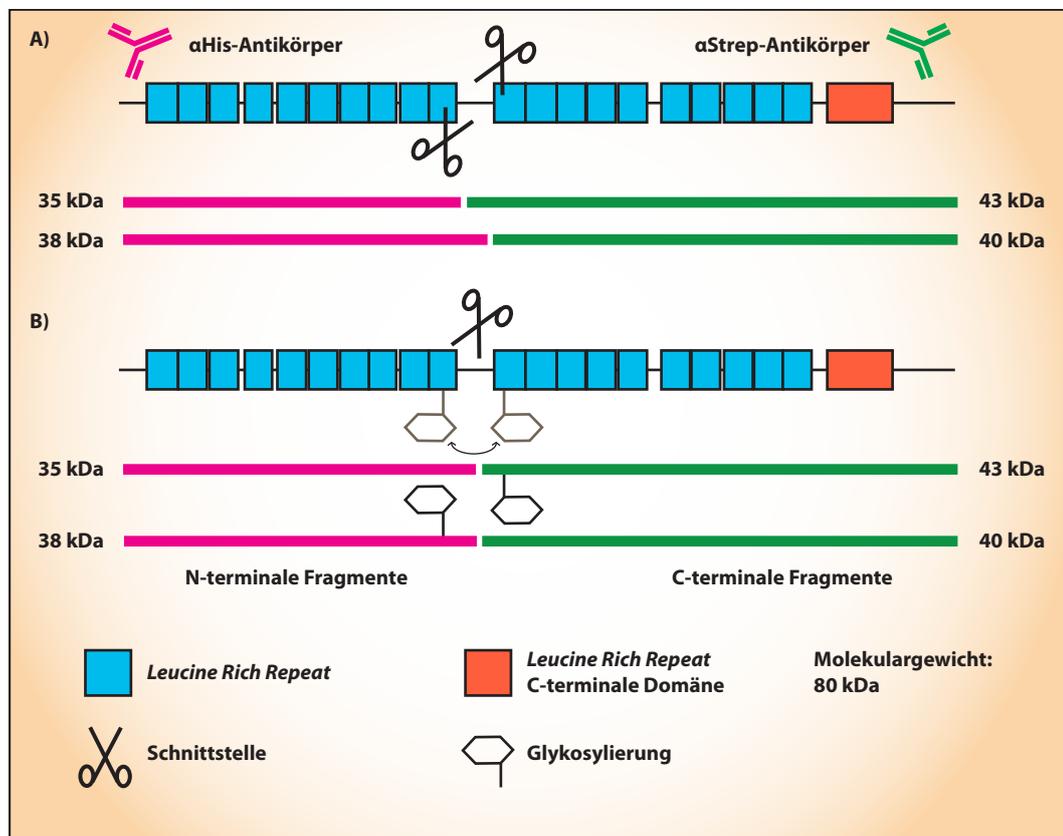


Abbildung 3.22.: **Schema der Fragmentierung von GARP_{TS} durch MMP9**

Schematische Darstellung der Fragmentierung von GARP_{TS} durch MMP9. A) GARP_{TS} wird zweimal in der prolinreichen Region geschnitten, sodass zwei unterschiedlich prozessierte Varianten entstehen können. B) MMP9 schneidet nur einmal aber der GARP_{TS} kann sowohl C- als auch N-terminal der Schnittstelle glykosyliert sein.

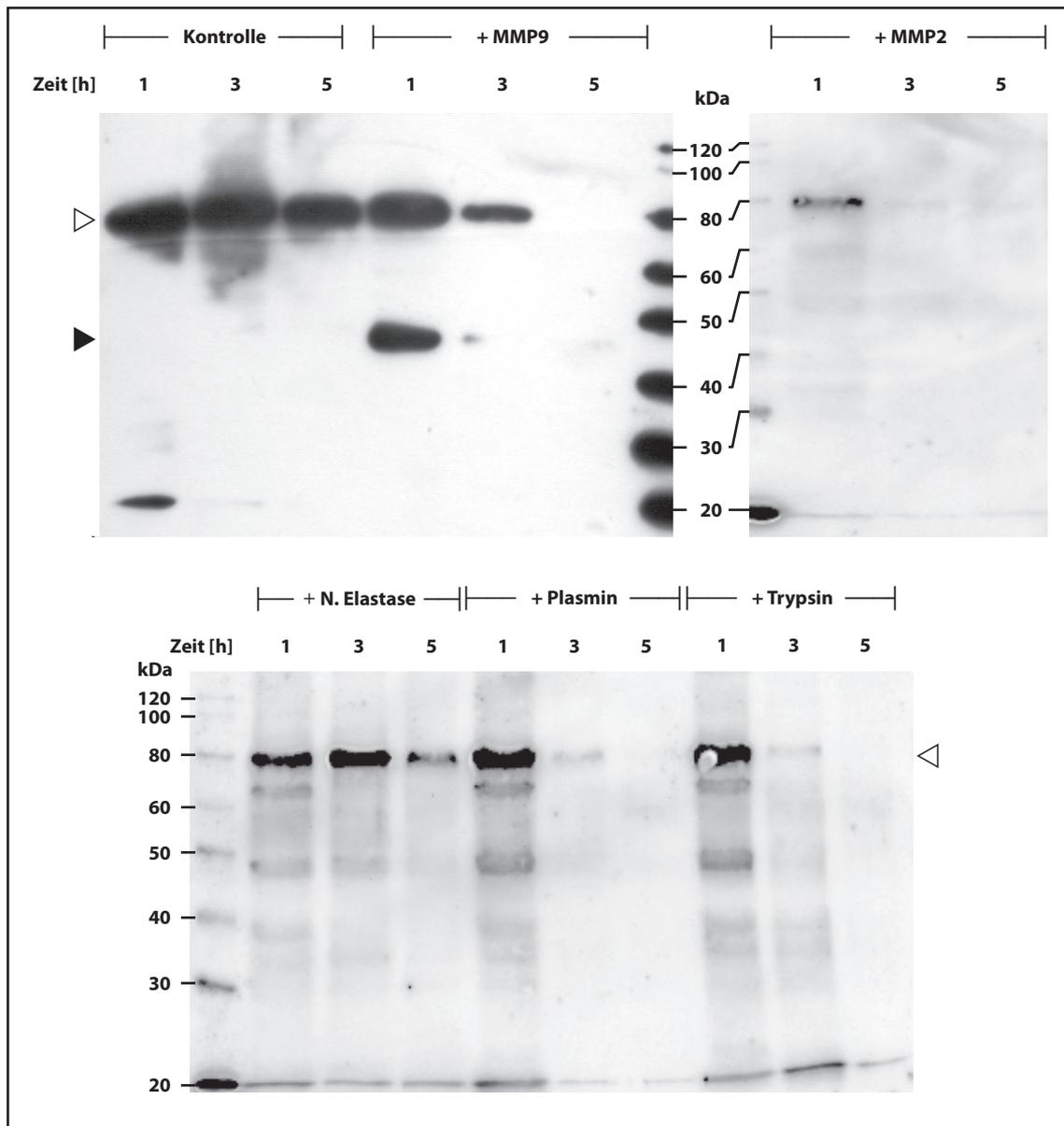


Abbildung 3.23.: Spaltung von GARP_{FL} in HEK 293H Zellen durch MMP9, MMP2, Neutrophile Elastase, Plasmin und Trypsin

GARP_{FL} überexprimierende HEK293H Zellen wurden mit den Proteasen MMP9, MMP2, Neutrophile Elastase (N. Elastase), Plasmin oder Trypsin; je 125 nm, sowie ohne Protease (Kontrolle) für ein bis fünf Stunden inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss lysiert und die Proteine im 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proben auf eine PVDF-Membran übertragen und mit dem α Strep-Antikörper detektiert. Full-length GARP_{FL} ist mit dem ▷, das prozessierte C-terminale Fragment mit ◀ gekennzeichnet.

3.8.3. Prozessierung des GARP–TGF– β Komplexes durch MMP9

Da GARP *in vivo* mit TGF– β coexprimiert wird und dabei sowohl latentes, als auch ProTGF– β kovalent bindet (WANG ET AL. 2012), sollte im nächsten Schritt untersucht werden ob MMP9 auch in der Lage ist, diesen GARP–TGF– β Komplex zu schneiden. Dazu wurden wie unter 3.7 beschrieben GARP_{TS} und TGF– β _{Strep} kovalent gekoppelt und anschließend mit MMP9 prozessiert. Die Proben wurden im 7,5 %igem SDS–Gel aufgetrennt und auf eine PVDF–Membran transferiert. Anschließend erfolgte die Immundetektion mit den Tag–Antikörpern α Strep (GARP_{TS} C–terminus, sowie simultan das TGF– β _{Strep} Konstrukt) und α His (nur GARP_{TS} N–terminus) (Abb. 3.24).

Die mit den beiden Tag–Antikörpern behandelten Membranen zeigten ein identisches Bild. Die Signalstärke war jedoch bei der mit dem α Strep–Antikörper behandeltem Membran generell stärker. Zur besseren Übersicht wurde für die Abbildung nur der Massenbereich über 100 kDa gewählt. Hier sind nur die im Komplex vorliegenden GARP und TGF– β Proteine zu sehen. Daher sind die Kontrollspuren, in denen nur GARP oder TGF– β alleine vorliegen leer. Wurden beide Proteine zusammen im Redoxpuffer aus 2 mM Cystein und 0,5 mM oxidiertem Gluthation vorinkubiert bildet sich eine charakte-

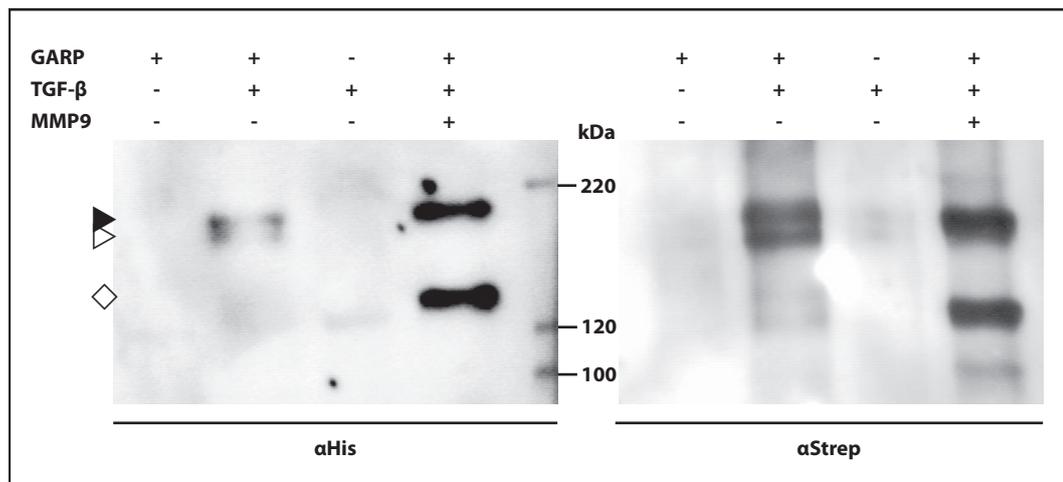
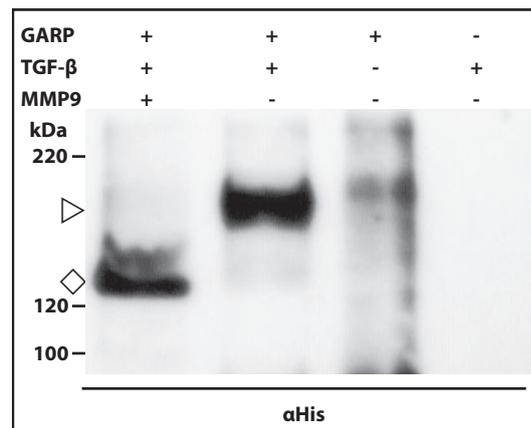


Abbildung 3.24.: **Spaltung des GARP TGF– β Komplexes durch MMP 9**

Pro Spur wurden 600 ng GARP_{TS}, 300 ng TGF– β _{Strep} oder der Disulfid–gekoppelte Komplex aus beiden Proteinen mit oder ohne MMP9 (50 nM) bei 37 °C über Nacht verdaut. Die Proben wurden in einem 7,5 %igem SDS–Gel unter nicht–reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF–Membran übertragen. Die Immundetektion erfolgte über einen α Strep– (links), beziehungsweise α His–Antikörper (rechts). Das schwarze, beziehungsweise weiße Dreieck, markieren den Komplex aus GARP mit Pro–(►), beziehungsweise latentem TGF– β (▷). Der von MMP9 prozessierte Komplex aus GARP und latentem TGF– β ist mit \diamond gekennzeichnet.

Abbildung 3.25.: Spaltung des Komplexes aus latentem TGF- β und GARP durch MMP9

Pro Spur wurden 600 ng GARP_{TS}, 300 ng latentes TGF- β _{strep} oder der Disulfid-gekoppelte Komplex aus beiden Proteinen mit oder ohne MMP9 (50 nM) bei 37 °C über Nacht verdaut. Die Proben wurden in einem 7,5 %igem SDS-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Immundetektion erfolgte über einen α His-Antikörper. Das \triangleright markiert den Komplex aus GARP mit latentem TGF- β . Der von MMP9 prozessierte Komplex aus GARP und latentem TGF- β ist mit \diamond gekennzeichnet.



ristische Doppelbande wie in Abbildung 3.17, rechts gezeigt. Durch Prozessierung der Komplexe mit MMP9 verschwand die obere der beiden Banden. Stattdessen erschien ein zusätzliches Signal auf einer Höhe von ungefähr 130 kDa.

Da die vorigen Untersuchungen nahe legen, dass nur der Komplex aus GARP und latentem TGF- β , nicht aber der von GARP und ProTGF- β von MMP9 geschnitten werden kann, wurde ein weiterer Prozessierungsversuch durchgeführt. Vor der Kopplung von GARP und TGF- β wurde das TGF- β durch Furin komplett in die latente Form überführt (2.4.6). Danach erfolgte wie im vorigen Versuch die Kopplung an GARP und anschließende Spaltung des Komplexes durch MMP9.

In Abbildung 3.25 ist zu erkennen, dass sich bei Kopplung von ausschließlich latentem TGF- β lediglich eine Bande im hochmolekularen Bereich bildet (\triangleright). Diese Bande wird auch im Zuge der MMP9 Prozessierung komplett in die bereits in Abbildung 3.24 gezeigte Bande umgewandelt (\diamond).

3.8.4. Prozessierung von GARP durch Ovastacin

Da eine erhöhte Menge an Ovastacin mRNA in stimulierten T-Zellen (naiv und regulatorisch) detektiert wurde (Abb. 3.3), sollte auch diese Protease auf ihre Fähigkeit, GARP zu schneiden, getestet werden. Das zur Verfügung stehende Ovastacin besitzt lediglich eine geringe Halbwertszeit, sodass es zeitlich nur begrenzt aktiv ist. Daher wurden zwei Ansätze verfolgt um eine Prozessierung von GARP zu untersuchen. Zum einen wurden identische Versuchsbedingungen wie bei den bereits vorgestellten Proteasen verwendet (600 ng GARP_{TS} und 50 nM aktive Protease, Abb. 3.26 A). Zum anderen sollte

eine komplette Umsetzung des Substrates GARP_{TS} erreicht werden, wozu die Substratmenge auf 300 ng reduziert und die Proteasekonzentration auf 100 nM erhöht wurde (Abb. 3.26 B). Im ersten Ansatz (Abb. 3.26 A) ist zu erkennen, dass bei fortschreitender Inkubationsdauer sowohl mit dem N-terminal bindenden αHis - als auch mit dem C-terminal bindenden αStrep -Antikörper neue Banden detektiert werden können. Dabei lief das N-terminale Fragment entsprechend einer Masse von circa 20 kDa, wogegen das C-terminale eine relative Masse von circa 60 kDa aufwies. Durch Erhöhung der Proteasekonzentration und Verringerung der Substratmenge konnte auch mit Ovastacin eine komplette Umsetzung von GARP_{TS} innerhalb von 2 Stunden erreicht werden (Abb. 3.26 B). Durch Zugabe des Metalloprotease Inhibitors 1,10-Phenanthrolin wurde die Prozessierung von GARP_{TS} durch Ovastacin unterbunden.

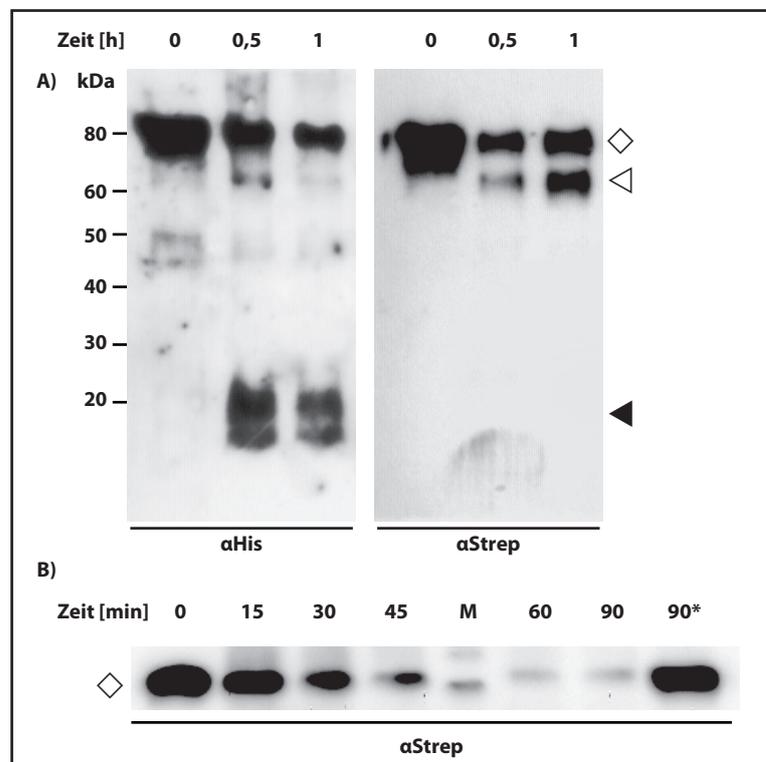


Abbildung 3.26.: Spaltung von GARP_{TS} durch Ovastacin

A) Pro Spur wurden 600 ng GARP_{TS} und circa 50 nM aktives Ovastacin (Plasmin aktiviert) bei 37 °C für die angegebene Dauer inkubiert. Die Proben wurden in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Immundetektion erfolgte über einen αStrep - (rechts), beziehungsweise αHis -Antikörper (links). *Full-length* GARP_{TS} wird durch ein \diamond , N-terminale Fragmente durch ein \blacktriangleleft und C-terminale Fragmente durch ein \triangleright gekennzeichnet. **B)** Vollständige Umsetzung des GARP_{TS} durch die Inkubation von 300 ng GARP_{TS} in ca. 100 nM aktivem Ovastacin (Plasmin aktiviert). Die Proben wurden wie unter A beschrieben aufbereitet und mit dem αStrep -Antikörper detektiert.

3.9. Einfluss von GARP und TGF- β auf die Zellproliferation

TGF- β hemmt über den SMAD Signalweg *in vivo* die meisten Immunzellen an der Proliferation und ist in der Lage in naiven T-Zellen einen regulatorischen Phänotyp zu induzieren. Eine Möglichkeit die Aktivität von TGF- β *in vitro* zu messen ist, die Proliferation von Mv1Lu Zellen zu untersuchen. Diese Zellen verbleiben bei aktivem SMAD Signal in der G1 Phase und stoppen ihre Proliferation (WU ET AL. 1996).

Zuerst wurden Mv1Lu Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an latentem TGF- β_{Strep} für 48 h inkubiert. Abbildung 3.27 zeigt das Ergebnis des Proliferationsassays, welcher durch eine Methylenblau-Färbung nach FINLAY ET AL. (1984) bestimmt wurde. Bei hohen Konzentrationen an latentem TGF- β von 500 ng/ml und 250 ng/ml konnte keine Proliferation mehr festgestellt werden. Im Gegenteil, die Zellen starben und lösten sich von der Zellkulturschale ab. Bei TGF- β Konzentrationen von 100 ng/ml und 50 ng/ml war eine signifikante Reduktion der Proliferation der Mv1Lu Zellen zu erkennen. Im Gegensatz dazu konnte bei einer Konzentration von 25 ng/ml latentem TGF- β keine signifikante Änderung der Proliferationsrate festgestellt werden.

In folgendem Versuch sollte getestet werden ob sich GARP_{TS} ebenfalls negativ auf

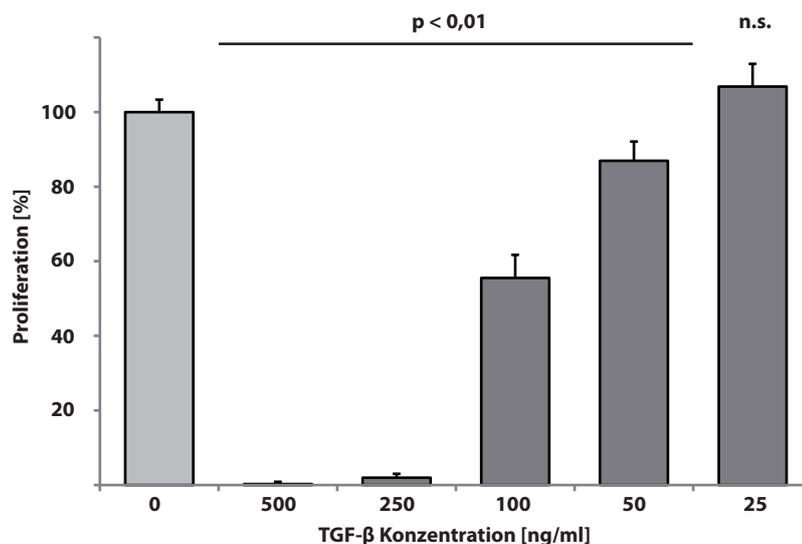


Abbildung 3.27.: Einfluss von TGF- β auf die Mv1Lu-Zellproliferation

$2,5 \cdot 10^4$ Mv1Lu Zellen wurden für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen an latentem TGF- β_{Strep} (dunkelgrau) oder ohne TGF- β_{Strep} (hellgrau) inkubiert. Anschließend wurde die Zellproliferation über eine Methylenblaufärbung nach FINLAY ET AL. (1984) quantifiziert. Signifikanzwerte beziehen sich auf die Negativkontrolle (hellgrau).

die Zellproliferation von Mv1Lu Zellen auswirkt. Dazu wurden die Zellen mit GARP-Konzentrationen von 200 ng/ml, 400 ng/ml und 800 ng/ml inkubiert und anschließend die Proliferationsrate bestimmt. Abbildung 3.28 zeigt, dass erst ab einer Konzentration oberhalb von 400 ng/ml GARP_{TS} eine signifikante Abnahme der Zellproliferation zu beobachten ist.

In vivo liegt GARP stets an latentes TGF- β gekoppelt vor, wodurch die Aktivierbarkeit des Wachstumsfaktors erhöht wird (WANG ET AL. 2012). Jedoch war es in dieser Studie nicht möglich, diesen Effekt mit einer löslichen GARP Variante zu erzielen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit 60 ng/ml latentes TGF- β über Nacht nicht kovalent mit verschiedenen GARP_{TS} Konzentrationen gekoppelt. Anschließend wurden die Komplexe auf die Zellen gegeben und 48 h später die Proliferation bestimmt (Abb. 3.29). Die Inkubation der Zellen mit 60 ng/ml latentem TGF- β führt in dieser Versuchsreihe nur zu einer milden, hier nicht signifikanten, Reduktion der Proliferationsrate. Wird das latente TGF- β jedoch zuvor an GARP gebunden kann eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate bis zu einer Kombination von 60 ng/ml TGF- β und 15 ng/ml GARP_{TS} beobachtet werden. Im Ansatz mit 60 ng/ml TGF- β und 10 ng/ml GARP_{TS} ist keine signifikante Änderung der Proliferation zu sehen.

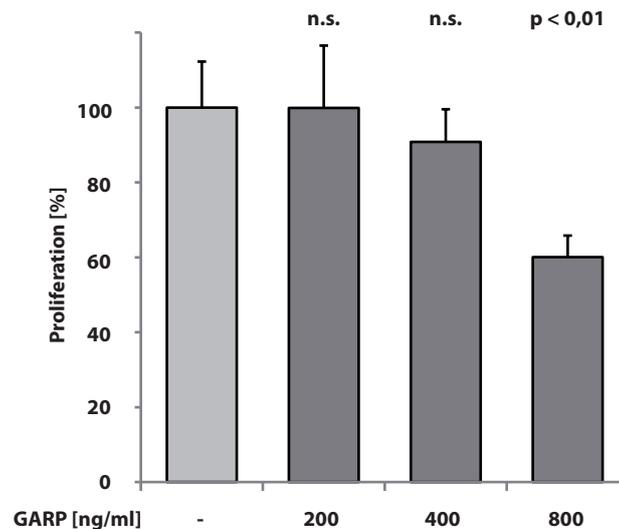


Abbildung 3.28.: **Einfluss von GARP auf die Mv1Lu-Zellproliferation**

$2,5 \cdot 10^4$ Mv1Lu Zellen wurden für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen an GARP_{TS} (dunkelgrau) oder ohne GARP_{TS} (hellgrau) inkubiert. Anschließend wurde die Zellproliferation über eine Methylenblaufärbung nach FINLAY ET AL. (1984) quantifiziert. Signifikanzwerte beziehen sich auf die Positivkontrolle (hellgrau).

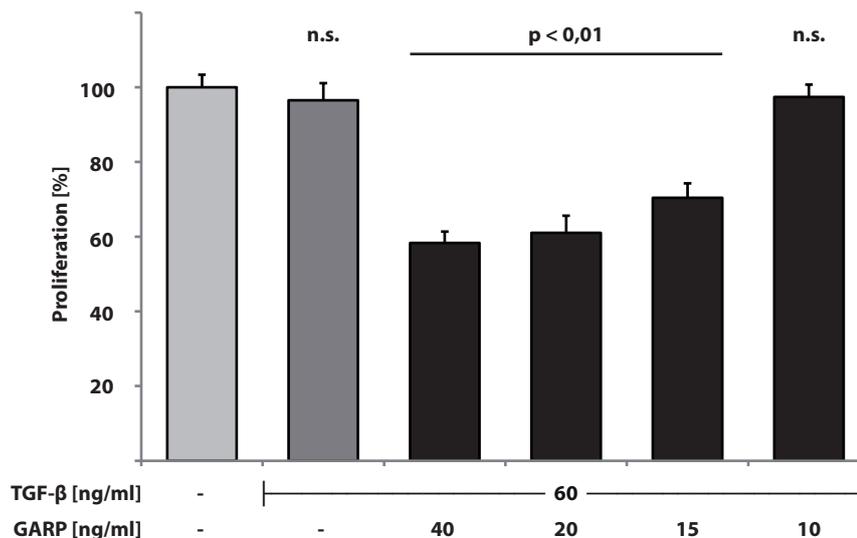


Abbildung 3.29.: **Einfluss von GARP auf die TGF- β Aktivität**

$2,5 \cdot 10^4$ Mv1Lu Zellen wurden für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen an latentem TGF- β_{Strep} (dunkelgrau) oder ohne TGF- β (hellgrau) inkubiert. Das TGF- β_{Strep} wurde zuvor für mindestens 4 h bei RT mit GARP_{TS} in verschiedenen Konzentrationen inkubiert (schwarz). Anschließend wurde die Zellproliferation über eine Methylenblaufärbung nach FINLAY ET AL. (1984) quantifiziert. Signifikanzwerte beziehen sich auf die Positivkontrolle (hellgrau).

Aus den vorigen Versuchen ergab sich die Frage, warum der in dieser Arbeit verwendete lösliche GARP in der Lage ist die Aktivierung von TGF- β zu steigern, während dieses bei Wang et al. (2012) nicht der Fall war. Ein Grund hierfür könnte sein, dass bei Wang et al. (2012) coexprimierte GARP-TGF- β Komplexe genutzt wurden, die ausschließlich kovalent verbunden sind. Um dies zu überprüfen wurden TGF- β_{Strep} und GARP_{TS} kovalent über Disulfidbrücken (Redoxpuffer) miteinander verknüpft. TGF- β_{Strep} wurde entweder alleine (weiß) oder zusammen mit GARP_{TS} in verschiedenen Konzentrationen in kovalent (schwarz) oder nicht kovalent (dunkelgrau) gebundener Form auf die Zellen gegeben und anschließend die Proliferationsrate bestimmt. Abbildung 3.30 zeigt das Ergebnis des Experiments. Die Inkubation der Zellen mit TGF- β alleine zeigte eine leichte Reduktion der Proliferation. Die Zugabe von GARP_{TS} in nicht kovalent gebundener Form erniedrigte die Proliferationsrate wie bereits in Abbildung 3.29 gezeigt. Wurde aber GARP kovalent, bedingt durch den verwendeten Redoxpuffer an das TGF- β gekoppelt, so verschwand der Effekt der Aktivitätssteigerung im Fall von 60 ng/ml TGF- β_{Strep} und 30 ng/ml GARP_{TS} komplett, oder war bei der Konzentration von 120 ng/ml TGF- β_{Strep} und 60 ng/ml GARP_{TS} weniger stark ausgeprägt. Der Redoxpuffer alleine hatte keine Auswirkungen auf die Mv1Lu-Zellproliferation.

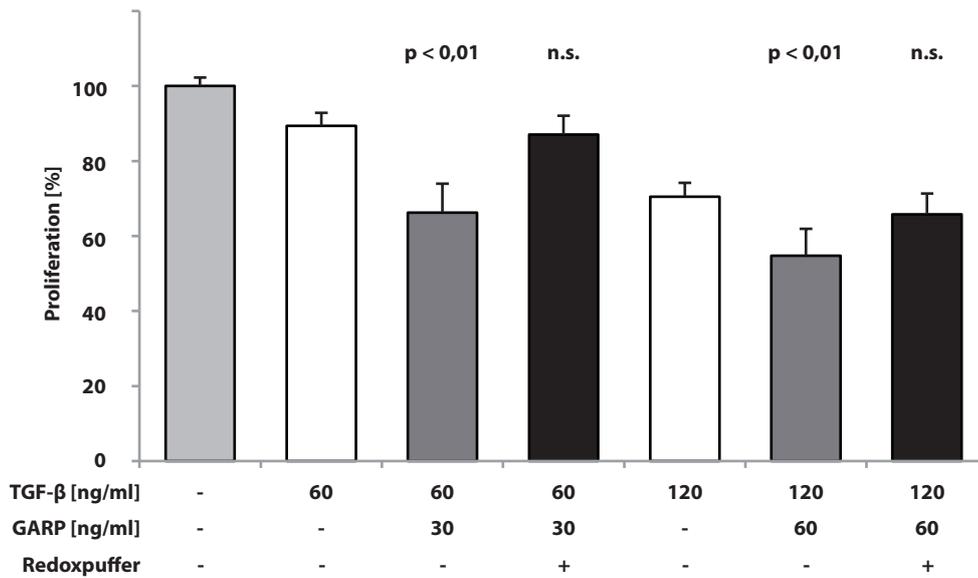


Abbildung 3.30.: **Einfluss der kovalenten Bindung von TGF-β an GARP auf die Mv1Lu-Zellproliferation**

2,5 · 10⁴ Mv1Lu Zellen wurden für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen an latentem TGF-β_{Strep} und GARP_{TS} oder ohne (hellgrau) inkubiert. Das TGF-β_{Strep} wurde entweder alleine (weiß) oder in Kombination mit GARP, welches für mindestens 4 h bei RT mit TGF-β_{Strep} inkubiert wurde, auf die Zellen gegeben. Dabei fand die die Bindung der beiden Proteine entweder in Abwesenheit (dunkelgrau) oder Anwesenheit eines Redoxpuffers (schwarz) statt. Dadurch lag das TGF-β_{Strep} entweder kovalent (Redoxpuffer) oder nicht kovalent gebunden am GARP vor. Anschließend wurde die Zellproliferation über eine Methylenblaufärbung nach FINLAY ET AL. (1984) quantifiziert. Signifikanzwerte beziehen sich auf die jeweilige TGF-β Kontrolle (weiß).

3.9.1. Auswirkung der Proteolyse von GARP auf die Aktivierbarkeit von TGF-β

Unter Abschnitt 3.8 konnte gezeigt werden, dass die Serinproteasen Neutrophile Elastase, Plasmin und Trypsin, sowie die Metalloprotease MMP2 in der Lage sind GARP, in kleine Fragmente zu degradieren. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Spaltung zu einem Funktionsverlust von GARP führt. Dies war nur für die Serinproteasen möglich, da das APMA aktivierte MMP2 und MMP9 selbst einen großen Einfluss auf die Zellproliferation hat (nicht gezeigt) (YU UND STAMENKOVIC 2000). Abbildung 3.31 zeigt das Ergebnis dieser Proliferationsuntersuchungen. Die Proliferation der Mv1Lu Zellen wurde wie bereits zuvor gezeigt durch die Zugabe von 60 ng/ml TGF-β leicht vermindert (weiß). Wie zuvor in Abbildung 3.29 gezeigt führt eine Coinkubation von 60 ng/ml TGF-β und 30 ng/ml GARP zu einer weiteren Verminderung der Proliferati-

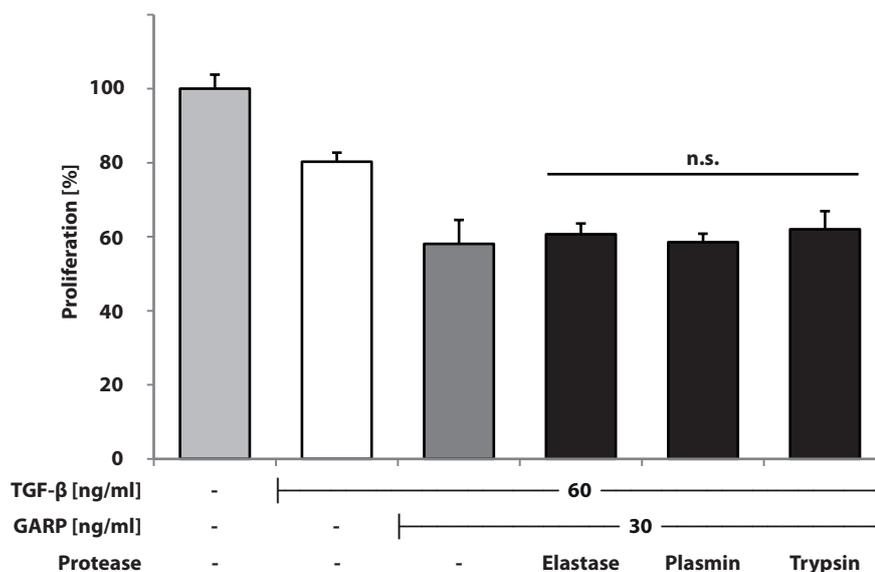


Abbildung 3.31.: Einfluss der Spaltung von GARP auf die Aktivierbarkeit von TGF- β

$2,5 \cdot 10^4$ Mv1Lu Zellen wurden für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen an latentem TGF- β_{Strep} allein (weiß) oder zusammen mit prozessiertem (schwarz) oder unprozessiertem GARP_{TS} (dunkelgrau) inkubiert. Das TGF- β_{Strep} wurde für mindestens 4 h bei RT mit GARP inkubiert. Unbehandelte Mv1Lu Zellen dienen dabei als Kontrolle (hellgrau). Anschließend wurde die Zellproliferation über eine Methylenblaufärbung nach FINLAY ET AL. (1984) quantifiziert. Signifikanzwerte beziehen sich auf die Probe aus unprozessiertem GARP und TGF- β (dunkelgrau).

onsrate (dunkelgrau). Wurden anstatt intaktem GARP, gespaltene, niedermolekulare GARP Fragmente mit TGF- β vorinkubiert, so zeigte sich ebenfalls eine Inhibition der Proliferation, die sich nicht signifikant von den Werten mit intaktem GARP unterschieden. Die Proteasen alleine änderten die Proliferationsrate der Zellen nicht (Abbildung C.1, Anhang Seite 145).

Auch die direkte Wirkung von degradiertem GARP auf die Mv1Lu Zellproliferation wurde untersucht. Dazu wurde GARP in hoher Konzentration (800 ng/ml) alleine auf die Zielzellen gegeben (Abbildung 3.32, dunkelgrau). Dies führte bei nativem GARP zu einer Reduzierung der Zellproliferation auch ohne die zusätzliche Zugabe von TGF- β (Abb. 3.28). Wurden das Konstrukt GARP_{TS} zuvor mit den Proteasen Neutrophile Elastase, Plasmin und Trypsin gespalten und die Fragmente ebenfalls mit einer Endkonzentration von 800 ng/ml auf die Mv1Lu Zellen gegeben, so zeigte sich immer noch eine verminderte Proliferationsrate (schwarz). Dieses Ergebnis ähnelt jenem in Abbildung 3.31, wo ebenfalls ein Effekt mit degradiertem GARP_{TS} erzielt wurde, der zuvor mit intaktem

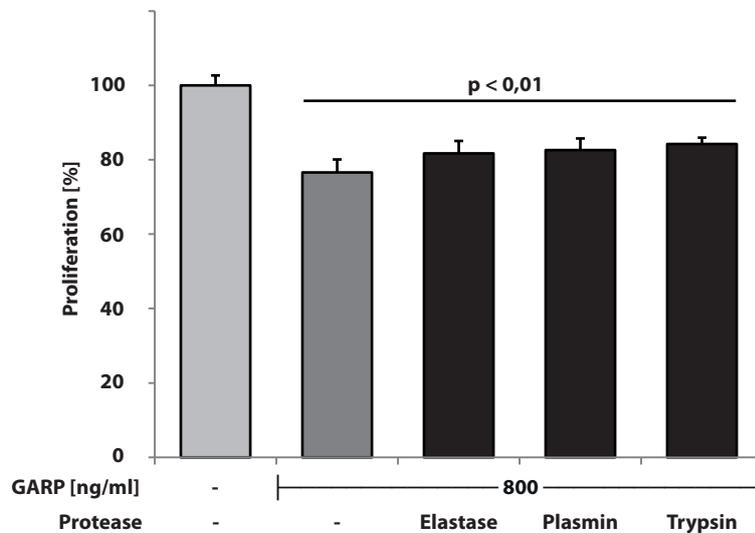


Abbildung 3.32.: **Einfluss der Spaltung von GARP auf die Mv1Lu-Zellproliferation**

$2,5 \cdot 10^4$ Mv1Lu Zellen wurden für 48 h mit oder ohne (hellgrau) 800 ng/ml GARP_{TS} inkubiert. Der GARP_{TS} wurde entweder komplett (dunkelgrau) oder durch die angegebenen Proteasen degradiert (schwarz) auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde die Zellproliferation über eine Methylenblaufärbung nach FINLAY ET AL. (1984) quantifiziert. Signifikanzwerte beziehen sich auf die Negativkontrolle (hellgrau).

GARP_{TS} zu beobachten war. Jedoch ist auch zu erkennen, dass die Verminderung der Proliferationsrate bei degradiertem GARP_{TS} nicht ganz das Niveau der intakten Kontrolle erreicht (dunkelgrau).

Wie in Abschnitt 4.5.2 und 4.5.3 gezeigt, sind die Proteasen MMP9 und Ovastacin in der Lage GARP spezifisch zu spalten. Wegen des oben schon erwähnten Einflusses von MMP9 auf den Zellstoffwechsel, konnten die direkt behandelten Proben Proben nicht im Proliferationsassay eingesetzt werden. Daher wurde das N-terminale Fragment über magnetische Ni-NTA Affinitätskügelchen isoliert (2.4.9). Das N-terminale Fragment wurde in equimolaren Konzentrationen wie das *full-length* GARP mit TGF- β inkubiert und für 48 h auf die Mv1Lu Zellen gegeben. Das Ergebnis des Proliferationsassays ist in Abbildung 3.33 zu sehen. Wie in den vorherigen Versuchen verringerte eine TGF- β Konzentration von 60 ng/ml die Proliferation um circa 20 %. Eine Vorinkubation mit 30 ng/ml ($\hat{=}$ 0,35 nM) verringert die Proliferationsrate um weitere 20 %. Dies war nicht der Fall, wenn statt dem *full-length* GARP lediglich die isolierte N-terminale Sequenz in gleicher molarer Konzentration, 11 ng/ml $\hat{=}$ 0,35 nM, mit TGF- β vorinkubiert wurde.

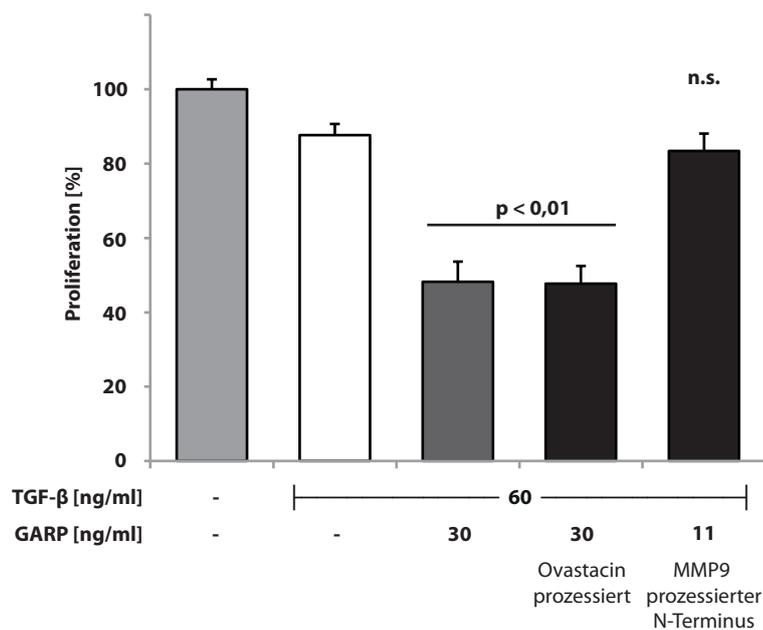


Abbildung 3.33.: Einfluss des GARP N-terminus auf die Aktivierbarkeit von TGF- β

$2,5 \cdot 10^4$ Mv1Lu Zellen wurden für 48 h mit (weiß) oder ohne (hellgrau) 60 ng/ml latentem TGF- β inkubiert. Das TGF- β wurde zuvor mit 30 ng/ml GARP_{TS} (dunkelgrau) alleine, geschnitten durch 50 mM Ovastacin oder einer equimolaren Menge (11 ng/ml) MMP9 prozessiertem GARP N-terminus (schwarz) inkubiert. Anschließend wurde die Zellproliferation über eine Methylenblaufärbung nach FINLAY ET AL. (1984) quantifiziert. Signifikanzwerte beziehen sich auf die TGF- β Kontrolle (weiß).

Wurde GARP anstatt von MMP9 mit Ovastacin prozessiert zeigte sich ein anderes Ergebnis (Abb. 3.33). Trotz der Spaltung von GARP durch Ovastacin zeigte sich eine ähnliche Aktivitätssteigerung von TGF- β und somit eine Inhibition der Mv1Lu-Zellproliferation wie sie mit dem *full-length* GARP erzielt werden konnte.

4. Diskussion

Der TGF- β Signalweg ist an der Steuerung verschiedenster biologischer Prozesse beteiligt. Die Regulation erfolgt dabei auf verschiedenen Ebenen. Im Fall der immunologischen Homöostase liegt TGF- β an der Oberfläche von T_{Regs} gebunden vor. Als Adapterprotein fungiert GARP, ein Protein der LRR-Familie. Von anderen TGF- β Adapterproteinen ist bekannt, dass sie von Proteasen geschnitten werden und so die TGF- β Signalstärke variiert werden kann. Ob eine Regulation des TGF- β Signalwegs über Proteolyse von GARP stattfindet war bisher nicht bekannt und wurde in dieser Arbeit näher untersucht.

4.1. Bioinformatische Charakterisierung von GARP

4.1.1. GARP evolvierte simultan mit dem adaptiven Immunsystem

Die Datenbanksuche ergab, dass ein GARP-Gen ausschließlich in Vertebratengenomen zu finden ist. Eine Ausnahme ist das Neunauge (*Petromyzon marinus*), in dessen Genom kein GARP-Gen identifiziert werden konnte. Dies ist insofern von Bedeutung, da das adaptive Immunsystem der Agnathen im Vergleich mit jenem der kiefertragenden Wirbeltiere noch sehr rudimentär entwickelt ist. Bei den Neunaugen erfolgt die Erkennung von Fremdantigenen nicht über MHC, B- und T-Zellrezeptoren, die aus Immunglobulin-ähnlichen Domänen aufgebaut sind, sondern aus variablen Lymphocyten Rezeptoren (VLR), die, ähnlich wie GARP, aus LRRs bestehen (Überblick in (RAST UND BUCKLEY 2013)). Dies zeigt, dass es sich bei GARP um einen relativ jungen Spross einer sehr alten Proteinfamilie handelt. Im erst kürzlich entschlüsselten Genom der Pflughnasenchimäre (*Callorhinchus milii*) konnte, wenn auch nicht die gesamte cDNA des GARP-Gens, das dritte Exon mit den Sequenzabschnitten für die Ektodomänen und die Transmembrandomäne gefunden werden. Es befindet sich im contig 42911 im Bereich 2641 bis 4596. Es konnten alle GARP-spezifischen Merkmale, wie Anzahl der LRRs, die prolinreiche Region und der Cystein-loop nachgewiesen werden, wobei letzterer um 20

Aminosäuren verlängert ist (Tabelle B.4, Anhang Seite 144). Somit kann die Entstehung des GARP-Gens auf einen relativ engen Zeitraum zwischen 500 und 420 Millionen Jahren datiert werden. Da es sich bei dem Genom der Pflughnasenchimären um das am langsamsten evolvierte Vertebratengenom handelt (VENKATESH ET AL. 2014), dürfte der GARP-Aufbau dieses Tieres am ehesten dem des „Ur-GARPs“ entsprechen. Interessanterweise konnten andere spezifische Marker der adaptiven Immunantwort, bzw. seiner Regulation wie CD4, IL-4, -5, -9, -13, -21 und FoxP3 nicht nachgewiesen werden (VENKATESH ET AL. 2014). Dies impliziert, dass GARP ein basales Element in der Maschinerie der adaptiven Immunantwort darstellt und schon vor vielen anderen Elementen vorhanden war. Da die VLRs den Knorpelfischen bereits fehlen, besteht die Möglichkeit, dass sie oder ein anderer gemeinsamer Vorläufer der Ursprung des GARP-Gens ist. Das GARP-Gen könnte aus einer Rekombination eines dieser Gene hervorgegangen sein. Dies würde erklären, warum GARP eine einzigartige Domänenzusammensetzung besitzt. Als nächste Verwandte wurden in 3.1.1 die Membranproteine LRRC33, sowie die Toll-ähnlichen Rezeptoren 8 und 9 identifiziert. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrem Domänenaufbau und ihrer Funktionalität. Die einzige, erst kürzlich beschriebene Funktion des LRRC 33 besteht darin, an andere Toll-ähnliche Rezeptoren zu binden und ihre Signalwirkung zu modulieren (LIU ET AL. 2013). Die Toll-ähnlichen Rezeptoren 8 und 9 sind als endosomale Rezeptoren dazu in der Lage, fremde DNA und RNA Moleküle zu binden und so ein proinflammatorisches Signal auszulösen (HE ET AL. 2013). Für GARP konnte weder die Interaktion mit anderen Toll-ähnlichen Rezeptoren noch eine Bindungsaffinität zu Nukleinsäuren nachgewiesen werden.

Dass GARP nicht in allen untersuchten Spezies gefunden werden konnte, kann damit erklärt werden, dass nicht alle Genome bisher vollständig sequenziert wurden. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass in diesen Fällen GARP auf einem noch nicht sequenzierten Genomabschnitt liegt. Die Stammbaumrekonstruktion der übrigen GARP-Proteine (Abb. 3.1) legt genau dies nahe, da ansonsten aus allen Phyla dieser Genfamilie Vertreter gefunden wurden. Die tatsächlich entdeckten GARP-Gene bestätigen sehr gut die gängige Aufteilung der Vertebraten nach molekularen Markern (Abb. 4.1). Trotzdem ist die Stellung einiger Spezies zu diskutieren. Die Stellung des *Xenopus tropicalis* an der Basis der Sauropsiden widerspricht der allgemein gängigen Systematik. Nach ihm müsste er als Vertreter der Lissamphibia in einer Schwestergruppe zu den restlichen Amnioten stehen. Da aber nur ein Vertreter der Lissamphibien komplett sequenziert wurde, ist es generell kritisch, daraus auf die Stellung der ganzen Gruppe im Stammbaum zu schließen. Im weiteren Stammbaum ist auch die Stellung des afrikanischen Elefanten (*Loxodonta africana*) aus den eben genannten Gründen anzuzweifeln, da er aus der Gruppe der Afrotheria der einzige Vertreter ist. Die Gruppierung der Rodentia

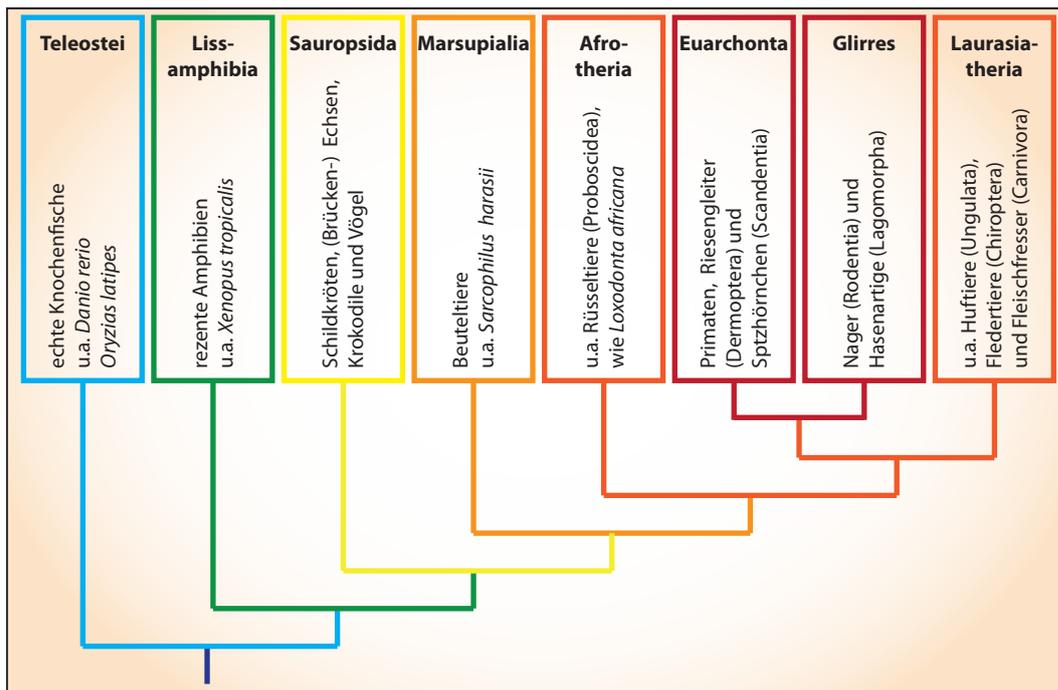


Abbildung 4.1.: **Molekularer Stammbaum der Wirbeltiere**

Nach WESTHEIDE UND RIEGER (2003) erstellter Stammbaum aufgrund molekularer Daten. Die Färbung entspricht der in Abb. 3.1 verwendeten

mit den Primaten entspricht der Gliederung im klassischen molekularen Stammbaum. In der anderen Großgruppe befinden sich nur Vertreter, die als Laurasiatheria bekannt sind. Die vermeintlich falsche Stellung des Wildschweins (*Sus scrofa*) am basalen Ende Carnivoren kann durch den niedrigen *Bootstrap*-Wert von 0,6 erklärt werden. Dieser gibt an dieser Stelle an, dass nur 60 % der generierten Stammbäume diese Aufteilung unterstützen. Ebenso verhält es sich mit der Stellung des Pferdes (*Equus caballus*). Nur 55 % der errechneten Bäume unterstützt diese Position. Im Gegensatz zum Wildschwein stimmt aber die Positionierung mit der „Lehrmeinung“ überein. Die Positionierung der Huftiere wird also nicht gut aufgelöst.

Für den GARP Rezeptor bedeutet dies, dass es sich bei seiner Entstehung um ein einmaliges Ereignis gehandelt haben dürfte. Er stellt also eine Autapomorphie der Gnathostomata dar. Da in allen Tiergruppen ein oder mehrere Vertreter gefunden werden konnten, die das GARP-Gen tragen, scheint es zu keiner Zeit zu einer Deletion, bzw. einem Verlust des Gens gekommen zu sein, was für seine wichtige Rolle in der Immunregulation sprechen würde.

4.1.2. GARP besitzt mehrere für Proteolyse zugängliche Regionen

Durch das erstellte GARP-Modell lassen sich bestimmte Aminosäureabschnitte zu strukturellen Einheiten zusammenfassen. Dies sind die beiden LRR-Blöcke aus LRR 1–10 und 11–20, sowie die prolinreiche Region und der Cystein-loop. Vergleicht man das Modell mit den elektronenmikroskopischen (EM) Aufnahmen von Probst-Kepper et al. (2009b) so fällt auf, dass hier die beiden Blöcke aus LRR 1–10 und 11–20 kein gleichmäßiges Oval bilden. Vielmehr befindet sich dort ein Knick in der Struktur. Der Grund hierfür könnte in der prolinreichen Region zwischen den LRRs 10 und 11 liegen. Es könnte sich hier um eine ausgedehnte, oder mehrere kurze Polyprolin-Helix/Helices handeln, die ein molekulares Scharnier bilden und dem Protein Flexibilität verleihen. Somit kann das Modell mit den EM-Aufnahmen in Einklang gebracht werden. Der Cystein-loop scheint die Gesamtstruktur des Rezeptors nicht zu beeinflussen. In den EM-Aufnahmen ist an der korrespondierenden Stelle nichts Auffälliges zu beobachten.

Ob das errechnete GARP-Modell die tatsächliche Struktur des Rezeptors widerspiegelt ist, ohne die Röntgenkristallstruktur zu kennen, schwierig abzuschätzen. Trotzdem gibt es Möglichkeiten abzuwägen, ob das Modell realistisch ist. Für das Modell spricht, dass sich die einzelnen Aminosäuren zu der für LRR-Proteinen typischen Hufeisenstruktur modellieren lassen. Dabei liegen die Faltblätter stets im Inneren. Die auf der Außenseite liegenden helikalen Strukturen sind enorm divers und unterschiedlich ausgeprägt. Dies ist sogar charakteristisch für LRR-Proteine, da sich auf der Außenseite diverse Helixtypen (α -, 3_{10} - und Polyprolin-Helices) finden lassen (BELLA ET AL. 2008).

Die weiterhin ermittelten Parameter (R - und ϕ -Werte nach Enkhbayar et al. (2004)) lassen sich sehr gut mit denen anderer LRR-Proteine vergleichen. Diese sprechen für ein großes LRR-Protein, mit einem relativ weit geschlossenen Bogen. Dabei lässt sich GARP am besten mit dem Toll-ähnlichen Rezeptor 3 vergleichen. Er besitzt einen R -Wert von 24 Å und ist mit einem ϕ -Wert von 282° etwas weiter geschlossen. Generell müssen diese Werte für GARP mit Vorsicht betrachtet werden, da der Einfluss der GARP eigenen prolinreichen Region, bzw. die Auswirkung einer Ligandenbindung große Auswirkungen auf sie haben können.

Zusammenfassend stellt das Modell für die Überprüfung der Zugänglichkeit von möglichen Protease-Schnittstellen eine gute Basis dar. In der Primärstruktur finden sich insgesamt drei diacide Aminosäuresequenzen die bevorzugt von Astacinproteasen geschnitten werden (BECKER-PAULY ET AL. 2011). Die Aminosäuresequenzen liegen in LRR 6, dem vermutlich exponierten Cystein-loop und der C-terminalen Domäne (vgl. Abb. 4.4) Ein Vergleich mit den nächst Verwandten LRR-Proteinen zeigt, dass diese durch Proteolyse reguliert werden. Für die Toll-ähnlichen Rezeptoren 3 und 9 ist eine Regulation über

Cathepsine beschrieben (QI ET AL. 2012, EWALD ET AL. 2008). Diese lysosomalen und endosomalen Proteasen schneiden im Fall des Toll-ähnlichen Rezeptor 3 innerhalb eines LRRs und im Fall des Toll-ähnlichen Rezeptor 9 innerhalb einer Aminosäuresequenz, die ähnlich der prolinreichen Region von GARP zwei LRR-Blöcke separiert und einen hohen Anteil an Prolin aufweist. Als besonders proteolyseanfällig werden demnach die drei diaciden Sequenzmotive und die prolinreiche Region eingestuft.

4.2. Herstellung der für die Arbeit bedeutenden Proteine

Die Verfügbarkeit von rekombinantem Protein und den zugehörigen Expressionsvektoren war eine unverzichtbare Grundlage dieser Arbeit. Um die exprimierten Proteine in komplexen Proteingemischen, wie Zellüberständen oder -lysaten zu identifizieren und detektieren sind spezifische Antikörper nötig. Für GARP sind solche Antikörper schwer zu generieren, da der extrazelluläre Teil fast ausschließlich aus LRR-Domänen besteht und sich diese in vielen anderen Proteinen, wie Toll-ähnlichen Rezeptoren, oder ECM-Strukturproteinen wiederfinden. So ist ein hohes Maß an Kreuzreaktivität zu erwarten. GARP spezifische Antikörper werden vor allem für immunhistochemische oder FACS-Färbungen verwendet (TRAN ET AL. 2009, WANG ET AL. 2009). Einen Nachweis von GARP mittels Immunoblot in einem Zellysate ist bislang nicht publiziert worden. Die Kreuzreaktivität lässt sich daher schwer bis gar nicht abschätzen. Aus diesem Grund wurde allen Konstrukten eine Tag-Sequenz angehängt, um später mit hochspezifischen, monoklonalen Tag-Antikörpern arbeiten zu können.

Um die GARP-Ektodomäne allein zu exprimieren wurde ein Fusionsgen aus GARP-Ektodomäne und dem C-terminalen Teil des Meprin α Gens generiert. Der Vorteil einer solchen Konstruktion liegt darin, dass das Konstrukt wie der *full-length* GARP zuerst am rauhen ER synthetisiert und mit der Transmembranregion in die Membran eingebaut wird. Hier erfolgen die posttranslationalen Modifikationen wie die Bildung der Disulfidbrücken oder die Glykosylierungen. Auf dem sekretorischen Weg gelangt der Rezeptor in den Golgi-Apparat. Ab hier können, im Gegensatz zum Wildtyp, Furin-ähnliche Proprotein-Convertasen in der Sequenz G(683)QPS↓RQKR(690) des Konstrukts schneiden. Ein solcher Schnitt resultiert in der Freisetzung des Ektodomäne von der Membran, sodass sie nach der Sekretion im Überstand zu finden ist. Für die membrangebundene Protease Meprin β war ein solcher „*tailswitch*“ bereits erfolgreich durchgeführt worden (BECKER ET AL. 2003). Durch die unterschiedlichen Tag-Sequenzen am reifen N- und C-terminus sind verschiedene Reinigungsstrategien möglich. Zusätzlich kann bei Prozessierungsversuchen zwischen N- und C-terminalen Fragmenten unterschieden werden.

Dies erlaubt die Beurteilung ob es sich um limitierte Proteolyse oder einfache Degradation handelt. Zudem kann über eine Größenbestimmung der Fragmente ein Rückschluss auf die Lokalisation der Schnittstelle gezogen werden.

Im Falle von TGF- β war die Platzierung der Tag-Sequenz nicht trivial, da zum Beispiel eine C-terminale Positionierung die posttranslationale Prozessierung verhindert und damit die Aktivierbarkeit (WAKEFIELD ET AL. 1991). Die Platzierung innerhalb des LAP wiederum barg die Gefahr, dass das translatierte TGF- β sich nicht richtig gefaltet und nicht sezerniert werden konnte, beziehungsweise nicht aktiviert würde. Generell sollte eine Modifikation möglichst nahe am reifen N-Terminus die Biostabilität am wenigsten beeinflussen (SHA ET AL. 1991).

Beide Konstrukte konnten erfolgreich in Hi5 Insektenzellen exprimiert und aus dem Zellüberstand in ausreichender Menge und Reinheit isoliert werden. Die korrekte Faltung, sowie die Funktionalität konnten über CD-spektroskopische Untersuchungen (3.6), sowie eines TGF- β sensitivem Proliferationsassays (3.9) bestätigt werden. Die bei verschiedenen Temperaturen aufgenommenen CD-Spektren von GARP_{TS} zeigen, dass das Protein im physiologischen Temperaturbereich stabil ist.

Das rekombinante TGF- β _{strep} zeigt in den CD-spektroskopischen Analysen die beschriebene Temperaturstabilität von bis zu 60 °C (BROWN ET AL. 1990). Zudem ist der Graph identisch mit den bereits von McMAHON ET AL. (1996) publiziertem CD-Spektrum. Aktives TGF- β wirkt dosisabhängig proliferationsinhibierend auf Mv1Lu Zellen (TUCKER ET AL. 1984). Mit dem rekombinanten TGF- β _{strep} konnte ebenfalls eine lineare Abhängigkeit von TGF- β _{strep} Konzentration zu Mv1Lu-Zellproliferation gezeigt werden (Abb. 3.27), was ebenfalls ein Hinweis auf eine potentiell korrekte Faltung des rekombinanten Proteins ist.

4.3. Charakterisierung des GARP-TGF- β Komplex

Die Expressionsstudien in HEK 293H Zellen (3.4.1) zeigen für alle drei GARP-Varianten einen Unterschied zwischen der errechneten und der ermittelten relativen Molekülmasse von circa 8 kDa. Dieser Massenunterschied kann durch multiple Glykosylierungsstellen erklärt werden, was in Übereinstimmung mit Ergebnissen von OLLENDORFF ET AL. (1994) steht, die insgesamt 5 N-Glykosylierungsstellen in der Ektodomäne des GARP-Rezeptors voraussagten. Computergestützte Untersuchungen am „NetNGly 1.0 Server“ (www.cbs.dtu.dk) indizierten drei dieser Stellen als „wahrscheinlich“. Dies sind N(203), N(271) und N(345), vergleiche Tabelle F.2. Bei einer durchschnittlichen Größe von 2,5 bis 4 kDa stimmt diese Anzahl gut mit der beobachteten Zunahme des Molekulargewichts

überein, sodass die Vermutungen von OLLENDORFF ET AL. (1994) bestätigt werden. HAHN ET AL. (2013) berichteten, dass GARP in Konzentrationen von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inhibierend auf die Proliferation von CD4^+ T-Zellen wirkt. Auch auf Mv1Lu Zellen wirken hohe GARP Konzentrationen von 800 ng/ml proliferationshemmend (Abb. 3.28). Dies kann auf zwei Wegen erklärt werden. Zum einen könnte GARP direkt und ohne zusätzliches TGF- β auf die Mv1Lu Zellen wirken. Ein denkbare Szenario könnte sein, dass GARP an Zelloberflächenrezeptoren bindet. In diesem Zuge könnte es zu einer Stabilisierung des Rezeptor-Ligand Komplexes kommen, was zu einer verlängerten Signaltransduktion führen würde. Ein ähnlicher, positiver *feedback-loop* zwischen GARP und FoxP3 war bereits für T-Zellen beschrieben. Die Überexpression von GARP führt in T-Effektorzellen zu einer Expression von FoxP3 und umgekehrt (PROBST-KEPPER ET AL. 2009B). Die genauen Mechanismen dieses *feedback-loops* sind bisher noch nicht geklärt. Jedoch kann in beiden Fällen eine Beteiligung von endogenem TGF- β nicht ausgeschlossen werden. Zum Anderen besteht die Möglichkeit, dass Mv1Lu Zellen selbst TGF- β produzieren und sezernieren. GARP könnte dann an das freie, latente TGF- β binden und seine Aktivierung begünstigen.

GARP und TGF- β liegen auf T_{Regs} über Disulfidbrücken aneinander gekoppelt vor (WANG ET AL. 2012). In der nicht reduzierenden SDS-PAGE laufen sie als hochmolekularer Komplex (GAUTHY ET AL. 2013). Daher wurde untersucht, ob die rekombinanten Konstrukte GARP_{FL} und TGF- β _{strep} in der Lage sind, wie die Wildtyp Proteine aneinander zu binden und intrazellulär über Disulfidbrücken miteinander verbunden zu werden (Abb. 3.10). Die Größe des GARP-TGF- β Komplexes von 220 kDa spricht für eine Stöchiometrie von einem TGF- β Dimer, welches an zwei GARP-Proteine bindet. Ein mögliches Szenario wäre die Verknüpfung des Cysteins 41 (siehe Tab. F.1) des LAP, welches auch die Verknüpfung an das LTBP vermittelt (GLEIZES ET AL. 1996), an das freie Cystein 350 von GARP. Dies würde zu einem Komplex von ca. 260 kDa führen, der bereits von WANG ET AL. (2012) beobachtet wurde. Cystein 350 ist im GARP Rezeptor hoch konserviert (siehe Tab. B.2), sodass an jeweils ein Cystein 41 des TGF- β Dimeres an je ein GARP binden könnte. Die Spaltungsexperimente mit Proteasen (Abb. 3.24) sprechen aber gegen die Bindung an Cystein 350 von GARP, da die vermutete MMP9 Schnittstelle N-terminal des Cysteins 350 liegt, aber das TGF- β am N-terminalen GARP-Fragment gebunden ist. Das Cysteinpaar 211 / 227 erscheint hier plausibler. Das N-terminale GARP-TGF- β Komplexfragment läuft auf einer Höhe von ca. 135 kDa. Diese relative molekulare Masse passt zu der beobachteten Größe der Einzelfragmente, 70 kDa für das latente TGF- β Dimer und zweimal das N-terminale GARP-Fragment von je 35 kDa. Zudem impliziert dieses Modell, dass TGF- β an eines der beiden konservierten Cysteine der Disulfidbrücke zwischen Cystein 211 und Cystein

227 bindet. Das jeweils andere Cystein könnte zusätzlich die zwei GARP–Untereinheiten intermolekular verbrücken und so den Komplex stabilisieren.

Die Bindung von TGF- β an eines der beiden Cysteine wird von den Prozessierungsversuchen unterstützt. Sowohl für Cystein 211 und 350 wurde bereits gezeigt, dass eine Mutation zu Serin die Translokation des GARP–TGF- β Komplexes an die Zelloberfläche verhindert (WANG ET AL. 2012). Ob dies durch eine Fehlfaltung des GARP–Rezeptors zu Stande kommt, oder direkt mit dem Fehlen der Cysteinreste zusammenhängt konnte aber nicht gezeigt werden. *In vitro* Kopplungsversuche (3.7) zeigten ebenfalls die Bildung des GARP–TGF- β Komplexes. Diese stimmen mit den von WANG ET AL. (2012) und GAUTHY ET AL. (2013) bereits beschriebenen Komplexen überein. Das Auftreten von Komplex–Doppelbanden ähnlich der Doppelbanden aus ProTGF- β und latentem TGF- β Dimer impliziert, dass GARP sowohl die ProTGF- β als auch die latente Form des TGF- β binden kann und Disulfidbrücken ausbildet. Das nichtreduzierende Gel zeigt die Banden für den Komplex aus GARP und Pro-, beziehungsweise latentem TGF- β mit gleicher Intensität, was für eine etwa gleiche Affinität der beiden Proteinspezies vor der Kopplung spricht.

Die CD–spektroskopischen Experimente (Abb. 3.16) zeigen, dass das theoretische Summenspektrum vom Spektrum des Gemisches abweicht. Diese Abweichung könnte durch eine Konformationsänderung im GARP–Rezeptor und oder im TGF- β Dimer zu Stande kommen. Die Abweichung der CD–Spektren kann auf eine räumliche Änderung der beiden LRR–Blöcke (1–10 und 11–20) zueinander oder zum Beispiel der Exposition des RGD Motivs für die Integrin–vermittelte TGF- β Aktivierung zurückgeführt werden. Zusammen mit der Erkenntnis, dass das N–terminale Spaltprodukt der MMP9 Prozessierung (LRR 1–10) an TGF- β bindet (Abb. 3.24) aber die Aktivierbarkeit von TGF- β nicht steigert (Abb. 3.33) kann folgendes Modell für den GARP–TGF- β Komplex aufgestellt werden: Zuerst bindet TGF- β am ersten LRR–Block (LRR1–10). Dort werden noch intrazellulär die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen 211, beziehungsweise 227 von GARP zu Cystein 41 des TGF- β Dimers geknüpft. Unabhängig von der Disulfidverbrückung wird, nach der Umwandlung von proTGF- β zum SLC durch Furin, eine Konformationsänderung des Komplex induziert, sodass die RGD Bindungsstelle des TGF- β Dimers freilegt werden (Abb. 4.2). Die Hauptaktivatoren von TGF- β aus dem GARP–TGF- β Komplex, $\alpha_v\beta_8$ Integrine (EDWARDS ET AL. 2014), können nun auf der Zelloberfläche TGF- β mit höherer Effizienz aktivieren.

Proliferationsuntersuchungen (3.9) mit unterschiedlichen GARP und TGF- β Konzentrationen zeigen, dass die TGF- β Aktivität abhängig von der GARP Konzentration ist. Eine maximale Steigerung ist etwa bei einem stöchiometrischen Verhältnis von 1

Mol GARP zu 1,8 Mol TGF- β zu erkennen. Dieser Effekt tritt nur auf, wenn GARP nicht-kovalent gekoppelt an TGF- β vorliegt. In den Untersuchungen von WANG ET AL. (2012) zeigte der Komplex aus latentem TGF- β und löslicher GARP-Ektodomäne keinen Einfluss auf die Proliferation der Mv1Lu Zellen. Ein Effekt konnte nur beobachtet werden, wenn GARP membrangebunden vorlag. Bei dem Komplex aus löslichem GARP und TGF- β handelte es sich in dieser Studie jedoch um kovalent gebundene Komplexe, da sie coexprimiert wurden. Somit decken sich die Beobachtungen aus dieser Arbeit mit jenen von WANG ET AL. (2012) insofern, dass bei einer kovalenten Bindung von GARP und TGF- β keine Aktivierungssteigerung zu beobachten ist. Der Umstand, dass kovalent an GARP gebundenes TGF- β nicht aktiviert werden kann, lässt sich durch das TGF- β Aktivierungsmodell am LTBP (BUSCEMI ET AL. 2011) erklären, welches auch auf GARP ausgeweitet werden kann (WANG ET AL. 2012). In diesem Modell ist eine feste Verankerung des TGF- β Adapterproteins (LTBP oder GARP) in der extrazellulären Matrix, beziehungsweise Zellmembran nötig. $\alpha_V\beta_6$ und $\alpha_V\beta_8$ Integrine können an die RGD Sequenz des kovalent gebundenen TGF- β binden und einen mechanischen Zug auf das LAP des latenten TGF- β Komplexes ausüben, was zur Freisetzung des reifen Wachstumsfaktors führt. In ungebundener Form kann solch ein Zug nicht aufgebaut werden, wodurch es zu keiner Aktivierung von TGF- β kommt. Versuche, die Aktivierung von TGF- β aus dem nicht kovalenten, löslichen GARP-TGF- β Komplex

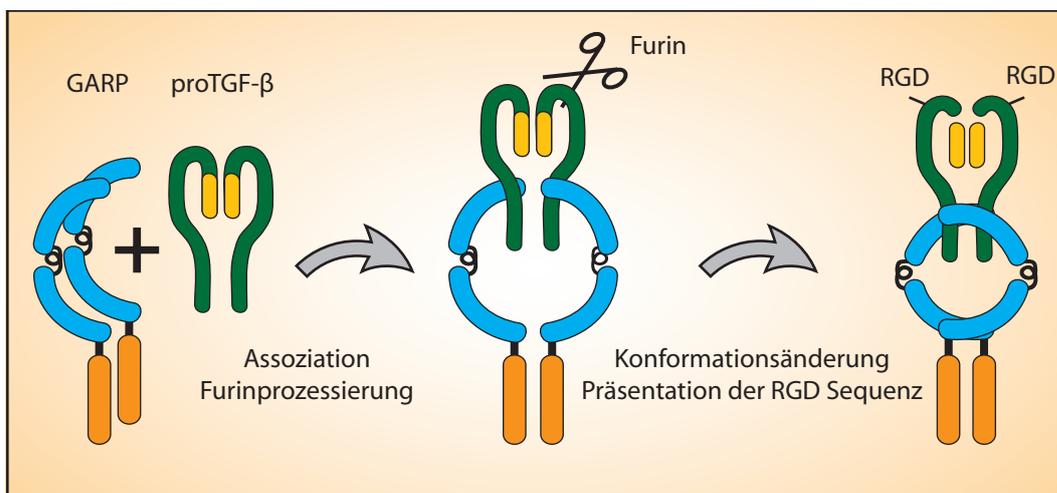


Abbildung 4.2.: **Schema Bindung von TGF- β an GARP**

GARP bindet mit den Domänen LRR 1-10 intrazellulär ein proTGF- β Dimer und wird mit diesem über Disulfidbrücken verknüpft. Furin schneidet das proTGF- β Dimer, sodass TGF- β als *small latent complex* (SLC) vorliegt. Durch eine Konformationsänderung in GARP werden die Bindungsstellen für $\alpha_V\beta_8$ Integrine im SLC präsentiert, sodass sie besser zugänglich sind. Orange = Transmembrandomäne GARP, hellblau = LRR-Domänen GARP, grün = LAP, gelb = reifes TGF- β

mit RGD-Peptiden zu unterbinden, scheiterten, da bereits RGD-Peptidkonzentrationen unterhalb der von WANG ET AL. (2012) eingesetzten cytotoxisch wirkten (Abb. C.2). Dies ist auch in Einklang mit anderen Studien, die die Toxizität von RGD-Peptiden auf die Aktivierung von Caspase-3 zurückführen (BUCKLEY ET AL. 1999). Auf diese Weise kann nicht festgestellt werden, ob Integrine auch an der beobachteten Aktivierung von nicht kovalent an GARP gebundenen TGF- β beteiligt sind. Eine Möglichkeit dies zu überprüfen, wäre in den verwendeten Mv1Lu Zellen ein *knock-out*, beziehungsweise einen *knock-down* für die entsprechenden Integrine durchzuführen. Das Modell der Aktivierung von TGF- β durch mechanischen Zug ist aber nicht universell gültig und widerspricht Beobachtungen von GE UND GREENSPAN (2006), die zeigten, dass die Freisetzung von LTBP aus der ECM durch die Protease BMP1 zu einer erhöhten TGF- β Aktivität führt. Es scheinen also noch weitere Aktivierungswege zu existieren.

4.4. Proteasekandidaten einer möglichen GARP Prozessierung

Die Untersuchungen von T-Zell mRNA sollte Aufschluss darüber geben ob Proteasen der Astacinfamilie nachgewiesen werden können, da sie oft an der Aktivierung von TGF- β ähnlichen Wachstumsfaktoren beteiligt sind (HOPKINS ET AL. 2007, SCHÜTTE ET AL. 2010). Neben BMP1 (GE UND GREENSPAN 2006) sind auch die beiden Meprine in der Lage das TGF- β bindende LTBP zu prozessieren (JEFFERSON ET AL. 2013). Die auf massenspektrometrischen Daten beruhende Prozessierung von LTBP durch die Meprine konnte von LEUCK (2013) in ihrer Masterarbeit (angefertigt in unserer Arbeitsgruppe) durch *in vitro* Experimente mit rekombinanten Proteinen verifiziert werden. Es konnte die Transkription von zwei Astacingenen, nämlich BMP1 und Ovastacin, in T-Zell mRNA nachgewiesen werden. 3.2. Von BMP1 sind mehrere Spleißvarianten bekannt (JANITZ ET AL. 1998), wovon BMP1 und mTLD die Haupttranskripte darstellen. Dabei handelt es sich bei BMP1 um die kurze und bei mTolloid um die lange Spleißvariante. Das Primerpaar, welches zur Detektion von BMP1 genutzt wurde, bindet innerhalb der N-terminal gelegenen Proteasedomäne. Mit diesem Primerpaar war es folglich nicht möglich, zwischen BMP1 und mTolloid zu unterscheiden. Daher wurde ein zweites Primerpaar verwendet, das in den DNA-Abschnitt der Domänen bindet, die nicht im BMP1-, dafür aber im mTolloid-Gen zu finden sind (Cub4-Cub5). Da beide Primer ein unterschiedliches Ergebnis lieferten ist auch von einer unterschiedlichen Regulation auszugehen. BMP1 wurde ähnlich wie die anderen Proteasen nach Stimulation in beiden Populationen hochreguliert, wogegen dies bei mTolloid nicht der Fall war. Bei mTolloid änderte sich die Signalstärke nicht, sodass auch von keiner Änderung der Transkriptionsrate auszugehen ist. Jedoch ist auffällig, dass in T_{Regs} generell weniger mTolloid cDNA

zu finden war. Diese Ergebnisse legen eine Regulation auf der Ebene des Spleißvorgangs nahe. Es scheint so, als wäre die Transkription des BMP1 Gens nach der Stimulation der T-Zellen erhöht (stärkere Banden mit den BMP1 Primer, Abb. 3.3 C). Aber durch vermehrtes Spleißen der prä-mRNA bleibt die Menge an mTolloid mRNA konstant, während die von BMP1 erhöht vorliegt. Bei mTolloid und BMP1 könnte es sich ähnlich, wie bei den Gelatinasen A und B (MMP 2 und 9), um eine konstitutiv exprimierte (mTolloid) und eine regulierte Form (BMP1) handeln. Dabei stellt BMP1 die etwas unspezifischere und aktivere Protease dar (SCOTT ET AL. 1999, WERMTER ET AL. 2007). Der Grund hierfür könnte in der unterschiedlichen Anzahl nicht-proteolytischer Domänen liegen. Diese sind für die Substratspezifität und Substrataffinität verantwortlich (HINTZE ET AL. 2006) und regulieren über eine Calcium-abhängige Dimerisierung die Zugänglichkeit der Substrate zum aktiven Zentrum (BERRY ET AL. 2009). Solch ein Mechanismus könnte für aktivierte T-Zellen unter Umständen wichtig sein. Sie müssen zum Beispiel für eine erhöhte Mobilität, auch über eine vergrößerte proteolytische Aktivität verfügen.

Ovastacin, eine bislang nur in Oocyten gefundene Protease, konnte ebenfalls detektiert werden. Ihre mRNA wurde ebenfalls nach Aktivierung der Zellen vermehrt gebildet. Dass Ovastacin nicht streng Oocyten spezifisch ist, untermauern massenspektrometrische Daten. So wurden Ovastacin Proteinfragmente in Serum, der Leber oder dem Herzmuskel nachgewiesen (ZGODA ET AL. 2009, YIN ET AL. 2010). Die für diese Arbeit durchgeführte mRNA Analyse ist die erste, die Ovastacin in T-Zellen nachweisen konnte und zeigte, dass es der Regulation durch den T-Zellrezeptor unterliegt. Somit liegt eine Funktion im Immunsystem nahe und Ovastacin kommt neben BMP1 als Kandidat für die selektive Proteolyse und Regulation von GARP in Frage.

Von den beiden anderen getesteten Metalloproteases, ADAM 10 und ADAM 17, konnte ADAM 10 nicht, aber ADAM 17 sowohl in naiven und regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden. Die Signalverstärkung nach Stimulation deckte sich mit der von Briso et al. (2008) beobachteten.

Zudem wurden die bei der TGF- β Aktivierung beteiligten Proteasen Plasmin, Neutrophile Elastase, MMP2 und MMP9 untersucht werden. Das Verdauungsenzym Trypsin fungierte in dieser Versuchsreihe als Positivkontrolle. Für das Plasmaprotein Plasmin wurde lange Zeit ein Rolle in der TGF- β Aktivierung diskutiert (siehe 1.3.4). Neutrophile Elastase, MMP2, MMP9 sind drei Proteasen, die von neutrophilen Granulocyten exprimiert und sekretiert werden. Alle drei sind an der Ausbildung und dem Voranschreiten von autoimmuner RA beteiligt, die durch ein Verlust der supprimierenden Wirkung von T_{Regs} und einer übersteigerten Immunantwort gekennzeichnet ist und durch ei-

ne übersteigerte, beziehungsweise verminderte TGF- β Aktivierung beeinflusst werden kann (siehe 1.4.4).

4.5. Prozessierung von GARP und die Auswirkungen auf die TGF- β Aktivierbarkeit

T_{Regs} sind wie in 1.2.2 ausführlich beschrieben maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz beteiligt. Inwieweit und auf welche Weise diese Zellen selbst reguliert werden ist zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt. Neueste *knockout* und Überexpressionsstudien von GARP in der Maus zeigen, dass GARP nicht direkt an der Suppression von T-Zellen beteiligt ist, sondern vielmehr den Phänotyp der T_{Regs} manifestiert und die Differenzierung zu T_H17 Zellen verhindert (EDWARDS ET AL. 2013, ZHOU ET AL. 2013A). Somit kann eine Prozessierung von GARP auf der Oberfläche von T_{Regs} einen Einfluss auf die Stabilität des regulatorischen Phänotyps haben oder die Differenzierung von naiven T-Zellen hin zu autoreaktiven T_H17 Zellen fördern.

Die spaltenden Proteasen können grob in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe besteht aus Proteasen, die GARP vollständig abbauen, sodass im SDS-Gel keine, beziehungsweise multiple und unspezifische Fragmente nachgewiesen werden können. Die andere Gruppe schneidet GARP nur begrenzt sodass distinkte Fragmente identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um so genannte limitierte Proteolyse (Tab. 3.3).

4.5.1. Degradierung von GARP durch die Proteasen Trypsin, Neutrophile Elastase und Plasmin

Das Verdauungsenzym Trypsin degradiert GARP vollständig. Dies entspricht auch den Erwartungen, da Trypsin zwar sehr spezifisch nur nach Lysin und Arginin schneidet (vergleiche Abb. 1.6 C), aber dafür nicht sehr selektiv ist, sodass während des Degradationsvorgangs an nahezu jeder möglichen Position geschnitten wird. Eine *in vivo* relevante Rolle dieser Degradierung ist jedoch zweifelhaft, da Trypsin und GARP keinen Kontakt zueinander haben. Die einzige Situation in der Trypsin eventuell mit T_{Regs} in Berührung kommen könnte, besteht möglicherweise im Rahmen einer Pankreatitis. Hier dürfte jedoch die Degradierung von GARP im Vergleich mit den sonst auftretenden Symptomen wie der Zerstörung umliegender Organe oder starkem Flüssigkeitsverlust durch Einblutungen in das umliegende Gewebe, einen eher geringen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung haben. Es gibt jedoch gewebspezifische Serinproteasen mit tryptischer

Spaltspezifität, die mit GARP auf der Oberfläche von T_{Regs} interagieren könnten. Beispiele hierfür wären die im folgenden getesteten Proteasen Plasmin und Neutrophile Elastase.

Auch die Neutrophile Elastase degradiert das Konstrukt GARP_{TS} komplett (Abb. 3.19). Auch im Zellkultur Modell konnte eine, wenn auch im Vergleich zu den anderen getesteten Proteasen schwache Aktivität gegenüber GARP gezeigt werden (Abb. 3.23). Übermäßige proteolytische Aktivität von Neutrophiler Elastase wird mit der *Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (COPD) in Verbindung gebracht. COPD ist ein Sammelbegriff für eine Vielzahl chronischer Lungenerkrankungen, die durch eine erhöhte Anzahl an Neutrophilen, Makrophagen und T-Zellen gekennzeichnet ist und vor allem durch Zigarettenrauch hervorgerufen wird (BARNES UND STOCKLEY 2005). Da auch hier die regulatorischen Mechanismen des Immunsystems versagen, wird mittlerweile von ähnlichen Mechanismen wie bei Autoimmunerkrankungen ausgegangen. Die Zahl der T_{Regs} ist in COPD Patienten reduziert, und dafür die Anzahl an T_H17 erhöht, was ein typischer Indikator für eine Autoimmunerkrankung ist. Ein eindeutiges (Auto)Antigen konnte bisher nicht ermittelt werden. Es sind zum einen Proteinfragmente aus dem Tabakrauch oder auch Elastinfragmente in der Diskussion (STEFANSKA UND WALSH 2009). Interessanterweise spielen auch MMPs, ähnlich der Situation in der RA eine Rolle bei der Manifestation der Erkrankung (BELVISI UND BOTTOMLEY 2003), sodass eine Unterscheidung von Elastase bedingter Degradierung oder z.B. MMP9 induzierter Spaltung schwer möglich ist.

Bei Plasmin handelt es sich um ein Plasmaprotein, welches die Fibrinolyse, also den Abbau von Fibringerinseln katalysiert. Plasmin ist eine Serinprotease, die in der Leber als Vorstufe (Plasminogen) synthetisiert wird. Im Plasma unterliegt es einer strikten Regulation durch Aktivatoren und Inhibitoren (SCHALLER UND GERBER 2011). Ebenso wie Trypsin degradiert Plasmin GARP vollständig. Interessanterweise ist dabei im Zellkulturmodell eine ähnliche Aktivität zu beobachten. *In vitro* ist Plasmin weit weniger affin und bis zu einem Faktor von 500 langsamer bei der Umsetzung verschiedener synthetischer Substrate als Trypsin (PLAUT 1978). Auf der Zelloberfläche könnte es aber zu einer Akkumulation von Plasmin, nicht aber von Trypsin kommen, sodass die geringere Aktivität von Plasmin kompensiert wird (GONZALEZ-GRONOW ET AL. 1989). Die Rolle von Plasmin im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen wird kontrovers diskutiert. Zwar ist eine proinflammatorische Wirkung von Plasmin beschrieben, dieser wird aber einer Wirkung auf Monocyten und vor allem Makrophagen zugeschrieben. Auf T_{Regs} oder andere Lymphocyten ist bisher kein Einfluss bekannt. In Autoimmunmodellen von RA kann der Einfluss von Plasmin nicht eindeutig geklärt werden, da je nach Modell Plasmin entweder das Fortschreiten und die Schwere der Erkrankung positiv

oder negativ beeinflusst (HAMILTON 2008). Ob die gezeigte Degradierung von GARP eine physiologische Rolle spielt, muss also in Frage gestellt werden.

Die von den Serinproteasen erzeugten Peptidfragmente sind sowohl in der Lage die Aktivierbarkeit von TGF- β zu steigern, (Abb. 3.31) als auch alleine die Proliferationsrate von Mv1Lu-Zellen zu supprimieren (Abb. 3.32). Diese Ergebnisse zeigen, dass für die im vorigen Abschnitt beschriebenen Eigenschaften von GARP (Inhibition der Mv1Lu-Zellproliferation in Kombination mit TGF- β oder allein in hohen Dosen) nicht das gesamte Protein in seiner nativen Struktur nötig ist. Vielmehr scheint es so, als ob sowohl für die Aktivierbarkeitssteigerung von TGF- β , als auch für die Wirkung auf die Zielzellen direkt, ein tryptisches Fragment von GARP ausreicht um die volle Aktivität zu erreichen.

Für einen möglichen therapeutischen Ansatz von rekombinantem GARP stellt dies wohl die bedeutsamste Erkenntnis dar. Sollte bestätigt werden, dass auch posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel die Glykosylierung für die GARP-Funktionen nicht notwendig sind, könnten auf eine relativ schnelle und kostengünstige Weise ein funktioneller TGF- β Verstärker produziert werden. Hierfür muss zuerst das verantwortliche Peptid, oder die Peptide, identifiziert werden. Anschließend könnten im prokaryotischen Expressionssystem oder durch chemische Synthese relativ große Mengen des Zielpeptids für weitere translationale Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden. Mit Hilfe eines solchen Peptids könnte die Aktivierbarkeit von intrinsischem, latentem TGF- β *in vivo* erhöht werden. Einsatzgebiete für solch ein Peptid könnten Erkrankungen sein, bei denen eine temporäre Suppression des Immunsystems von Vorteil ist. Zusätzlich darf jedoch ein erhöhter TGF- β Spiegel nicht kontraproduktiv wirken. Denn eine erhöhte Konzentration an aktivem TGF- β birgt die Gefahr von fibrotischen Veränderungen in Haut, Leber, Lunge, Muskel und Niere (BIERNACKA ET AL. 2011). Somit müssen Nutzen und Nebeneffekte untersucht und gegeneinander abgewogen, sowie eine lokale Applikation sichergestellt werden.

4.5.2. Spaltung von GARP durch MMP2 und MMP9

Die Spaltung von GARP_{TS} durch MMP2 verläuft anders als der zuvor gezeigte und beschriebene Abbau von Trypsin, Plasmin oder Neutrophiler Elastase. MMP2 schneidet GARP sukzessive in Peptidfragmente unterschiedlicher Größe. Es entstehen dabei keine distinkten Fragmente, wie bei der Prozessierung durch MMP9. Ein Vergleich der zeitaufgelösten Spaltung von GARP durch MMP9 und MMP2 zeigt, dass die ersten Schnitte aufgrund identischer molekularer Fragmentmassen gleich zu sein scheinen. MMP2 stoppt

jedoch nicht nach dem ersten Schnitt, sondern spaltet das Protein weiter. Der Grund hierfür könnte sein, dass durch die partielle Entwindung der Polypeptidkette neue Schnittstellen freigelegt werden an denen MMP2, nicht aber MMP9 schneiden kann. Durch seine Fähigkeit alle „*monocyte chemoattractant proteins*“ (MCPs) N-terminal zu schneiden und somit zu inaktivieren, wirkt MMP2 besonders antiinflammatorisch und wird daher *in vivo* als Weichensteller verschiedener entzündlicher Signalwege bezeichnet, Zusammenfassung in DUFOUR UND OVERALL (2013). Besonders in Asthmodellen führt ein Fehlen von MMP2 zu einem erhöhten Chemokinspiegel, und zu einer massiven Akkumulation von proinflammatorischen Zellen in der Lunge (CORRY ET AL. 2002). Eine antiinflammatorische Rolle von MMP2 wird auch von *knockout* Studien gestützt, die im Falle eines MMP2 *knockout* im RA-Modell einen gravierenderen Krankheitsverlauf zeigen als die Kontrollgruppe mit intaktem MMP2 (siehe 1.4.4).

Die Prozessierungsversuche mit MMP9 3.8.2 zeigten, dass MMP9 in der prolinreiche Region zwischen LRR 10 und 11 schneidet. Diese Region wurde bereits von OLLENDORFF ET AL. (1994) als besonders flexibel und geeignet für Proteolyse beschrieben. Bei der Prozessierung des GARP-TGF- β Komplexes entsteht ebenfalls ein distinktes Fragment. Liegt GARP_{TS} im Komplex vor werden zudem nur die GARP-Proteine geschnitten, die an latentes TGF- β gekoppelt vorliegen. Nach der Spaltung liegt das TGF- β gekoppelt am N-terminalen Teil von GARP vor. Die Prozessierung von MMP9 wird dabei durch die Bindung von ProTGF- β gehemmt. Scheinbar blockiert die Proform des TGF- β die Prozessierung entweder durch die Induktion einer Konformationsänderung innerhalb von GARP, sodass die Schnittstelle nicht mehr zugänglich ist, oder es blockiert sie selbst. Hier wäre dann der strukturelle Unterschied innerhalb des TGF- β für die Blockade der Schnittstelle verantwortlich.

MMP9 gilt als ein Hauptmediator von Autoimmunerkrankungen, wie RA und MS (siehe 1.4.4). Eine maßgebliche Rolle wird dabei der Produktion von Autoantigenen zugesprochen. Die Prozessierung von GARP stellt dabei den ersten Hinweis dar, dass MMP9 einen direkten Einfluss auf regulatorische Mechanismen des Immunsystems haben kann. Ein besonderer Fokus kommt den gebildeten N-terminalen Fragmenten zu, da sie von der Zellmembran „*gshedded*“ werden und so weitere Funktionen erfüllen können. Der C-terminale Teil wird anscheinend endocytiert und intrazellulär abgebaut. Von GAUTHY ET AL. (2013) wurden bereits lösliche GARP-TGF- β Komplexe im Überstand von T_{Regs} und GARP transfizierten Jurkat-Zellen gezeigt. Die dort identifizierten Komplexe weisen aber ein anderes Molekulargewicht auf als die in dieser Arbeit durch MMP9 produzierten. Bei GAUTHY ET AL. (2013) ist zudem kein Größenunterschied zwischen den löslichen und membrangebundenen GARP-TGF- β Komplexen zu erkennen. Dies spricht gegen die Theorie, dass diese Fragmente durch Proteolyse entstehen, da sonst

mindestens ein Größenunterschied von 5 kDa für den Verlust der Transmembrandomäne und des intrazellulären Teils zu beobachten wäre. Viel wahrscheinlicher ist, dass membrangebundene GARP-TGF- β Komplexe durch Exosomen oder Zellmembranfragmente nicht vom Zellüberstand abgetrennt wurden und so die Signale in die Proben der Zellüberstände gelangten. *In vivo* konnten bisher keine löslichen GARP-TGF- β Komplexe identifiziert werden. Solche Komplexe könnten zumindest in zwei Situationen von pathologischer Relevanz sein. Zum einen wären dies Autoimmunerkrankungen wie RA oder MS, die durch hohe MMP9 Spiegel gekennzeichnet sind und zum anderen die bereits für die Neutrophile Elastase diskutierte COPD. In beiden Situationen könnten die löslichen GARP-TGF- β Fragmente von Immunzellen, wie Neutrophilen Granulocyten oder T-Zellen selbst durch MMP9 Sezernierung gebildet werden.

Am Beispiel der RA und den beiden Gelatinasen MMP2 und MMP9 konnte gezeigt werden wie sich im Fall von GARP ein Degradierung (3.8.1), beziehungsweise eine spezifische Spaltung (3.8.2) auf den Verlauf der Erkrankung auswirken könnte. MMP9 beschleunigt und verschlimmert, MMP2 verzögert und verbessert dabei den Verlauf. Ein Grund für den progressiven Verlauf der Erkrankung liegt unter anderem in einem Funktionsverlust von regulatorischen T-Zellen. Die Proliferationsuntersuchungen und *Pull-Down* Versuche mit dem durch MMP9 erzeugten N-terminalem Fragment zeigten, dass dieses Fragment zwar in der Lage ist TGF- β zu binden, aber das für GARP typische, verstärkte TGF- β Signal ausbleibt. Der Grund hierfür könnte sein, dass die TGF- β Bindungsstelle auf dem N-terminalem Fragment liegt, aber die Sequenz für die TGF- β Aktivitätssteigerung auf dem C-terminalem Fragment. Das C-terminale Fragment wird jedoch wie in Zellkulturversuchen gezeigt wahrscheinlich internalisiert und abgebaut (Abb. 3.23). Dies hätte zur Folge, dass *in vivo* nach MMP9 Prozessierung Komplexe aus TGF- β und dem GARP N-Terminus vorhanden wären, diese aber nicht verstärkt aktivierbar wären, was zwangsläufig zu einem TGF- β Signalverlust führen würde. Dieser Verlust könnte eine Ursache für den in der RA beobachteten Funktionsverlust von T_{Regs} sein. Der Umstände, dass MMP2 generierte GARP Fragmente genauso wie tryptische Fragmente in der Lage sind, volle GARP-Funktionalität zu vermitteln, könnte erklären, warum MMP2 in dem erläuterten Szenario einen positiven Einfluss haben kann. MMP9 und MMP2 teilen sich zwar die eine erste gemeinsame Schnittstelle, MMP2 degradiert jedoch nach dem ersten Schnitt GARP komplett. Dabei könnten die für die später nötige TGF- β Aktivierungssteigerung nötigen Peptidsequenzen von der regulatorischen T-Zelle gelöst werden, bevor sie internalisiert und abgebaut werden können (Abb. 4.3). Somit würde MMP2 einen Beitrag zur Aufrechterhaltung des immunregulatorischen Status im Gelenk beitragen.

Ein Möglichkeit dieses Modell zu verifizieren, beziehungsweise einen therapeutischen

Ansatz zu entwickeln, wäre die Synthese von spezifischen Stoffen, die gezielt die erste Schnittstelle von MMP9 in GARP schützen und so die Proteolyse verhindern. Solch ein Stoff wäre zum Beispiel der Fab-Teil monoklonaler Antikörper gegen die prolinreiche Region des GARP, wie sie bereits von PROBST-KEPPER ET AL. (2009A) für FACS-Versuche verwendet wurden. Diese Fab-Fragmente könnten an der Schnittstelle binden und so der Protease den Zugang verwehren. Als Tiermodell bietet sich die in der Maus etablierte Kollagen induzierte Arthritis an.

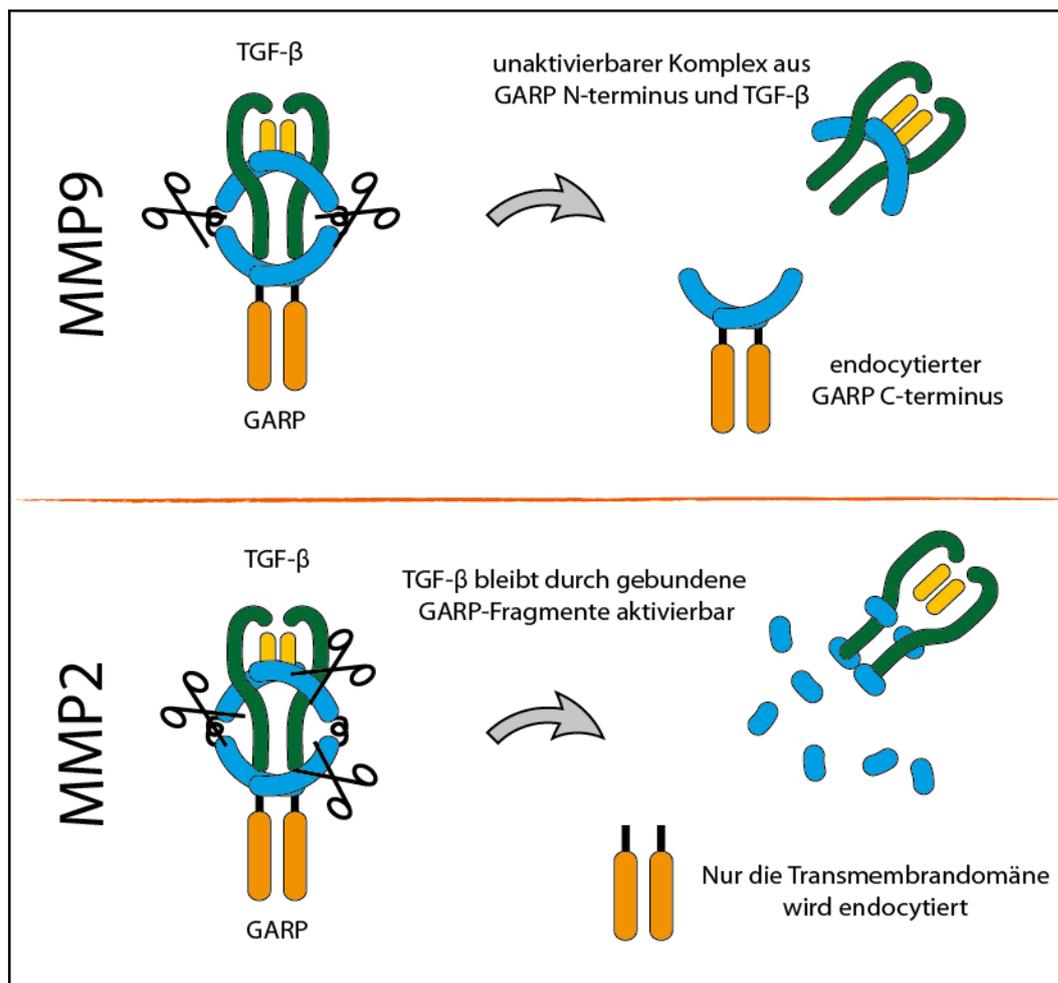


Abbildung 4.3.: Spaltung des GARP-TGF- β Komplexes durch MMP2 oder MMP9

Der GARP-TGF- β Komplex wird durch MMP9 gespalten, so dass der N-terminale Teil am TGF- β gebunden bleibt, der C-terminale aber endocytotiert wird. Das GARP-TGF- β Fragment ist nicht weiter aktivierbar (oben). Der GARP-TGF- β Komplex wird durch MMP2 degradiert, so dass sowohl Fragmente des N-terminalen, als auch des C-terminalen Teils am TGF- β gebunden bleiben und das TGF- β weiterhin aktivierbar bleibt (unten). Orange = Transmembrandomäne GARP, hellblau = LRR-Domänen GARP, grün = LAP, gelb = reifes TGF- β

4.5.3. Prozessierung von GARP durch Ovastacin

Ovastacin ist ebenso wie MMP9 in der Lage GARP einmalig an einer definierten Stelle zu schneiden. Dieser Schnitt trunkiert GARP N-terminal um etwa 20 kDa. Da die Säugerastacine ein sehr spezifisches Schnittmuster besitzen, lässt sich eine Schnittsequenz vermuten. Die bisher untersuchten Säugerastacine favorisieren in der *primed-side* (SCHECHTER UND BERGER 2012) eine diacide Aminosäuresequenz (BECKER-PAULY ET AL. 2011). Auch das bisher einzige für Ovastacin beschriebene *in vivo* Substrat ZP2 trägt solch eine Sequenz an der Schnittstelle S(164)RLA ↓ DENQ(171) (BURKART ET AL. 2012). In der GARP-Ektodomäne finden sich insgesamt drei solcher diaciden Motive. Sie liegen an den Positionen Glutamat 189 / Aspartat 190, Aspartat 429 / Glutamat 430 und Glutamat 606 / Glutamat 607. Durch das entstandene, N-terminale 20 kDa Fragment kommt nur die erste der drei Sequenzen als Schnittstelle in Frage. Die relative molekulare Masse dieses Fragmentes beträgt 20 kDa, was mit der gemessenen Größe übereinstimmt. Auch das Isoleucin in der P1-Position stimmt mit der Präferenz für Astacinproteasen, die dort vor allem aliphatische Aminosäuren bevorzugen, überein. Die beiden anderen potentiellen Schnittstellen würden zu weit größeren N-terminalen Fragmenten führen (Abb. 4.4) und besitzen beide ein für Astacinproteasen ungünsti-

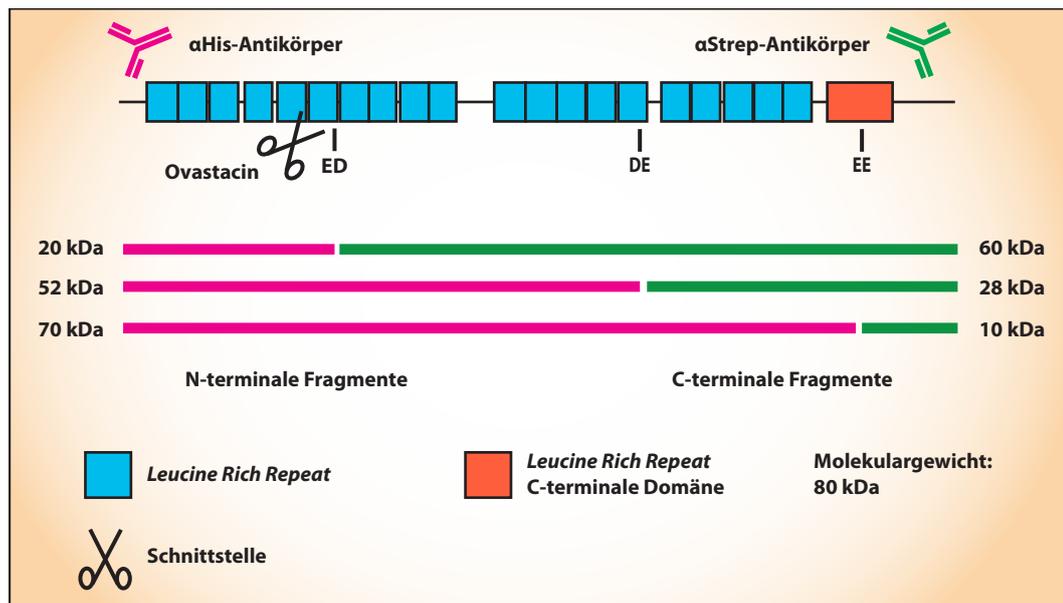


Abbildung 4.4.: **Schema der Fragmentierung von GARP_{TS} durch Ovastacin**
Schematische Darstellung der Fragmentierung von GARP_{TS} durch Ovastacin. GARP_{TS} besitzt drei diacide Aminosäuresequenzen innerhalb der Ektodomäne, die potentiell von Ovastacin geschnitten werden könnten. Die daraus resultierenden Fragmente beinhalten neo N-termini von 20 kDa, 52 kDa und 70 kDa.

ges Prolin in der P1-Position. GARP ist somit das zweite für Ovastacin beschriebene Proteinsubstrat, das *in vitro* prozessiert wird. Die Schnittstelle liegt dabei vermutlich in der Sequenz L(195)MDI ↓ EDGA(192). Von besonderem Interesse könnte dabei in Zukunft sein, dass diese Sequenz rein Ovastacin spezifisch ist und von keinem anderen Astacin durchgeführt wird. Dies könnte genutzt werden, um hochspezifische Sonden oder Inhibitoren zu synthetisieren, die nur ein Minimum an Kreuzreaktivität aufweisen.

4.6. Einfluss auf zukünftige Arbeiten und Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse über den GARP-TGF- β Komplex und seine Spaltung können auf verschiedenen Wegen einen Einfluss auf die zukünftige Forschung haben. Die Identifikation der für die Bindung und Aktivierbarkeitssteigerung von TGF- β verantwortlichen Fragmente sollten im Mittelpunkt zukünftiger Arbeiten stehen. Diese Peptide könnten rekombinant in translationalen Studien genutzt werden um zu untersuchen ob eine Immunsuppression *in vivo* erzielt werden kann. Ein mögliches Anwendungsgebiet wären die Behandlung von *graft-versus-host disease*, wie sie bereits für den *full-length* GARP durchgeführt wurden (HAHN ET AL. 2013). Weitere Szenarien wären der Einsatz von GARP-Peptiden bei überschießenden Immunreaktionen oder Autoimmunerkrankungen. Hier könnte GARP als Ergänzung oder Ersatz klassischer Immunsuppressiva eingesetzt werden, welcher spezifischer wirkt und weniger Nebenwirkungen verursachen könnte.

Ein weiterer potenzieller Ansatzpunkt wäre die Prozessierung von GARP durch MMP9, einem Hauptmediator rheumatoider Arthritis. Es besteht die Möglichkeit, dass die MMP9 vermittelte Generation von löslichen N-terminalen GARP-Fragmenten am Verlust der regulatorischen Eigenschaften von T_{Regs} in RA beteiligt ist. Dies müsste in einem *in vivo* Modell verifiziert werden um anschließend spezifische und angepasste Inhibitoren zu generieren und deren Wirksamkeit zu testen.

Abschließend könnte die für Ovastacin detektierte Schnittstelle untersucht werden. Sie konnte von keiner anderen Astacinprotease geschnitten werden. Ein synthetisches Substrat, welches die Aminosäuresequenz der Ovastacin Schnittstelle trägt, könnte als spezifische Sonde für Ovastacin fungieren. Ovastacin wird in verschiedenen Ovarialkarzinomen exprimiert (QUESADA ET AL. 2004). Ein spezifisches Substrat birgt die Möglichkeit Ovastacin als Marker für diese Tumorentität zu nutzen.

Literaturverzeichnis

- Absher M., Baldor L. und Kelley J. (1991). A rapid colorimetric bioassay for transforming growth factor beta (TGF-beta) using a microwell plate reader, *J. Immunol. Methods* **138**(2): 301–303.
- Acha-Orbea H., Godrick E., Gold M. und McKay D. (2012). Kapitel 1 - Basic Concepts in Immunology, in K. Murphy (Hrsg.), *Janeways's Immunobiology*, 8. Auflage, London und New York: Garland Science.
- Aimes R. T. und Quigley J. P. (1995). Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments, *J. Biol. Chem.* **270**(11): 5872–5876.
- Alvarado-Sanchez B., Hernandez-Castro B., Portales-Perez D., Baranda L., Layseca-Espinosa E., Abud-Mendoza C., Cubillas-Tejeda A. C. und Gonzalez-Amaro R. (2006). Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus, *J. Autoimmun.* **27**(2): 110–118.
- Annes J. P., Chen Y., Munger J. S. und Rifkin D. B. (2004). Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1, *J. Cell Biol.* **165**(5): 723–734.
- Ashcroft G. S., Lei K., Jin W., Longenecker G., Kulkarni A. B., Greenwell-Wild T., Hale-Donze H., McGrady G., Song X. Y. und Wahl S. M. (2000). Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing, *Nat. Med.* **6**(10): 1147–1153.
- Asseman C., Mauze S., Leach M. W., Coffman R. L. und Powrie F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation, *J. Exp. Med.* **190**(7): 995–1004.
- Barnes P. J. und Stockley R. A. (2005). COPD: current therapeutic interventions and future approaches, *Eur. Respir. J.* **25**(6): 1084–1106.

- Becker C., Kruse M. N., Slotty K. A., Köhler D., Harris J. R., Rösmann S., Sterchi E. E. und Stöcker W. (2003). Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin, *Biol. Chem.* **384**(5): 825–831.
- Becker-Pauly C., Barre O., Schilling O., Auf dem Keller U., Ohler A., Broder C., Schütte A., Kappelhoff R., Stöcker W. und Overall C. M. (2011). Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates, *Mol. Cell Proteomics* **10**(9): M111.009233.
- Bella J., Hindle K. L., McEwan P. A. und Lovell S. C. (2008). The leucine-rich repeat structure, *Cell. Mol. Life Sci.* **65**(15): 2307–2333.
- Belvisi M. G. und Bottomley K. M. (2003). The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs?, *Inflamm. Res.* **52**(3): 95–100.
- Benson H. L., Mobashery S., Chang M., Kheradmand F., Hong J. S., Smith G. N., Shilling R. A. und Wilkes D. S. (2011). Endogenous matrix metalloproteinases 2 and 9 regulate activation of CD4+ and CD8+ T cells, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **44**(5): 700–708.
- Berry R., Jowitt T. A., Ferrand J., Roessle M., Grossmann J. G., Canty-Laird E. G., Kammerer R. A., Kadler K. E. und Baldock C. (2009). Role of dimerization and substrate exclusion in the regulation of bone morphogenetic protein-1 and mammalian tolloid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**(21): 8561–8566.
- Bevan M., Carbone F., Griffiths G., Heath B., O’Garra A., Reiner S. und Stockinger B. (2012). Kapitel 8 - The Development and Survival of Lymphocytes, in K. Murphy (Hrsg.), *Janeway’s Immunobiology*, 8. Auflage, London und New York: Garland Science.
- Biernacka A., Dobaczewski M. und Frangogiannis N. G. (2011). TGF-beta signaling in fibrosis, *Growth Factors* **29**(5): 196–202.
- Bode W., Gomis-Rüth F. X., Huber R., Zwillig R. und Stöcker W. (1992). Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases, *Nature* **358**(6382): 164–167.
- Bode W., Gomis-Rüth F. X. und Stöcker W. (1993). Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXX-HXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the ‘metzincins’, *FEBS Lett.* **331**(1-2): 134–140.

- Bond J. S. und Beynon R. J. (1995). The astacin family of metalloendopeptidases, *Protein Sci.* **4**(7): 1247–1261.
- Bopp T., Becker C., Klein M., Klein-Hessling S., Palmetshofer A., Serfling E., Heib V., Becker M., Kubach J., Schmitt S., Stoll S., Schild H., Staeger M. S., Stassen M., Jonuleit H. und Schmitt E. (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression, *J. Exp. Med.* **204**(6): 1303–1310.
- Born W. K., Reardon C. L. und O'Brien R. L. (2006). The function of gammadelta T cells in innate immunity, *Curr. Opin. Immunol.* **18**(1): 31–38.
- Briso E. M., Dienz O. und Rincon M. (2008). Cutting edge: soluble IL-6R is produced by IL-6R ectodomain shedding in activated CD4 T cells, *J. Immunol.* **180**(11): 7102–7106.
- Brown P. D., Wakefield L. M., Levinson A. D. und Sporn M. B. (1990). Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3, *Growth Factors* **3**(1): 35–43.
- Brunkow M. E., Jeffery E. W., Hjerrild K. A., Paepfer B., Clark L. B., Yasayko S. A., Wilkinson J. E., Galas D., Ziegler S. F. und Ramsdell F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse, *Nat. Genet.* **27**(1): 68–73.
- Buckley C. D., Pilling D., Henriquez N. V., Parsonage G., Threlfall K., Scheel-Toellner D., Simmons D. L., Akbar A. N., Lord J. M. und Salmon M. (1999). RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation, *Nature* **397**(6719): 534–539.
- Bugge T. H., Flick M. J., Daugherty C. C. und Degen J. L. (1995). Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction, *Genes Dev.* **9**(7): 794–807.
- Burkart A. D., Xiong B., Baibakov B., Jimenez-Movilla M. und Dean J. (2012). Ova-stacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy, *J. Cell Biol.* **197**(1): 37–44.
- Buscemi L., Ramonet D., Klingberg F., Formey A., Smith-Clerc J., Meister J. J. und Hinz B. (2011). The single-molecule mechanics of the latent TGF-beta complex, *Curr. Biol.* **21**(24): 2046–2054.
- Cantor H., Shen F. W. und Boyse E. A. (1976). Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. II. Activation by antigen:

- after immunization, antigen-specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T-cell subclasses, *J. Exp. Med.* **143**(6): 1391–1340.
- Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K. J., Li L., Marinos N., McGrady G. und Wahl S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3, *J. Exp. Med.* **198**(12): 1875–1886.
- Chua F., Dunsmore S. E., Clingen P. H., Mutsaers S. E., Shapiro S. D., Segal A. W., Roes J. und Laurent G. J. (2007). Mice lacking neutrophil elastase are resistant to bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *Am. J. Pathol.* **170**(1): 65–74.
- Collison L. W., Chaturvedi V., Henderson A. L., Giacomin P. R., Guy C., Bankoti J., Finkelstein D., Forbes K., Workman C. J., Brown S. A., Rehg J. E., Jones M. L., Ni H. T., Artis D., Turk M. J. und Vignali D. A. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population, *Nat. Immunol.* **11**(12): 1093–1101.
- Collison L. W., Workman C. J., Kuo T. T., Boyd K., Wang Y., Vignali K. M., Cross R., Sehy D., Blumberg R. S. und Vignali D. A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function, *Nature* **450**(7169): 566–569.
- Corry D. B., Rishi K., Kanellis J., Kiss A., Song Lz L. Z., Xu J., Feng L., Werb Z. und Kheradmand F. (2002). Decreased allergic lung inflammatory cell egression and increased susceptibility to asphyxiation in MMP2-deficiency, *Nat. Immunol.* **3**(4): 347–353.
- Crawford S. E., Stellmach V., Murphy-Ullrich J. E., Ribeiro S. M., Lawler J., Hynes R. O., Boivin G. P. und Bouck N. (1998). Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo, *Cell* **93**(7): 1159–1170.
- Deaglio S., Dwyer K. M., Gao W., Friedman D., Usheva A., Erat A., Chen J. F., Enjyoji K., Linden J., Oukka M., Kuchroo V. K., Strom T. B. und Robson S. C. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression, *J. Exp. Med.* **204**(6): 1257–1265.
- Dietzel E., Wessling J., Floehr J., Schäfer C., Ensslen S., Denecke B., Rosing B., Neulen J., Veitinger T., Spehr M., Tropartz T., Tolba R., Renne T., Egert A., Schorle H., Gottenbusch Y., Hildebrand A., Yiallourous I., Stöcker W., Weiskirchen R. und Jahnen-Dechent W. (2013). Fetuin-B, a liver-derived plasma protein is essential for fertilization, *Dev. Cell* **25**(1): 106–112.
- Dubois B., Masure S., Hurtenbach U., Paemen L., Heremans H., van den Oord J., Sciot R., Meinhardt T., Hammerling G., Opendakker G. und Arnold B. (1999). Resistance

- of young gelatinase B-deficient mice to experimental autoimmune encephalomyelitis and necrotizing tail lesions, *J. Clin. Invest.* **104**(11): 1507–1515.
- Dubois C. M., Laprise M. H., Blanchette F., Gentry L. E. und Leduc R. (1995). Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase, *J. Biol. Chem.* **270**(18): 10618–10624.
- Dufour A. und Overall C. M. (2013). Missing the target: matrix metalloproteinase antitargets in inflammation and cancer, *Trends Pharmacol. Sci.* **34**(4): 233–242.
- Edwards J. P., Fujii H., Zhou A. X., Creemers J., Unutmaz D. und Shevach E. M. (2013). Regulation of the expression of GARP/latent TGF-Beta complexes on mouse T cells and their role in regulatory T cell and Th17 differentiation, *J. Immunol.* **190**(11): 5506–5515.
- Edwards J. P., Thornton A. M. und Shevach E. M. (2014). Release of Active TGF-Beta from the Latent TGF-Beta/GARP Complex on T Regulatory Cells Is Mediated by Integrin Beta, *J. Immunol.* .
- Ehrenstein M. R., Evans J. G., Singh A., Moore S., Warnes G., Isenberg D. A. und Mauri C. (2004). Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy, *J. Exp. Med.* **200**(3): 277–285.
- English W. R., Holtz B., Vogt G., Knauper V. und Murphy G. (2001). Characterization of the role of the "MT-loop": an eight-amino acid insertion specific to progelatinase A (MMP2) activating membrane-type matrix metalloproteinases, *J. Biol. Chem.* **276**(45): 42018–42026.
- Enkhbayar P., Kamiya M., Osaki M., Matsumoto T. und Matsushima N. (2004). Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins, *Proteins* **54**(3): 394–403.
- Eswar N., Webb B., Marti-Renom M. A., Madhusudhan M. S., Eramian D., Shen M. Y., Pieper U. und Sali A. (2006). Comparative protein structure modeling using Modeller, *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 5**: Unit 5.6.
- Ewald S. E., Lee B. L., Lau L., Wickliffe K. E., Shi G. P., Chapman H. A. und Barton G. M. (2008). The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor, *Nature* **456**(7222): 658–662.
- Ezzie M. E., Piper M. G., Montague C., Newland C. A., Opalek J. M., Baran C., Ali N., Brigstock D., Lawler J. und Marsh C. B. (2011). Thrombospondin-1-deficient mice are not protected from bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **44**(4): 556–561.

- Fahlen L., Read S., Gorelik L., Hurst S. D., Coffman R. L., Flavell R. A. und Powrie F. (2005). T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells, *J. Exp. Med.* **201**(5): 737–746.
- Fallarino F., Grohmann U., Hwang K. W., Orabona C., Vacca C., Bianchi R., Belladonna M. L., Fioretti M. C., Alegre M. L. und Puccetti P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells, *Nat. Immunol.* **4**(12): 1206–1212.
- Finlay G. J., Baguley B. C. und Wilson W. R. (1984). A semiautomated microculture method for investigating growth inhibitory effects of cytotoxic compounds on exponentially growing carcinoma cells, *Anal. Biochem.* **139**(2): 272–277.
- Fontenot J. D., Gavin M. A. und Rudensky A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells, *Nat. Immunol.* **4**(4): 330–336.
- Fontenot J. D., Rasmussen J. P., Gavin M. A. und Rudensky A. Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells, *Nat. Immunol.* **6**(11): 1142–1151.
- Garin M. I., Chu C. C., Golshayan D., Cernuda-Morollon E., Wait R. und Lechler R. I. (2007). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells, *Blood* **109**(5): 2058–2065.
- Gauthy E., Cuende J., Stockis J., Huygens C., Lethe B., Collet J. F., Bommer G., Coulie P. G. und Lucas S. (2013). GARP Is Regulated by miRNAs and Controls Latent TGF-beta Production by Human Regulatory T Cells, *PLoS ONE* **8**(9): e76186.
- Ge G. und Greenspan D. S. (2006). BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein, *J. Cell Biol.* **175**(1): 111–120.
- Gijbels K., Proost P., Masure S., Carton H., Billiau A. und Opdenakker G. (1993). Gelatinase B is present in the cerebrospinal fluid during experimental autoimmune encephalomyelitis and cleaves myelin basic protein, *J. Neurosci. Res.* **36**(4): 432–440.
- Giroux M., Yurchenko E., St-Pierre J., Piccirillo C. A. und Perreault C. (2007). T regulatory cells control numbers of NK cells and CD8alpha+ immature dendritic cells in the lymph node paracortex, *J. Immunol.* **179**(7): 4492–4502.
- Gleizes P. E., Beavis R. C., Mazzieri R., Shen B. und Rifkin D. B. (1996). Identification and characterization of an eight-cysteine repeat of the latent transforming growth factor-beta binding protein-1 that mediates bonding to the latent transforming growth factor-beta1, *J. Biol. Chem.* **271**(47): 29891–29896.

- Gomis-Rüth F. X. (2003). Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases, *Mol. Biotechnol.* **24**(2): 157–202.
- Gomis-Rüth F. X., Trillo-Muyo S. und Stöcker W. (2012). Functional and structural insights into astacin metallopeptidases, *Biol. Chem.* **393**(10): 1027–1041.
- Gonzalez-Gronow M., Edelberg J. M. und Pizzo S. V. (1989). Further characterization of the cellular plasminogen binding site: evidence that plasminogen 2 and lipoprotein a compete for the same site, *Biochemistry* **28**(6): 2374–2377.
- Grainger D. J., Wakefield L., Bethell H. W., Farndale R. W. und Metcalfe J. C. (1995). Release and activation of platelet latent TGF-beta in blood clots during dissolution with plasmin, *Nat. Med.* **1**(9): 932–937.
- Green E. A., Gorelik L., McGregor C. M., Tran E. H. und Flavell R. A. (2003). CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**(19): 10878–10883.
- Greenfield N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat Protoc* **1**(6): 2876–2890.
- Grillet B., Dequeker J., Paemen L., Van Damme B. und Opdenakker G. (1997). Gelatinase B in chronic synovitis: immunolocalization with a monoclonal antibody, *Br. J. Rheumatol.* **36**(7): 744–747.
- Grossman W. J., Verbsky J. W., Tollefsen B. L., Kemper C., Atkinson J. P. und Ley T. J. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells, *Blood* **104**(9): 2840–2848.
- Guevara T., Yiallourous I., Kappelhoff R., Bissdorf S., Stöcker W. und Gomis-Rüth F. X. (2010). Proenzyme structure and activation of astacin metallopeptidase, *J. Biol. Chem.* **285**(18): 13958–13965.
- Haas J., Hug A., Viehover A., Fritzsching B., Falk C. S., Filser A., Vetter T., Milkova L., Korporal M., Fritz B., Storch-Hagenlocher B., Krammer P. H., Suri-Payer E. und Wildemann B. (2005). Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis, *Eur. J. Immunol.* **35**(11): 3343–3352.
- Hahn D., Pischitzis A., Roesmann S., Hansen M. K., Leuenberger B., Luginbuehl U. und Sterchi E. E. (2003). Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced ectodomain

- shedding and phosphorylation of the human meprinbeta metalloprotease, *J. Biol. Chem.* **278**(44): 42829–42839.
- Hahn S. A., Stahl H. F., Becker C., Correll A., Schneider F. J., Tuettenberg A. und Jonuleit H. (2013). Soluble GARP has potent antiinflammatory and immunomodulatory impact on human CD4+ T cells, *Blood* **122**(7): 1182–1191.
- Hamilton J. A. (2008). Plasminogen Activator/Plasmin System in Arthritis and Inflammation: Friend or Foe?, *Arthritis and Rheumatism* **58**(3): 645–648.
- Haribhai D., Lin W., Edwards B., Ziegelbauer J., Salzman N. H., Carlson M. R., Li S. H., Simpson P. M., Chatila T. A. und Williams C. B. (2009). A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis, *J. Immunol.* **182**(6): 3461–3468.
- He X., Jia H., Jing Z. und Liu D. (2013). Recognition of pathogen-associated nucleic acids by endosomal nucleic acid-sensing toll-like receptors, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **45**(4): 241–258.
- Henderson I. C., Lieber M. M. und Todaro G. J. (1974). Mink cell line Mv 1 Lu (CCL 64). Focus formation and the generation of "nonproducer" transformed cell lines with murine and feline sarcoma viruses, *Virology* **60**(1): 282–287.
- Hintze V., Höwel C., wermter C., Grosse-Berkhoff E., Becker-Pauly C., Beermann B., Yiallourus I. und Stöcker W. (2006). The Interaction of Recombinant Subdomains of the Procollagen C-Proteinase with Procollagen I Provides a Quantitative Explanation for Functional Differences between the Two Splice Variants, Mammalian Tolloid and Bone Morphogenetic Protein 1, *Biochem.* **45**(21): 6741–6748.
- Holtmeier W. und Kabelitz D. (2005). gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses, *Chem Immunol Allergy* **86**: 151–183.
- Hopkins D. R., Keles S. und Greenspan D. S. (2007). The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases, *Matrix Biol.* **26**(7): 508–523.
- Hori S., Nomura T. und Sakaguchi S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3, *Science* **299**(5609): 1057–1061.
- Hub J. S., Winkler F. K., Merrick M. und de Groot B. L. (2010). Potentials of mean force and permeabilities for carbon dioxide, ammonia, and water flux across a Rhesus protein channel and lipid membranes, *J. Am. Chem. Soc.* **132**(38): 13251–13263.
- Huelsenbeck J. P. und Ronquist F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees, *Bioinformatics* **17**(8): 754–755.

- Huson D. H. und Scornavacca C. (2012). Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks, *Syst. Biol.* **61**(6): 1061–1067.
- Huter E. N., Punkosdy G. A., Glass D. D., Cheng L. I., Ward J. M. und Shevach E. M. (2008). TGF-beta-induced Foxp3+ regulatory T cells rescue scurfy mice, *Eur. J. Immunol.* **38**(7): 1814–1821.
- Huxley-Jones J., Clarke T. K., Beck C., Toubaris G., Robertson D. L. und Boot-Handford R. P. (2007). The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*, *BMC Evol. Biol.* **7**: 63.
- Hwang C., Sinskey A. J. und Lodish H. F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum, *Science* **257**(5076): 1496–1502.
- Itoh T., Matsuda H., Tanioka M., Kuwabara K., Itohara S. und Suzuki R. (2002). The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis, *J. Immunol.* **169**(5): 2643–2647.
- Ivanov I. I., Zhou L. und Littman D. R. (2007). Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation, *Semin. Immunol.* **19**(6): 409–417.
- Janitz M., Heiser V., Bottcher U., Landt O. und Lauster R. (1998). Three alternatively spliced variants of the gene coding for the human bone morphogenetic protein-1, *J. Mol. Med.* **76**(2): 141–146.
- Jefferson T., Auf dem Keller U., Bellac C., Metz V. V., Broder C., Hedrich J., Ohler A., Maier W., Magdolen V., Sterchi E., Bond J. S., Jayakumar A., Traupe H., Chalaris A., Rose-John S., Pietrzik C. U., Postina R., Overall C. M. und Becker-Pauly C. (2013). The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin beta and ADAM10, *Cell. Mol. Life Sci.* **70**(2): 309–333.
- Jocelyn P. C. (1967). The standard redox potential of cysteine-cystine from the thiol-disulphide exchange reaction with glutathione and lipoic acid, *Eur. J. Biochem.* **2**(3): 327–331.
- Jonuleit H. und Schmitt E. (2005). Regulatory T-cells in antitumor therapy: isolation and functional testing of CD4+CD25+ regulatory T-cells, *Methods Mol. Med.* **109**: 285–296.
- Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M., Tuettenberg A., Knop J. und Enk A. H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with

- regulatory properties isolated from peripheral blood, *J. Exp. Med.* **193**(11): 1285–1294.
- Kang D., Gho Y. S., Suh M. und Kang C. (2002). Highly sensitive and fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, *Bull. Korean. Chem. Soc.* **23**: 1511–1512.
- Kim H. M., Oh S. C., Lim K. J., Kasamatsu J., Heo J. Y., Park B. S., Lee H., Yoo O. J., Kasahara M. und Lee J. O. (2007). Structural diversity of the hagfish variable lymphocyte receptors, *J. Biol. Chem.* **282**(9): 6726–6732.
- Koenders M. I., Kolls J. K., Oppers-Walgreen B., van den Bersselaar L., Joosten L. A., Schurr J. R., Schwarzenberger P., van den Berg W. B. und Lubberts E. (2005). Interleukin-17 receptor deficiency results in impaired synovial expression of interleukin-1 and matrix metalloproteinases 3, 9, and 13 and prevents cartilage destruction during chronic reactivated streptococcal cell wall-induced arthritis, *Arthritis Rheum.* **52**(10): 3239–3247.
- Kriegel M. A., Lohmann T., Gabler C., Blank N., Kalden J. R. und Lorenz H. M. (2004). Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II, *J. Exp. Med.* **199**(9): 1285–1291.
- Krishnan P., Hocking A. M., Scholtz J. M., Pace C. N., Holik K. K. und McQuillan D. J. (1999). Distinct secondary structures of the leucine-rich repeat proteoglycans decorin and biglycan. Glycosylation-dependent conformational stability, *J. Biol. Chem.* **274**(16): 10945–10950.
- Kulkarni A. B. und Karlsson S. (1993). Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease, *Am. J. Pathol.* **143**(1): 3–9.
- Kyhse-Andersen J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**(3-4): 203–209.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**(5259): 680–685.
- Laurence A., Tato C. M., Davidson T. S., Kanno Y., Chen Z., Yao Z., Blank R. B., Meylan F., Siegel R., Hennighausen L., Shevach E. M. und O'shea J. J. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation, *Immunity* **26**(3): 371–381.

- Leppert D., Waubant E., Galardy R., Bunnett N. W. und Hauser S. L. (1995). T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro, *J. Immunol.* **154**(9): 4379–4389.
- Leuck M. (2013). Die Rolle von Astacin-Proteasen in der TGF-Beta Aktivierung, *Masterarbeit*.
- Li H., Yu J. P., Cao S., Wei F., Zhang P., An X. M., Huang Z. T. und Ren X. B. (2007). CD4 +CD25 + regulatory T cells decreased the antitumor activity of cytokine-induced killer (CIK) cells of lung cancer patients, *J. Clin. Immunol.* **27**(3): 317–326.
- Liang B., Workman C., Lee J., Chew C., Dale B. M., Colonna L., Flores M., Li N., Schweighoffer E., Greenberg S., Tybulewicz V., Vignali D. und Clynes R. (2008). Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II, *J. Immunol.* **180**(9): 5916–5926.
- Lindley S., Dayan C. M., Bishop A., Roep B. O., Peakman M. und Tree T. I. (2005). Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes, *Diabetes* **54**(1): 92–99.
- Liu J., Zhang Z., Chai L., Che Y., Min S. und Yang R. (2013). Identification and characterization of a unique leucine-rich repeat protein (LRRC33) that inhibits Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **434**(1): 28–34.
- Lopez-Otin C. und Bond J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease, *J. Biol. Chem.* **283**(45): 30433–30437.
- Lopez-Otin C. und Matrisian L. M. (2007). Emerging roles of proteases in tumour suppression, *Nat. Rev. Cancer* **7**(10): 800–808.
- Loser K., Apelt J., Voskort M., Mohaupt M., Balkow S., Schwarz T., Grabbe S. und Beissert S. (2007). IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice, *J. Immunol.* **179**(1): 365–371.
- Lu L. F., Lind E. F., Gondek D. C., Bennett K. A., Gleeson M. W., Pino-Lagos K., Scott Z. A., Coyle A. J., Reed J. L., Van Snick J., Strom T. B., Zheng X. X. und Noelle R. J. (2006). Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance, *Nature* **442**(7106): 997–1002.
- Macaulay I. C., Tijssen M. R., Thijssen-Timmer D. C., Gusnanto A., Steward M., Burns P., Langford C. F., Ellis P. D., Dudbridge F., Zwaginga J. J., Watkins N. A., van der Schoot C. E. und Ouwehand W. H. (2007). Comparative gene expression profiling of

- in vitro differentiated megakaryocytes and erythroblasts identifies novel activatory and inhibitory platelet membrane proteins, *Blood* **109**(8): 3260–3269.
- Manka S. W., Carafoli F., Visse R., Bihan D., Raynal N., Farndale R. W., Murphy G., Enghild J. J., Hohenester E. und Nagase H. (2012). Structural insights into triple-helical collagen cleavage by matrix metalloproteinase 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**(31): 12461–12466.
- Mann M. K., Maresz K., Shriver L. P., Tan Y. und Dittel B. N. (2007). B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Immunol.* **178**(6): 3447–3456.
- McMahon G. A., Dignam J. D. und Gentry L. E. (1996). Structural characterization of the latent complex between transforming growth factor beta 1 and beta 1-latency-associated peptide, *Biochem. J.* **313** (Pt 1): 343–351.
- Misra N., Bayry J., Lacroix-Desmazes S., Kazatchkine M. D. und Kaveri S. V. (2004). Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells, *J. Immunol.* **172**(8): 4676–4680.
- Mu D., Cambier S., Fjellbirkeland L., Baron J. L., Munger J. S., Kawakatsu H., Sheppard D., Broaddus V. C. und Nishimura S. L. (2002). The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1, *J. Cell Biol.* **157**(3): 493–507.
- Munger J. S., Huang X., Kawakatsu H., Griffiths M. J., Dalton S. L., Wu J., Pittet J. F., Kaminski N., Garat C., Matthay M. A., Rifkin D. B. und Sheppard D. (1999). The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis, *Cell* **96**(3): 319–328.
- Murphy G., McAlpine C. G., Poll C. T. und Reynolds J. J. (1985). Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and types IV and V collagen, *Biochim. Biophys. Acta* **831**(1): 49–58.
- Murphy G., Segain J. P., O’Shea M., Cockett M., Ioannou C., Lefebvre O., Chambon P. und Basset P. (1993). The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase, *J. Biol. Chem.* **268**(21): 15435–15441.
- Nakamura K., Kitani A. und Strober W. (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta, *J. Exp. Med.* **194**(5): 629–644.

- Niedbala W., Wei X. Q., Cai B., Hueber A. J., Leung B. P., McInnes I. B. und Liew F. Y. (2007). IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells, *Eur. J. Immunol.* **37**(11): 3021–3029.
- O'Connor M. N., Salles I. I., Cvejic A., Watkins N. A., Walker A., Garner S. F., Jones C. I., Macaulay I. C., Steward M., Zwaginga J. J., Bray S. L., Dudbridge F., de Bono B., Goodall A. H., Deckmyn H., Stemple D. L. und Ouwehand W. H. (2009). Functional genomics in zebrafish permits rapid characterization of novel platelet membrane proteins, *Blood* **113**(19): 4754–4762.
- Oderup C., Cederbom L., Makowska A., Cilio C. M. und Ivars F. (2006). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression, *Immunology* **118**(2): 240–249.
- Ohler A., Debela M., Wagner S., Magdolen V. und Becker-Pauly C. (2010). Analyzing the protease web in skin: meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation, *Biol. Chem.* **391**(4): 455–460.
- Ohuchi E., Imai K., Fujii Y., Sato H., Seiki M. und Okada Y. (1997). Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules, *J. Biol. Chem.* **272**(4): 2446–2451.
- Ollendorff V., Noguchi T., deLapeyriere O. und Birnbaum D. (1994). The GARP gene encodes a new member of the family of leucine-rich repeat-containing proteins, *Cell Growth Differ.* **5**(2): 213–219.
- Opdenakker G., Dillen C., Fiten P., Martens E., Van Aelst I., Van den Steen P. E., Nelissen I., Starckx S., Descamps F. J., Hu J., Piccard H., Van Damme J., Wormald M. R., Rudd P. M. und Dwek R. A. (2006). Remnant epitopes, autoimmunity and glycosylation, *Biochim. Biophys. Acta* **1760**(4): 610–615.
- Ouyang W., Lohning M., Gao Z., Assenmacher M., Ranganath S., Radbruch A. und Murphy K. M. (2000). Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment, *Immunity* **12**(1): 27–37.
- Page M. J. und Di Cera E. (2008). Serine peptidases: classification, structure and function, *Cell. Mol. Life Sci.* **65**(7-8): 1220–1236.

- Parks W. C., Wilson C. L. und Lopez-Boado Y. S. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.* **4**(8): 617–629.
- Plaut G. W. (1978). p-Nitrobenzyl p-toluenesulfonyl-L-arginine: a chromogenic substrate for thrombin, plasmin and trypsin, *Haemostasis* **7**(2-3): 105–108.
- Probst-Kepper M., Geffers R., Kroger A., Viegas N., Erck C., Hecht H. J., Lunsdorf H., Roubin R., Moharreggh-Khiabani D., Wagner K., Ocklenburg F., Jeron A., Garritsen H., Arstila T. P., Kekalainen E., Balling R., Hauser H., Buer J. und Weiss S. (2009b). GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells, *J. Cell. Mol. Med.* **13**(9B): 3343–3357.
- Probst-Kepper M., Kroger A., Garritsen H. S. und Buer J. (2009a). Perspectives on Regulatory T Cell Therapies, *Transfus Med Hemother* **36**(5): 302–308.
- Qi R., Singh D. und Kao C. C. (2012). Proteolytic processing regulates Toll-like receptor 3 stability and endosomal localization, *J. Biol. Chem.* **287**(39): 32617–32629.
- Quesada V., Sanchez L. M., Alvarez J. und Lopez-Otin C. (2004). Identification and characterization of human and mouse ovastacin: a novel metalloproteinase similar to hatching enzymes from arthropods, birds, amphibians, and fish, *J. Biol. Chem.* **279**(25): 26627–26634.
- Rast J. P. und Buckley K. M. (2013). Lamprey immunity is far from primitive, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**(15): 5746–5747.
- Ren X., Ye F., Jiang Z., Chu Y., Xiong S. und Wang Y. (2007). Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells, *Cell Death Differ.* **14**(12): 2076–2084.
- Ribeiro S. M., Poczatek M., Schultz-Cherry S., Villain M. und Murphy-Ullrich J. E. (1999). The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta, *J. Biol. Chem.* **274**(19): 13586–13593.
- Roubin R., Pizette S., Ollendorff V., Planche J., Birnbaum D. und Delapeyriere O. (1996). Structure and developmental expression of mouse Garp, a gene encoding a new leucine-rich repeat-containing protein, *Int. J. Dev. Biol.* **40**(3): 545–555.
- Sadlon T. J., Wilkinson B. G., Pederson S., Brown C. Y., Bresatz S., Gargett T., Melville E. L., Peng K., D'Andrea R. J., Glonek G. G., Goodall G. J., Zola H., Shannon

- M. F. und Barry S. C. (2010). Genome-wide identification of human FOXP3 target genes in natural regulatory T cells, *J. Immunol.* **185**(2): 1071–1081.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A. und Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* **230**(4732): 1350–1354.
- Sakaguchi S., Fukuma K., Kuribayashi K. und Masuda T. (1985). Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease, *J. Exp. Med.* **161**(1): 72–87.
- Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M. und Toda M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases, *J. Immunol.* **155**(3): 1151–1164.
- Sakaguchi S., Takahashi T. und Nishizuka Y. (1982). Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis, *J. Exp. Med.* **156**(6): 1577–1586.
- Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2. Auflage, Plainview und New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato Y. und Rifkin D. B. (1989). Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture, *J. Cell Biol.* **109**(1): 309–315.
- Schaller J. und Gerber S. S. (2011). The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects, *Cell. Mol. Life Sci.* **68**(5): 785–801.
- Schechter I. und Berger A. (2012). Reprint of: On the size of the active site in proteases. I. Papain. 1967, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**(3): 497–502.
- Schütte A., Hedrich J., Stöcker W. und Becker-Pauly C. (2010). Let it flow: Morpholino knockdown in zebrafish embryos reveals a pro-angiogenic effect of the metalloprotease mepripin alpha2, *PLoS ONE* **5**(1): e8835.
- Scott I. C., Blitz I. L., Pappano W. N., Imamura Y., Clark T. G., Steiglitiz B. M., Thomas C. L., Maas S. A., Takahara K., Cho K. W. und Greenspan D. S. (1999). Mammalian BMP-1/Tolloid-related metalloproteinases, including novel family member mammalian Tolloid-like 2, have differential enzymatic activities and distributions of expression relevant to patterning and skeletogenesis, *Dev. Biol.* **213**(2): 283–300.

- Sha X., Yang L. und Gentry L. E. (1991). Identification and analysis of discrete functional domains in the pro region of pre-pro-transforming growth factor beta 1, *J. Cell Biol.* **114**(4): 827–839.
- Shull M. M., Ormsby I., Kier A. B., Pawlowski S., Diebold R. J., Yin M., Allen R., Sidman C., Proetzel G. und Calvin D. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease, *Nature* **359**(6397): 693–699.
- Starckx S., Van den Steen P. E., Verbeek R., van Noort J. M. und Opdenakker G. (2003). A novel rationale for inhibition of gelatinase B in multiple sclerosis: MMP-9 destroys alpha B-crystallin and generates a promiscuous T cell epitope, *J. Neuroimmunol.* **141**(1-2): 47–57.
- Stöcker W., Wolz R. L., Zwilling R., Strydom D. J. und Auld D. S. (1988). Astacus protease: A zinc metalloenzyme, *Biochemistry.* **27**(14): 5026–5038.
- Stefanska A. M. und Walsh P. T. (2009). Chronic obstructive pulmonary disease: evidence for an autoimmune component, *Cell. Mol. Immunol.* **6**(2): 81–86.
- Stockis J., Colau D., Coulie P. G. und Lucas S. (2009b). Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg, *Eur. J. Immunol.* **39**(12): 3315–3322.
- Stockis J., Fink W., Francois V., Connerotte T., de Smet C., Knoops L., van der Bruggen P., Boon T., Coulie P. G. und Lucas S. (2009a). Comparison of stable human Treg and Th clones by transcriptional profiling, *Eur. J. Immunol.* **39**(3): 869–882.
- Strauss L., Bergmann C., Szczepanski M., Gooding W., Johnson J. T. und Whiteside T. L. (2007). A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment, *Clin. Cancer Res.* **13**(15 Pt 1): 4345–4354.
- Sugiyama H., Gyulai R., Toichi E., Garaczi E., Shimada S., Stevens S. R., McCormick T. S. und Cooper K. D. (2005). Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation, *J. Immunol.* **174**(1): 164–173.
- Szabo S. J., Kim S. T., Costa G. L., Zhang X., Fathman C. G. und Glimcher L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment, *Cell* **100**(6): 655–669.

- Taipale J., Koli K. und Keski-Oja J. (1992). Release of transforming growth factor-beta 1 from the pericellular matrix of cultured fibroblasts and fibrosarcoma cells by plasmin and thrombin, *J. Biol. Chem.* **267**(35): 25378–25384.
- Taipale J., Lohi J., Saarinen J., Kovanen P. T. und Keski-Oja J. (1995). Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor-beta 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells, *J. Biol. Chem.* **270**(9): 4689–4696.
- Takahashi T., Kuniyasu Y., Toda M., Sakaguchi N., Itoh M., Iwata M., Shimizu J. und Sakaguchi S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state, *Int. Immunol.* **10**(12): 1969–1980.
- Tran D. Q., Andersson J., Hardwick D., Bebris L., Illei G. G. und Shevach E. M. (2009). Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3+ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures, *Blood* **113**(21): 5125–5133.
- Travis M. A., Reizis B., Melton A. C., Masteller E., Tang Q., Proctor J. M., Wang Y., Bernstein X., Huang X., Reichardt L. F., Bluestone J. A. und Sheppard D. (2007). Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice, *Nature* **449**(7160): 361–365.
- Tucker R. F., Shipley G. D., Moses H. L. und Holley R. W. (1984). Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type beta transforming growth factor, *Science* **226**(4675): 705–707.
- Van den Steen P. E., Proost P., Grillet B., Brand D. D., Kang A. H., Van Damme J. und Opdenakker G. (2002). Cleavage of denatured natural collagen type II by neutrophil gelatinase B reveals enzyme specificity, post-translational modifications in the substrate, and the formation of remnant epitopes in rheumatoid arthritis, *FASEB J.* **16**(3): 379–389.
- Van Wart H. E. und Birkedal-Hansen H. (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**(14): 5578–5582.
- Venkatesh B., Lee A. P., Ravi V., Maurya A. K., Lian M. M., Swann J. B., Ohta Y., Flajnik M. F., Sutoh Y., Kasahara M., Hoon S., Gangu V., Roy S. W., Irimia M., Korzh V., Kondrychyn I., Lim Z. W., Tay B. H., Tohari S., Kong K. W., Ho

- S., Lorente-Galdos B., Quilez J., Marques-Bonet T., Raney B. J., Ingham P. W., Tay A., Hillier L. W., Minx P., Boehm T., Wilson R. K., Brenner S. und Warren W. C. (2014). Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution, *Nature* **505**(7482): 174–179.
- Vignali D. A., Collison L. W. und Workman C. J. (2008). How regulatory T cells work, *Nat. Rev. Immunol.* **8**(7): 523–532.
- Wakefield L. M., Kondaiah P., Hollands R. S., Winokur T. S. und Sporn M. B. (1991). Addition of a C-terminal extension sequence to transforming growth factor-beta 1 interferes with biosynthetic processing and abolishes biological activity, *Growth Factors* **5**(3): 243–253.
- Wang R., Kozhaya L., Mercer F., Khaitan A., Fujii H. und Unutmaz D. (2009). Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**(32): 13439–13444.
- Wang R., Wan Q., Kozhaya L., Fujii H. und Unutmaz D. (2008). Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression, *PLoS ONE* **3**(7): e2705.
- Wang R., Zhu J., Dong X., Shi M., Lu C. und Springer T. A. (2012). GARP regulates the bioavailability and activation of TGF-Beta, *Mol. Biol. Cell* **23**(6): 1129–1139.
- Waterhouse P., Penninger J. M., Timms E., Wakeham A., Shahinian A., Lee K. P., Thompson C. B., Griesser H. und Mak T. W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctlα-4, *Science* **270**(5238): 985–988.
- Wermter C., Höwel M., Hintze V., Bombosch B., Aufenvenne K., Yiallourous I. und Stöcker W. (2007). The protease domain of procollagen C-proteinase (BMP1) lacks substrate selectivity, which is conferred by non-proteolytic domains, *Biol. Chem.* **388**(5): 513–521.
- Westheide W. und Rieger R. (2003). *Spezielle Zoologie Teil 2: Wirbel- oder Schädeltiere*, 1. Auflage, Heidelberg und Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Wildin R. S., Ramsdell F., Peake J., Faravelli F., Casanova J. L., Buist N., Levy-Lahad E., Mazzella M., Goulet O., Perroni L., Bricarelli F. D., Byrne G., McEuen M., Proll S., Appleby M. und Brunkow M. E. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy, *Nat. Genet.* **27**(1): 18–20.

- Winter R. und Noll F. (1998). *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, 1. Auflage, Stuttgart: B. G. Teubner.
- Wu F., Buckley S., Bui K. C., Yee A., Wu H. Y., Liu J. und Warburton D. (1996). Cell cycle arrest in G0/G1 phase by contact inhibition and TGF-beta 1 in mink Mv1Lu lung epithelial cells, *Am. J. Physiol.* **270**(5 Pt 1): L879–888.
- Wu Y., Borde M., Heissmeyer V., Feuerer M., Lapan A. D., Stroud J. C., Bates D. L., Guo L., Han A., Ziegler S. F., Mathis D., Benoist C., Chen L. und Rao A. (2006). FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT, *Cell* **126**(2): 375–387.
- Yang Z., Mu Z., Dabovic B., Jurukovski V., Yu D., Sung J., Xiong X. und Munger J. S. (2007). Absence of integrin-mediated TGFbeta1 activation in vivo recapitulates the phenotype of TGFbeta1-null mice, *J. Cell Biol.* **176**(6): 787–793.
- Yin X., Cuello F., Mayr U., Hao Z., Hornshaw M., Ehler E., Avkiran M. und Mayr M. (2010). Proteomics analysis of the cardiac myofilament subproteome reveals dynamic alterations in phosphatase subunit distribution, *Mol. Cell Proteomics* **9**(3): 497–509.
- Yu Q. und Stamenkovic I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis, *Genes Dev.* **14**(2): 163–176.
- Zgoda V. G., Moshkovskii S. A., Ponomarenko E. A., Andreewski T. V., Kopylov A. T., Tikhonova O. V., Melnik S. A., Lisitsa A. V. und Archakov A. I. (2009). Proteomics of mouse liver microsomes: performance of different protein separation workflows for LC-MS/MS, *Proteomics* **9**(16): 4102–4105.
- Zhao D. M., Thornton A. M., DiPaolo R. J. und Shevach E. M. (2006). Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes, *Blood* **107**(10): 3925–3932.
- Zhou A. X., Kozhaya L., Fujii H. und Unutmaz D. (2013a). GARP-TGF-beta complexes negatively regulate regulatory T cell development and maintenance of peripheral CD4+ T cells in vivo, *J. Immunol.* **190**(10): 5057–5064.
- Zhou G. und Levitsky H. I. (2007). Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance, *J. Immunol.* **178**(4): 2155–2162.

Zhou Q., Haupt S., Prots I., Thummler K., Kremmer E., Lipsky P. E., Schulze-Koops H. und Skapenko A. (2013b). miR-142-3p is involved in CD25+ CD4 T cell proliferation by targeting the expression of glycoprotein A repetitions predominant, *J. Immunol.* **190**(12): 6579–6588.

Zhu Y., Ragan E. J. und Kanost M. R. (2010). Leureptin: a soluble, extracellular leucine-rich repeat protein from *Manduca sexta* that binds lipopolysaccharide, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **40**(10): 713–722.

A. Abkürzungen

Ein- und Drei-Buchstaben Code der Aminosäuren

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

A. Abkürzungen

Verwendete Einheiten

Ångström	Å
Basenpaare	bp
Dalton	Da
Erdbeschleunigung	xg
Grad Drehrichtung	deg
Gramm	g
Liter	l
Meter	m
Minuten	min
Molar	M
<i>Revolutions Per Minute</i>	rpm
Sekunden	s
Stunden	h
Tage	d

Verwendete Abkürzungen im Text

Ammoniumpersulfat	APS
Antigen-präsentierende Zelle	APC
<i>Per Basic Local Alignment Search Tool</i>	BLAST
<i>Bone Morphogenetic Protein 1</i>	BMP1
Bovines Serumalbumin	BSA
<i>Monocyte chemoattractant protein</i>	MCP
<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>	COPD
Circular Dichroismus-Spektroskopie	CD-Spektroskopie
<i>Cluster of Differentiation</i>	CD
<i>Complement Subcomponents C3r/C3s, Uegf, and Bone Morphogenic Protein 1</i>	CUB
Cytotoxische T-Zelle	T _{Cyt} -Zelle
Dendritische Zellen	DC
Dithiothreitol	DTT
<i>Double Negative</i>	DN
<i>Double Positive</i>	DP
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	DMEM
Elektronenmikroskop	EM
Endoplasmatisches Retikulum	ER
<i>Epidermal Growth Factor</i>	EGF
Experimentelle Autoimmune Encephalitis	EAE
<i>Fetal Calf Serum</i>	FCS
Glycosylphosphatidylinositol	GPI
<i>Human Embryonic Kidney Cells</i>	HEK
Induzierte Regulatorische T-Zelle	iT _{Reg}
Interleukin-2	IL-2
Interleukin-10	IL-10
Interleukin-35	IL-35
<i>Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked Syndrome</i>	IPEX

A. Abkürzungen

Interne Ribosomale Eintrittsstelle	IRES
Extrazelluläre Matrix	ECM
Fluorescence Activated Cell Sorting	FACS
<i>Forkhead Box Protein 3</i>	FoxP3
<i>Large Latent Complex</i>	LLC
<i>Latency Associated Peptide</i>	LAP
<i>Latent TGF-β Binding Protein</i>	LTBP
<i>Leucine-Rich Repeat</i>	LRR
Magermilchpulver	MP
<i>Major Histocompatibility Complex</i>	MHC
Matrix-Metalloprotease	MMP
<i>Meprin, A5 Protein, Tyrosine</i>	MAM
<i>Phosphatase μ</i>	
Methionin-Turn	Met-Turn
Mittlere relative Elliptizität	MRE
<i>Multiple Cloning Site</i>	MCS
Multiple Sklerose	MS
<i>Mustela Vison 1 Lung cells</i>	Mv1Lu Zellen
Naive T-Zellen	T _N -Zelle
<i>National Centers for Biotechnology Information</i>	N _K -Zelle
Natürliche Killerzelle	
Natürliche Regulatorische T-Zelle	nT _{Reg}
<i>Non Essential Amino Acids</i>	NEAA
Optische Dichte	OD
<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>	PAMP
Raumtemperatur	RT
Rheumatoide Arthritis	RA
<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>	RIPA
<i>Recombination-Activating Protein</i>	RAG
Regulatorische T-Zelle	T _{Reg}
<i>Remnant Epitopes Generate Autoimmunity</i>	REGA

<i>Retinoic Acid-Related Orphan Receptor gamma T</i>	ROR γ T
Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese	SDS-PAGE
<i>Secretory Leukocyte Protease Inhibitor</i>	SLPI
<i>Small Latent Complex</i>	SLC
<i>T-box Expressed in T cells</i>	T-bet
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	TEMED
T-Helfer Zelle	T _H -Zelle
<i>Transforming Growth-Factor β</i>	TGF- β
<i>Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand Superfamily Member 10</i>	TRAIL
<i>Tumour Necrosis Factor-Receptor Associated Factor</i>	TRAF
T-Zell Rezeptor	TCR
Variabler Lymphocyten Rezeptor	VLR
<i>Zona Pellucida protein 4</i>	ZP4

B. Alignments

Tabelle B.1.: **ID der identifizierten GARP-Gene**

Die ID der GARP-Gene, die mittels Datenbanksuche als solche identifiziert wurden. Abkürzungen der Spezies = 1. Buchstabe des Gattungsnamen 2. und 3. Buchstabe des Art-Zusatzes, Bsp.: *Danio rerio* = DRE, vgl. Tabelle 3.1

KÜRZEL	PROTEIN ID	KÜRZEL	PROTEIN ID
ACA	ENSACAP00000016827	MLU	ENSMLUP00000009194
AME	ENSAMEP00000017855	MMU	ENSMUSP00000133205
BTA	ENSBTAP00000001716	NLE	ENSNLEP00000020411
CPO	ENSCPOP00000004211	OCU	ENSOCUP00000013219
DER	OTTDARP00000034092	OLA	ENSORLP00000008188
DOR	ENSDORP00000005380	PAB	ENSPPYP00000004228
ECA	ENSECAP00000017335	PTR	ENSPTRP00000007033
EEU	ENSEEUP00000009083	PVA	ENSPVAP00000016666
FCA	ENSFCAP00000011137	RNO	ENSRNOP00000020520
GAC	ENSGACP00000024206	SHA	ENSSHAP00000008625
GGA	ENSGALP00000001190	SSC	ENSSSCP00000015789
HSA	ENSP00000260061	TGU	ENSTGUP00000013969
LAF	ENSLAFP00000016680	TRU	ENSTRUP00000030497
MAG	ENSMGAP00000016259	TTR	ENSTTRP00000012613
MDO	ENSMODP00000006507	XTR	ENSXETP00000042101

Tabelle B.2.: Alignment der Vertebraten GARP-Proteine

Das für die Erstellung des GARP-Stammbaum verwendete Aligment der mittels Datenbank-analyse ermittelten GARP-Proteinen. Abkürzungen der Spezies = 1. Buchstabe des Gattungsnamen 2. und 3. Buchstabe des Art-Zusatzes, Bsp.: *Danio rerio* = DRE, vgl. Tabelle B.1

DRE LRR32	CSSLSLRRVPAPLPSSIRLLDLSQNLQNLTLQDLPSRSSLRRLDLHNNQ
TRU LRR32	CRDLNLRAAPLNLPQGIHMLDLSHNQVQNLTEETLAYHTGFRRLNLQANK
HSA LRR32	CQVLGLLQVPSVLPDPTETLDLSGNQLRSILASPLGFYTAIRHLDLSTNE
PTR LRR32	CQGLGLLQVPSVLPDPTETLDLSGNQLRSILASPLGFYTAIRHLDLSTNE
PAB LRR32	CQGLGLLQVPSVLPDPTETLDLSGNQLRSILASPLGFYTAIRHLDLSTNE
NLE LRR32	CQGLGLLQVPSVLPDPTETLDLSGNQLRSILASPLGFYTAIRHLDLSTNE
CPO LRR32	CQGLGLHQVPSLLPLDIKTLDLSGNQLRNVLASPLGFYTAIRHLDLSTNE
FCA LRR32	CQGLGLFQVPSMLPLDIEALDLSGNQLRILASPLGFYTELRHLDLSTNE
AME Uncharacterized	CQGLGLLQVPSMLPRDIEALDLSGNQLRSILASPLGFYTAIRHLDLSTNE
BTA Uncharacterized	CQGRGLLQVPSVLSRDIEVLNLSRNQLRSILALPLGFYTAIRHLDLSTNE
TTR LRR32	CRGLGLLQVPSVLPDIEVLNLSGNQLRSILASPLGLYTAIRHLDLSTNE
SSC LRR32	CQGLGLLQVPSMLARDIEALDLSGNQLRSIPASPLGFYVALRRDLSTNE
ECA Uncharacterized	CQGLSLLQVPSGLPRDIEALNLSGNQLRSILASPLGFYTAIRHLDLSTNE
MLU LRR32	CQFLGLVQVPSVLPDIEALDLSGNQLRSILASPLGLYTAIRHLDLSTNE
PVA LRR32	CQGLGLLQVPSVLPDIEVLNLSGNQLRSILASPLGFYTAIRHLDLSTNE
LAF LRR32	CQGLGLPQVPSMLPLDIEVLNLSGNQLRSILASPLGFYTAIRHLDLSTNE
MMU LRR32	CHGLGLLQVPSVLSLDIQALYLSGNQLRSILVSPPLGFYTAIRHLDLSTNE
RNO LRR32	CHGLSLLQVPSVLSLDIQALYLSGNQLRSILVSPPLGFYTAIRHLDLSTNE
EEU LRR32	CQGLGLLQVPSLLPLDIEALDLSGNQLRLLVSPPLGFYTAIRHLDLSTNE
MDO RRC32	CHNRGLLQIPAVLHADSKALDLSHNQLQSVLETPLIFYPALQHLDLSTNE
SHA LRR32	CHSRGLLQIPAVLHADSKALDLSQNLQSVLETPLIFYPALRRDLSTNE
GGA Uncharacterized	CHNKELRQIPRELHPNVNKIDLSGNLIQSIPDMPLPFYTSLQCLDLSTNE
MGA Uncharacterized	CHNKDLHQIPRELHPNVNKIDLSGNLIQSIPDMPLPFYTSLQCLDLSTNE
TGU Uncharacterized	CHNKDLHQIPRELYPNVKKIDLSGNLIQSISEMSSSFYTSLQCLDLSTNE
ACA LRR32	CNSRNLDQIPALHQNVNKIVLSENKLNITERPLTFYTSRHLDFNSNH
XTR LRR32	CHNKSLQQVPLDLPPIQTLDLSHNDLENITDHLMKYSFLESIDLSTNE
GAC LRR32	WSNQNLVSVPLDLDVRLRRDLSTNFIQRLHPLALPN---LQQLDLSTNE
OLA Uncharacterized	WKNRNLSSVPPDLGGDLRELDLSTNFIQRLHTLALPY---LEQLDLSTNE

DRE	LRR32	IQFLQPGLFRDLLHLEDLDSGNALDLYAALHT--PLGPLPALRRDLDSG
TRU	LRR32	IHFIQPGLFKDMTDLKVLDSLNRHLNVFALSKT--NIGPLTTVESLDLSS
HSA	LRR32	ISFLQPGAFQALHLEHLSLAHNRLAMATALSA-GGLGPLPRVTSLDLSG
PTR	LRR32	ISFLQPGAFQALHLEHLSLAHNRLAMATALSA-GGLGPLPHVTSLDLSG
PAB	LRR32	ISFLQPGAFQALHLEHLSLAHNRLAMATALSA-GGLGPLPRVTSLDLSG
NLE	LRR32	ISFLQPGAFQALHLEHLSLAHNRLAMATALSA-GGLGPLPRVTSLDLSG
CPO	LRR32	ISFLQPGVFQALPHLEHLNLAHNRLAVGTALSV-GGLGPLPHVTSLDLSG
FCA	LRR32	ISFLQGTGVFQALPHLEHLNLAHNRLAVGTVLSA-PGLGPLPHVTSLDLSG
AME	Uncharacterized	ISFIQTGVFQALPHLEHLNLAHNHLAAGTVLSA-PGLGPLPRVTSLDLSG
BTA	Uncharacterized	ISFLQPGVFQALPHLEHLNLAHNRLAVGTALNT-GGLGPLLHLTSLDLSG
TTR	LRR32	ISFLQPGVFQALPHLEHLNLAHNRLAVGTALST-GGLGPLPHLTSLDLSG
SSC	LRR32	ISFLQPGAFQALPHLEHLNLAHNRLAQGMALGA-GGLGPLPHLTALDLSG
ECA	Uncharacterized	ISFLQPGVFQALPHLEHLNLAHNRLAVGTALST-GGLGPLPHVTSLDLSG
MLU	LRR32	ISFVQPGVFEALSHLEHLNLAHNRLAL----ST-GGLGPLLHVKSLDLSG
PVA	LRR32	ISFLQPGVFQALSHLEHLNLAHNRLAL----ST-GGLGPLLHVTSLDLSG
LAF	LRR32	ISFVQPGVFQALPHLEHLNLAHNHLAVG-----TGLGPLLHMTSLDLSG
MMU	LRR32	ISFLQAGVFQALPYLEHLNLAHNRLATGMALNS-GGLGRLPLLVSLDLSG
RNO	LRR32	ISFLQPGVFQALPYLEHLNLAHNRLAAGMALNS-GGLGRLPLVVSLDLSG
EEU	LRR32	ISFLQPGVFQALPLLQHLNLAHNHLGVDPALNG-GGLGRLPRVTTLDLSG
MDO	RRC32	ISFIQPGIFTSLSQLEHLNLSQNRGRALPHSGHGGIGRLPRVTTLDLSG
SHA	LRR32	ISFIQPGIFTSLQLEHLNLAHNRLGRASPQNGNGGIGRLPHVTTLDLSG
GGA	Uncharacterized	ISFITPGVFAHMTSLEINLANNLYE-LAQTGTEGIGFLPKVEILDLSH
MGA	Uncharacterized	ISFITPGVFAHMTSLEINLANNLYE-LAQIGTEGIGLLPKVEILDLSH
TGU	Uncharacterized	ISFITPGVFAHMTSLEINLANNLYE-LAQNGTEGIGLLPKVEILDLSH
ACA	LRR32	IGFIKPGIFSLSRLEEIHLANNQLYR-MAQS-NLWVGLLPHVRTLDLSR
XTR	LRR32	LSFIQPHSFRKMHKLKEINLSGNDLDS-FVHHRVSGIGVLPYVQTLDSR
GAC	LRR32	LDLIYEGAFEEAQLLEELNLSRNLLSKDIGNNG-KALQSIIRLKSLDISM
OLA	Uncharacterized	LDLISEEAFEKLARLEHLNLSRNELNINLDSNS-KALQSLGRLKSLDISM

DRE	LRR32	NGLFTDMSDYFLSDAPALTNSLSDGNSITKISRRTFNGSQALQNIIDLHNN
TRU	LRR32	NGLYTGMSDFLSESPSLESVLSNSITKIAQNTFGSSSLTKINLHNN
HSA	LRR32	NSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSN
PTR	LRR32	NSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSN
PAB	LRR32	NSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPVLEQLDLHSN
NLE	LRR32	NSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSN
CPO	LRR32	NSLYSGLVERLLGEAPRLRTLSTLAENSLTRLSRHTFWGLPALEQLDLHSN
FCA	LRR32	NSLYSGLVERLLGEAPALRTLSTLAENSLTRLARHTFWGTPVLERLDLHSN
AME	Uncharacterized	NSLYSGLAERLLGEAPALRTLSTLAENSLTRLARHTFWGTPALERLDLHSN
BTA	Uncharacterized	NSLYSGLVEQLLGEAPALRTLSTLAENSLTRLGRRTFLSTPALERLDLHSN
TTR	LRR32	NSLYSGLAERLLAEPALRSLSLAQNSLTRLGRHTFWGTPALERLDLHSN
SSC	LRR32	NSLYSGLAEQLLGEAPALRSLSLAQNSLTRLARHTFRGAPALEWLDLHSN
ECA	Uncharacterized	NSLYSGLVERLLGEAPALRSLSLAQNSLTRLARHTFWGTPALERLDLHSN
MLU	LRR32	NSLYSGLVEQLLGEAPALRTLALAEENSLTRLARQTFWGTALERLDLHSN
PVA	LRR32	NSLYSGLMERLLGEAPALRTLVAENSLTHLARQTFWGTALERLDLHSN
LAF	LRR32	NSLYNGLVERLLGEAPALRTLSTLAENSLTHLARTRFRGMPALERLDLHSN
MMU	LRR32	NSLHGSLVERLLGETPRLRTLSTLAENSLTRLARHTFWGMPAVEQLDLHSN
RNO	LRR32	NSLHGSLVERLLGEAPRLRTLSTLAENSLTRLARHTFWGMPAMEQLDLHSN
EEU	LRR32	NSLHSGVERLLGQAPALRSLSLAQNSLMHLAHHAFWGTALERLDLHSN
MDO	RRC32	NGLYNSMAEAFKADAPALLTSLAEENSLTRISRWTLQGVPALEELDLSN
SHA	LRR32	NGLYNGLAEAFLEDAPDLLSLSLAENSLTRISRWTLQGVPALEELDLSN
GGA	Uncharacterized	NSLYNGMAEYFIKRAPALRYLSLAGNSIIMISHKMFQGSPLVEIDLQSN
MGA	Uncharacterized	NSLYNGMAEYFIKRAPALRYLSLAGNSIIMISHKMFQGSPLVEIDLQSN
TGU	Uncharacterized	NNLYNGMAEYFIKEAPALQYLSLADNSIIMISQKMFEGSPNLVEIDLQSN
ACA	LRR32	NRLYNGMAEHFLHKAPSLQYLSLAENSIIEISQKTFQGSPLIEVNLHSN
XTR	LRR32	NSLYNDMIGYFLQEPALRQYLSLHENSITTISSDLFQGSPLLAEVDLHNN
GAC	LRR32	NDLGDDAVELYLRNKPSLDQLKMTGNALTTLSPNLFKESKGLRAITIDDN
OLA	Uncharacterized	NGLSNHAAELYLRNKSALHQLKMTGNALIRLSHSLFRESKGLQIITIDKN

B. Alignments

DRE LRR32	VIIEIEEGAFEFTELSELDSVNSISCITDFNLVQLRTLNLRSNLTNF
TRU LRR32	VILEIEDGAFDSLHSLTELDSLKNSIACIMDFNLCHLKVNLKNSVEMF
HSA LRR32	VLMDIEDGAFEGPLRLTHLNLRSNLTCSIDFSLQQLRVLDLSCNSIEAF
PTR LRR32	VLMDIEDGAFEGPLRLTHLNLRSNLTCSIDFSLQQLRVLDLSCNSIEAF
PAB LRR32	VLMDIEDGAFEGPLRLTHLNLRSNLTCSIDFSLQQLRVLDLSCNSIEAF
NLE LRR32	VLMDIEDGAFEGPLRLTHLNLRSNLTCSIDFSLQQLRVLDLSCNSIEAF
CPO LRR32	VLMDIEDGAFELPHLGHNLNLRSNLTCSIDFSLQQLRVLDLSCNSIEAF
FCA LRR32	VLMDIEDGAFELPHLAHLNLNLRSNLTCSIDFSLQQLRVLDLSCNSIEAF
AME Uncharacterized	VLMDIEDGAFDALPRLAHLNLNLRSNLTCSIDFSLQQLRILDLSCNSIEAF
BTA Uncharacterized	VLMDIEDGAFELPRLVHLNLNLRSNLTCSIDFSLQQLRVLDLSCNSIEAF
TTR LRR32	VLMDIEDGAFELPHLAHLNLNLRSNLTCSIDFSLQQLRVLDLSC-SIEAF
SSC LRR32	VLMDIEDGAFELPRLAHLNLNLRSNLTCSIDFRLQQLRVLDLSCNSIEAF
ECA Uncharacterized	VLMDIEDGAFDALPRLAHLNLNLRSNLTCSIDFSLQQLRVLDLSCNSIEAF
MLU LRR32	VLMDIEDGAFELPHLTHLNLNLRSNLTCSIDFSLQQLRVLDLSCNSIEAF
PVA LRR32	VLMDIEDGAFELPHLTHLNLNLRSNLTCSIDFSLQQLRVLDLSCNSIEAF
LAF LRR32	VLMDIEEGAFELPHLAHLNLNLRSNLTCSIDFSLQQLQVLDLSCNSIEAF
MMU LRR32	VLMDIEDGAFELPHLTHLNLNLRSNLTCSIDFSLQQLQVLDLSCNSIEAF
RNO LRR32	VLMDIEDGAFELPQLTHLNLNLRSNLTCSIDFSLQQLQVLDLSCNSIETF
EEU LRR32	VLMDIEDGAFELPHLAHLNLNLRSNLTCSIDFSLQHLQVLDLSCNSIEAF
MDO RRC32	VIMEIEEGAFELPHLARLNLMSNLTCSIDFSLPQLQVLDLRSNIEETF
SHA LRR32	VIMEIEEGAFDDLPRRLTRLNLMSNLTCSIDFSLPQLRVLDRSNIEETF
GGA Uncharacterized	IIMEIEEGAFETLLNLRLNLMSNLTCSIDFNLRLQLEILDLSRNSIESF
MGA Uncharacterized	IIMEIEEGAFETLLNLRLNLMSNLTCSIDFNLRLQLEILDLSRNSIESF
TGU Uncharacterized	IIMEIEEGAFETLVSLKLNLSKNSLTCSIDFNLRLHLEILDLSRNSIETF
ACA LRR32	MIMEIEEGAFESLSQLKLNLSMNSLTCSIDFNLRLQLEILDLSRNSIEIF
XTR LRR32	IIMDIEEGSFYELKHLMSIDLSMNSLTCSIDFNLRLKVLNLKNSIKTF
GAC LRR32	HISVIEEGTFEPLRQLELLNLARNLAHICDFKLHQVKYLNLSRNSVEFF
OLA Uncharacterized	LISEIAPGTFEPLMHLEMLNLAKNNLEHICDFKLHQVKYLNLSKNSLEFF
DRE LRR32	QSL-DMEDEFQLQHLDLRENKLLYFPVLPQRNRLMYLDLRSNLLRSVNC
TRU LRR32	QSA-RSTDPYKLVSLDLSENKLSHFPLLPWKNILEHLDISRNRISQSVNVT
HSA LRR32	QTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPTGP
PTR LRR32	QTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPTGP
PAB LRR32	QTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPTGP
NLE LRR32	QTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPTGP
CPO LRR32	QVASEPQAEYQLAWLDLRENKLLHFPDLAALPRLTYLNVSNLIRFPPTGP
FCA LRR32	QTAPEPQAEYQLAWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNVSNNLIRLPAEP
AME Uncharacterized	QTAPEPQAEYQLAWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNVSNNLIRLPAGP
BTA Uncharacterized	QTA-EPRAEYQLAWLDLRENKLLHFPDLSALPRLIYLNASNNLIRLPAEP
TTR LRR32	QTA-RSRAQYQLAWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNVSNNLIRLPAGP
SSC LRR32	QTAPEPPAEYQLAWLDLRENKLLHFPDVTALPRLVYLNVSNNLIRLPEGP
ECA Uncharacterized	QTAPEPRAEYQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLTYLNVSNLIRLPAEP
MLU LRR32	QMAPESQAVYQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNVSNNLIRLPAEP
PVA LRR32	QTAPEPQAGYQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNVSNNLIRLPVGP
LAF LRR32	QTAPEPRADYQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLSYLNVSNLIRLPVGP
MMU LRR32	QTAPEPQAQFQLAWLDLRENKLLHFPDLAVFPRLIYLNVSNNLIRLPAEP
RNO LRR32	QTAPESQAQFQLAWLDLRENKLLHFPDLAMFPRLIYLNVSNNLIRLPTGL
EEU LRR32	RTAPGPGAQYQLTWLDLRENKLLHFPDLAALTRLRYLNVSNLIRLPMGL
MDO RRC32	QTIATDEE-YQLSWLDLRENKLSQFPDLPQHNRLIYLNVSNNLIRLQMPAS
SHA LRR32	QTAPSDQE-YQLHWLDLHENKLSQFPDLPQHNRLIYLNVSNNLIRLQMRPTS
GGA Uncharacterized	HTT-ESDDEYSLKCLDLSENKLLRFPVFPQVKNLVTNLKSNLIRLQTAES
MGA Uncharacterized	HTT-ASDDEYSLRCLDLSENKLLRFPVFPQVKNLVTNLKSNLIRLQTAES
TGU Uncharacterized	HTT-KSDDEYSLRCLDLSENKLLRFPVFPQVKNLVTNLKSNLIRLQTAES
ACA LRR32	HST-ESKDEFNLIWLDLSENKLLHFPVLPQVKNLAFLNLTKNILQSVLVE
XTR LRR32	HTP-DSEDEYLLKVDLSHNKLSFPQVPRVNNVIFIDLKSNYIHLGTET
GAC LRR32	VTR-EDDQLYRLEILDLSHNKLLYFPIVPMNRKLYLHLQNNLVGALNSE
OLA Uncharacterized	FTS-EDDHLYSLEILDLSYNKLLYFPIVPMNRKLYLHLQNNLVGALNSE

DRE	LRR32	GPLE-ELESRESGYLLTAHDKPLTLCANERQQELGRLLYLDLSFNQLKT
TRU	LRR32	SSPE-TRT-----KVVLTQLKYLDMSYNQLRS
HSA	LRR32	PQDS-KGIHAPSEGWSALPLSAPSG---NASGRPLSQQLLNLDLSYNEIEL
PTR	LRR32	PQDS-KGIHAPSEGWSALPLSAPSG---NASARPLSQQLLNLDLSYNEIEL
PAB	LRR32	PQDS-KGIHAPSEGWSALPLSTPSW---NASARPLSQQLLNLDLSYNEIEL
NLE	LRR32	PQDS-KGIHAPSEGWSALPLSTPSG---NASSRPLSQQLLNLDLSYNEIEL
CPO	LRR32	LQGS-DGIHMPSEDWSASPLFSPSW---NASTNALSLLSNLDLSYNEIEL
FCA	LRR32	PRGG-EGIHAPSEGWSASPFSPNSR---NSSTHPLSQQLLDLDLSYNEIEL
AME	Uncharacterized	ARGS-EGIHAPSEGWSALPFSDFPSR---NASAHPLSQQLLNLDLSYNEIEL
BTA	Uncharacterized	PRGGAEGLHAPSEGWSALPLSNPSR---NTSTQPLSQQLLNLDLSYNEIEL
TTR	LRR32	PQGG-EGLHAPSEGWSALPFSHPGR---NASTQPLSQQLLNLDLSYNEIEL
SSC	LRR32	PQGG-EGIHAPSEGWAALPASNPGR---NASTPPLSQQLLNLDLSYNEIEL
ECA	Uncharacterized	PPGG-EGLHAPSEGWSALPLLNSR---NASAHPLSQQLLNLDLSYNEIEL
MLU	LRR32	PQGG-EAIYAPSEGWSASPLSNPSR---NASTHPFSQQLLNLDLSYNEIEL
PVA	LRR32	PQGG-EAIHAPSEGWSALPLSNPTR---NSSTHPLSQQLLNLDLSYNEIDF
LAF	LRR32	PRGS-KGVHAPSEGWSALPLSNPSW---NTSTHPLSQQLLNLDLSYNEIEH
MMU	LRR32	PRGS-EDLHAPSEGWSASPLSNPSR---NASTHPLSQQLLNLDLSYNEIEL
RNO	LRR32	PQDS-EDLHAPSEGWSASLLSNPSR---NASIHPLSQQLLNLDLSYNEIEL
EEU	LRR32	APDR-GDIKASSDGSALPTSSPGW---NASTCSLSQQLLNLDLSYNEIEL
MDO	RRC32	SLSD-ESPGVKDWPGLHQAPDPSG---NDSSMALSRLLVLDLSYNEIEA
SHA	LRR32	SLGD-RGPGTEAWA---KEPTDPSA---NDSSALAHLLVLDLSYNEIES
GGA	Uncharacterized	SRNKMNEMENWLDAPFHLLDQKQS--RNKSSLNLSHLAYLDLSYNEIKS
MGA	Uncharacterized	SHNKMDYEMENWLDAPFHLLDQKQS--RNKSSLNLSQLVYLDLSYNEIKS
TGU	Uncharacterized	PHNKMDYVKNENWLNASFHLLDQKQS--RNRSSLYLSQLVYLDLSYNEIKS
ACA	LRR32	SLG--EDEDYNWEDPSLPLLGQDQK--SNASSPHLPELLHLDLSYNEIKS
XTR	LRR32	PGE-----DPDWMNYSFQLEFEEQNP-KNISTVPLPKLNHLDLSYNSIKS
GAC	LRR32	VAMVSEANALYSEIMSEKIVRKNNL----HSNWRLMPLIYIDLSYNHFRS
OLA	Uncharacterized	ATMVSEANSLYNQIVGEERVLNRNL----HSNWRLMPLIYIDLSYNHFRS
DRE	LRR32	LSSSFFSSMAALESNLSNNCLQSFVSDS---LRSLKTLDLDFNNLQNL
TRU	LRR32	LPESFFYCMLSLRVLKVSNNCISFSVTSEYFLNMVKIMDLSYNSLQSLT
HSA	LRR32	IPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSPLCLMLLDLSHNALETLE
PTR	LRR32	IPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRSGSLPCLMLLDLSHNALETLE
PAB	LRR32	IPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRSGSLPCLMLLDLSHNALETLE
NLE	LRR32	IPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRSGSLPCLMLLDLSHNALETLE
CPO	LRR32	IPDSFLKTLTSLRFLNLSRNCLQAFGAQHIGSLPCLVLLDLSHNVLEALE
FCA	LRR32	VPEGFLEPLSSLRFLNLSRNCLRAFEVRRAGFLPCLVYLDVSHNALETLE
AME	Uncharacterized	VPEGFLEPLTSLRFLNLSRNCLRAFAVPHAGFLPCLVHLDVSHNALETLE
BTA	Uncharacterized	VPEGFLEPLTSLRSLNLSRNCLRAFEAQ-PGSLPCLTLLDISHNALETLE
TTR	LRR32	VPEGFLEHLTSLRFLNLSRNCLRAFEARRVGSPLCLALLDMSHNALETLE
SSC	LRR32	VPEGFLEHLTSLRFLNLSRNCLQAFRAWGAGSLPCLMRLDISHNALEKLE
ECA	Uncharacterized	IPQGFLEHLTSLRFLNLSRNCLRAFEAQRAGSLPCLVLLDVSHNALEMLE
MLU	LRR32	VPEGFGLHLSLRFNLSRNCLKAFEARSAAGSLPCLVLLDISHNALKTLE
PVA	LRR32	IPEGFLDHLTSLRFLNLSRNCLRAFEAQRASSLPCLVLLDISHNVLETLE
LAF	LRR32	IPEGFLEPLTSLRFLNLSRNCLRAFEARHVGSLPCLVLLDLSHNALEALE
MMU	LRR32	VPASFLEHLTSLRFLNLSRNCLRSFEARQVDSLPCVLLDLSHNVLEALE
RNO	LRR32	VPAGFLEHLTSLRFLNLSRNCLRSFEARRAGSLPCLVLLDLSHNVLEALE
EEU	LRR32	IPEGFLEHLTSLRFLNLSRNCLRAFGAQRAGSLPSLVLLDLSHNALETLE
MDO	RRC32	IPEGFFDPMTSLQFLNLSRNCLRNFEVKQEHSLPSLDILDVSHNDLQSF
SHA	LRR32	IPQGFDPMTSLQFLNLSRNCLRTFEAKWERALPSLDLTDVSHNDLQGF
GGA	Uncharacterized	IPDEFFESMFLHTLNLNLSKNCLQTFEVTSVSLVSLVLDLSYNALQSL
MGA	Uncharacterized	IPDEFFESMFLHTLNLNLSKNCLQTFEVTSVSLVSLVLDLSYNALQSL
TGU	Uncharacterized	IPEEFFESMFLHTLNLNLSKNCLQAFVNYDSALISLTVLDLSYNALQSL
ACA	LRR32	IPSDFFTSMNLQFLNLSKNCLQTFVAN--SELVSLAVLDISSNSLQDLE
XTR	LRR32	IPDDFFLTMPSTLFLNLSKNCLQTFVAN--SELVSLAVLDISSNSLQDLE
GAC	LRR32	FPLETSLLSLTSLETNLSFNCLQNIAWNIRHDESISRQLFFP-----
OLA	Uncharacterized	FPLETSLLSLTKTMNLSFNCLQNIWIRHYSSGNTRQLFFP-----

B. Alignments

DRE LRR32	FSGGALPALEVLLLQGNALHLLDAHIFSSLPsirSLHLQNNLLSICADP-
TRU LRR32	FGKNALKSLEELHLQGNLlatVDHQIFQRLPNLkHLQLQNNLEICSSGP
HSA LRR32	LGARALGSLRtLLLQGNALrdLPPYTFANLAsLQRLNLQGNRVSPCGGPD
PTR LRR32	LGARALGSLRtLLLQGNALrdLPPYTFANLAsLQRLNLQGNRVSPCGGPD
PAB LRR32	LGARALGSLRtLLLQGNALrdLPPYTFANLAsLQRLNLQGNRVSPCGGPD
NLE LRR32	LGARALGSLRtLLLQGNALrdLPPYTFANLAsLQRLNLQGNRVSPCGGPD
CPO LRR32	LGARALASLQMLFLQDNALQDLPPYTFsNLASLQRLNLQGNRVIPCGGPA
FCA LRR32	LGPRALGSLRtLLLQDNALQDLPPDTFASLAsLQKLNlQGNQIRPCGGPG
AME Uncharacterized	LGSRALGSLRtLLLQANALQDLPPYTFASLAsLQRLNLQGNRVrPCGGPG
BTA Uncharacterized	LGARALGSLRtLLLQDNALrdLPLyTFTSLAsLQRLNLQGNRLSPCGGPA
TTR LRR32	LGARALGSLQtLLLQDNALrdLPPYTFAGLAsLQRLNLQGNRVSPCGGPG
SSC LRR32	LGAGALGSLRtLLLQDNALWDLPPYAFASLAsLQRLNLQGNRIspCGGPG
ECA Uncharacterized	LGARALGSLRtLLLQDNALrdLPPYTFAGLVSLQRLNLQGNRVSPCGGPG
MLU LRR32	LGTSALGSLRtLLLQHNALQDLPPHTFAGLAsLQRLNLQGNRVIPCGGPG
PVA LRR32	LHNRALGSLRtLFLQDNALQDLHPYTFAGLAsLQSLNLQGNRVSPCGRPG
LAF LRR32	LGARALGALRtLLLQGNtLQGLPPYTFANLAsLQKLNlQGNQVNPCCGGPG
MMU LRR32	LGTKVLGSLQtLLLQDNALQELPPYTFASLAsLQRLNLQGNQVSPCGGPA
RNO LRR32	LGTKVLGSLKtLLLQDNtLRELPPYTFAGLAsLQRLNLQGNQVSPCGGQA
EEU LRR32	TGTQALGALRtLSLQHNALQDLPLATfSGLAsLHDLNLQGNRVrVCLGPS
MDO RRC32	VGIHALASLrWLYLQYNALALPPLtFSRLPKIQWVDLQRNWIHLCCGTPH
SHA LRR32	VGLRGLASLrQLFLQHNALtALPPLtLASLPKIQRVdLHRNwVRPCGAPR
GGA Uncharacterized	LHADTLNLkELYIQNNHLQVLQFDIFsRLtSLRWLNlQGNnITLCSMYS
MGA Uncharacterized	LHADTLWNkELYIQNNHLQILQFDIFsRLtSLRWLNlQSNnITLCSMYS
TGU Uncharacterized	LDAGALSnlkELYIQNNYLQtLQFDIFsNLtSLRLLNLQSNnISLCSI--
ACA LRR32	VDVNTLGNLQEFYLQENYLQALRSdIFKGLPHLWLLNlRSNNLSLCSFQS
XTR LRR32	LGANSLPSLQRLYLQHNQLRLLLEPRIFQRLESIVLLHLQGNHVGPCMAGL
GAC LRR32	-----SLKYLNlQSNGLAFISPLFLNAltQIETLNlQDNsvQPCASID
OLA Uncharacterized	-----SLKHLNLQSNGLVHISPLFFKAltQIRTLNLEDNLVklCTATD
DRE LRR32	-----QISSGCvHLSdIPSLtYLYLSEnSLSSIPdGAFKGSPLlILD
TRU LRR32	NH-----QDHTDCVsfTSIPSLNfLNlSENnLRALpANAftDTPLtSLD
HSA LRR32	EPG-----PSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIEllRAGAFLHTPLtELD
PTR LRR32	EPG-----PSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIEllRAGAFLHTPLtELD
PAB LRR32	EPG-----PSGCVAFSGITSLHSLSLVDNEIEllRAGAFLHTPLtELD
NLE LRR32	DPG-----PSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIEllRAGAFLHTPLtELD
CPO LRR32	EPI-----LPGCVAFSGIPTLRVLNMAGNEVEMLRAGAFLHTPLtELD
FCA LRR32	EPG-----PSGCVAFSDISSLRILNLADNEMEvLRPGAFLHTPLtELD
AME Uncharacterized	EPG-----PLGCVAFSGISSLRFLNLVDNEMERLRAGAFLHTPLtELD
BTA Uncharacterized	EPG-----PSGCVAFSGISSLRVLNLADNEMEIlQAGAFLHTPLAELD
TTR LRR32	EPG-----PVGCVAFSGVSSLRVLNLADNEMETLRAGAFLHTPLtELD
SSC LRR32	EPG-----PSGCVAFSGISSLRFLNLVDNKVETLRAGAFLHTPLtELD
ECA Uncharacterized	EPG-----PPGCVAFSGISSLRILNLVDNEMEMLRAGAFLHTPLtELD
MLU LRR32	GPG-----PSGCVDFSGISSLRSLNLVDNEIEtlWAGAFLHTPLtELD
PVA LRR32	ESG-----LSGCVAFSGISSLRILNLVNNEMEMLRAGAFLHTPLtELD
LAF LRR32	EPA-----PSGCVAFSRMSSLRILNLVDNAIEKLRAGAFLHTPLtELH
MMU LRR32	EPG-----PPGCVDFSGIPTLHVLNMAGNSMGMLRAGSFLHTPLtELD
RNO LRR32	EPG-----PPGCVDFSGIPTLHFLNMAGNSMETLRAGSFLHTPLtELD
EEU LRR32	QPGS----PAPPGCVAFSGLSSLRSLNLVDNEIEtlPAGAFLHTPLAELD
MDO RRC32	DLSE----SAVSGCIVfSSIPSLRtLNLAGntMQRLPSGAFLHTPLtATLD
SHA LRR32	ALVE----PAASGCLALSNIpSLRALNLAGNALQRLPEGTFLQtPLVtLD
GGA Uncharacterized	GLAKQRLAGEENGcISfVDAPALQHLSLADNMLSILPAHTFFKtSLIFLD
MGA Uncharacterized	GLAKQRLAGEENGcISfVDAPALQHFLADNMLSILPAHTFFKtSLIFLD
TGU Uncharacterized	-----LAGEESGCvSFVNspSLQYLFLADNMLNlLPAYSfYKtPLVvLD
ACA LRR32	RLARQRPAAEEDGCISfVDVPELQHLYLSDNKlKSIpVYGFYRtQLVALD
XTR LRR32	GKAKRRTHAEeYRCVEffNIpTLQHLNLRENMIQRIPASAFWGTSLKvLD
GAC LRR32	RSTQ-QIH-LNTSCVVIgQLRtLkHLNLKENNIkMLQPNTFLNtALVSLN
OLA Uncharacterized	NMTS-FYSTQNASCvAFEHLtTLKHLNLKENMEMlKPNtFLRNPLVSLN

DRE	LRR32	LSLNPGVDITAASLSGVETSLTHLSLRGNQLHSLSIDFRVFQKLRSLDVS
TRU	LRR32	LSQNLGLHMAEGSLSGLEDSLVDLQLRENNISRLNTDLSLRLSKHIDLS
HSA	LRR32	LSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVLQVDLPCFICLKRLNLA
PTR	LRR32	LSSNPGLEVATGALGGLESSLEVLALQGNGLMVLQVDLPCFICLKRLNLA
PAB	LRR32	LSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNGLTVLQVDLPCFICLKRLNLA
NLE	LRR32	LSSNSGLEVATGALGGLEDSLEVLALQGNGLTVLQVDLPCFICLKRLNLA
CPO	LRR32	LSANPGLEVATGALAGLEASLEVLALQGNGLTVLQVDLPYFSCLKRLNLS
FCA	LRR32	LSANPGLDVATGALAGLEASLEVLALQGNGLAILQVDLPCFSCLKRLNLA
AME	Uncharacterized	LSVNPGLDVVSGALAGLEASLEVLALQGNGLAVLLVDLPCFSCLKRLNLA
BTA	Uncharacterized	LSSNPGLDVAPGALAGLEASLEVLALQGNGLAVLQVDLPCFSCLKRLNLA
TTR	LRR32	LSANPGLDVATGALAGLEASLEVLALQGNGLAVLQVDLPCFSCLKRLNLA
SSC	LRR32	LSANPGLDVATGALAGLEASLEVLALQGNGLATLQVDLPCFSCLKRLNLA
ECA	Uncharacterized	LSANPGLDVAIGALAGLEASLEVLALQGNGLAVLQVDLPCFSCLKRLNLA
MLU	LRR32	LSSNPGLDVATGALVGLASLEVLALQGNGLVQLQVDLPYFSCLKRLNLA
PVA	LRR32	VSANPGLDVATGALAGLESSLEVLALQGNGLVQLQVDLPCFSCLKRLNLA
LAF	LRR32	LSANPGLDVTGALAGLEASLEVLALQGNGLTILQVDLPCFSCLKRLNLA
MMU	LRR32	LSTNPGLDVATGALVGLASLEVLALQGNGLTVLRVDLPCFRLKRLNLA
RNO	LRR32	LSANPGLDVATGALVGLASLEVLALQGNGLVLRVDLPCFRRLKRLNLA
EEU	LRR32	LSANPGLVAPGALAGLEASLEVLALRGNGLAELLVDLPCFSCLKRLNLA
MDO	RRC32	LSANPGLGIMPALAGLESSLEVLRLQENGLAALHVDLPRFTRLKRLNLS
SHA	LRR32	LSANPGLVVPALAGLEASLEVLALQGNGLDALHVDLPRFTRLKRLNLS
GGA	Uncharacterized	LSMNPGLTVEVNALSGLEQSLEYLHLHGNSLIELNIDLPCFSHLRHLNLS
MGA	Uncharacterized	LSMNPGLTIEVNALSGLEQSLEYLHLHGNSLIELNIDLPCFSHLRHLNLS
TGU	Uncharacterized	LSMNPGLKIELKALSGLKSLKLYGNSLIDLNIDLPCFSHLKLHLNLS
ACA	LRR32	LSMNWGLHIDAESLSGLELSLEYLDFHNGMTTLNVNFPNPKYLNLS
XTR	LRR32	LSMNLGKVKPNALFGLEKTLEVLFMEGNGLPSLNVDLPLFTHLKYLNLS
GAC	LRR32	LAGNSHMVVRDAGEVQETLQSLIISEMNTSSDLSLPCMPALTQLNIS
OLA	Uncharacterized	LAKNQHMVLHEGALEGAQTTLQSLILSEINMSSSGLSLPCMPALTHNIS

DRE	LRR32	VNRLSGVSPWSEDS-SVEILNLQNNRVEALGS---ALLQGRRLRTLYVGNW
TRU	LRR32	TNQLTSLPTWNKES-SIESLNLQNNNLVTLDYSTMTLERSLKTLYMGSN
HSA	LRR32	ENRSLHLPAWTQAV-SLEVLDLRNNSFSLPAGSAMGGLETSLRRLYLQGN
PTR	LRR32	ENRSLHLPAWTQAV-SLEVLDLRNNSFSLPAGSAMGGLETSLRRLYLQGN
PAB	LRR32	ENRSLHLPAWTQAV-SLEVLDLRNNSFSLPAGSAMGGLETSLRRLYLQGN
NLE	LRR32	ENRSLHLPAWTQAV-SLEVLDLRNNSFSLPAGSAMGGLETSLRRLYLQGN
CPO	LRR32	ENRSLHLPAWTQAV-SLEVLDLRNNSFSLPAGSAMGGLETSLRRLYLQGN
FCA	LRR32	ENRSLRPLAWTQAV-SLEVLDLRNNSFSLPAGSAMGGLETSLRRLYLQGN
AME	Uncharacterized	ENRSLRPLAWTQAV-SLEVLDLRNNSFSLPAGSAMGGLEASLRRLYLQGN
BTA	Uncharacterized	ENRSLRPLAWTQAV-SLEVLDLRNNSFSLPAGSAMGGLENSLRRLYLQGN
TTR	LRR32	ENRSLRPLTWTQAV-SLEVLDLRNNSFSLPAGSAMGGLETSLRRLYLQGN
SSC	LRR32	ENRSLRPLAWTQAV-SLEVLDLRNNSFSLPAGSAMGGLETSLRRLYLQGN
ECA	Uncharacterized	ENRSLRPLAWTQAV-SLEVLDLRNNSFSLPAGSAMGGLETSLRRLYLQGN
MLU	LRR32	ENRSLRPLAWTQAV-SLEVLDLRNNSFSLPSSAMGGLETSLRRLYLQGN
PVA	LRR32	ENRSLHLPAWTQAV-SLEVLDLRNNSFSLPAGSAMGGLETSLRRLYLQGN
LAF	LRR32	ENRSLHLPAWTQAV-SLEVLDLRNNSFSLPAGSAMGGLETSLRRLYLQGN
MMU	LRR32	ENQLSHLPAWTRAV-SLEVLDLRNNSFSLPAGNAMGGLETSLRRLYLQGN
RNO	LRR32	ENRSLHLPAWTRAV-SLEVLDLRNNSFSLPAGNAMGGLETSLRRLYLQGN
EEU	LRR32	ENRSLRPLAWTQAV-SLEVLDLRNNSFSLPAGSAMGGLEASLRRLYLQGN
MDO	RRC32	ENQLSWLPWATRQA-SLEELDLRNNFSYLSHDMMSGLEGLTQLRRLYLQGN
SHA	LRR32	ENQLSWLPWATREA-SLEKDLRNNFSHLESRGMMSGLEGLTQLRRLYLQGN
GGA	Uncharacterized	ENQLSWLPKWGSGS-PEVLDLRNNRFSTLQNSNILALENSLKNLYLTGN
MGA	Uncharacterized	ENQLSWLPKWGSGS-PEVLDLRNNRFSTLQNSNILALENSLKNLYLTGN
TGU	Uncharacterized	ENQLNWLPKWSSDS-PEVLDLRNNRFSTLQNSNILALENSLKNLYLTGN
ACA	LRR32	DNQLSWLSPWTEGCCALEVLDLQYNSFSLKNSKIPALENNLRNLYLAGN
XTR	LRR32	GNQLSELPEWNSDC-RLETLDLSLNSFTGLEVSNIPVLENTLKTLSLYGN
GAC	LRR32	GNRLDLLPSSLSGS-PLTEVDIRNNHFESLNEIILDSVRLNIMYISGN
OLA	Uncharacterized	NNRFNEIPLSLACS-PLKSIDISNNAFLTLNHSLIRILSKRLLLMFIAGN

B. Alignments

DRE LRRC32	PLSCCRNPQLLDLLQQLRHPDLAAATCWY--SGDVEQVEVSVSAAALPEL
TRU LRRC32	PLSCCQNLGFLHMQHSAVVVVDIETVTCIH--EYSEPVNIEK--VTQEM
HSA LRRC32	PLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICR----FSSQEEVSLSHVRPED
PTR LRRC32	PLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICR----FSSQEEVSLSHVRPED
PAB LRRC32	PLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICR----FSSQEEVSLSHVRPED
NLE LRRC32	PLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICR----FSSQEEVSLSHVRPED
CPO LRRC32	PLSCCGNGWLTAQLHQGRVDVDATQDLICR----FGSQAEVSLSHVRPED
FCA LRRC32	PLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLTCR----FGSREEVSLSHVRPED
AME Uncharacterized	PLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDPTQELTCR----FGSQEEVALSHVRPED
BTA Uncharacterized	PLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICR----FGSQEEVSLSHVRPED
TTR LRRC32	PLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICR----FGSQEEVSLSHVRPED
SSC LRRC32	PLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLTCH----FGSQEAVALSHVRPED
ECA Uncharacterized	PLSCCGNGWLASQLHQGRVDVDATQDLICR----FGSQEEVSLSHVRPED
MLU LRRC32	PLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICR----FDSQEEVFLSHVRPED
PVA LRRC32	PLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICR----FSSREEVSLSDVRPED
LAF LRRC32	PLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICR----FGSQEEVSLSHVRPED
MMU LRRC32	PLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICR----FGSQEELSLSLVRPED
RNO LRRC32	PLSCCGNGWLAAQLHQGRVDVDATQDLICR----FGSQEEVSLSLVRPED
EEU LRRC32	PLSCCGNGWLATQLHQGRMDVDATQDLVCR---FGSHEEVALSHVRPED
MDO RRC32	PLVCCGNSWLAAVIQRGSVDIASLENLTCRHSKDFSSQEEILFLQIRPED
SHA LRRC32	PLACCGNGWLAQVIRGQSVDIANLEQLMCRHSKDFSSQEEVDFPFLHVRPED
GGA Uncharacterized	PLNCCGNMWSLMIQNKNVQISNVEHLTCQYTNQFGYQEEVHIGNIRPED
MGA Uncharacterized	PLNCCGNIWLSLMIQNKNVQISNIEHLTCQYTNQFGYQEEVHIGNIRPED
TGU Uncharacterized	PLNCCGNIWLSLMIQNKNVQIPNVEHLT---PNFGYQDKMHIRNIRPED
ACA LRRC32	PLSCCGNIWLSHMIHKATVEIPNLDLVKQCQH-----EEEEMHVVNIRPED
XTR LRRC32	PLSCCANTWISHMIRRTAVTIVALNATTCN--ISKLYEGEMLVEQMPDPI
GAC LRRC32	HFNCCDSSWLLILDG-LKMKLPDANDVVCFT---IDRSIAMREYLRNPSG
OLA Uncharacterized	PFHCCDSTWLKLNLN--ETTELPDINETKCYT---NIKNVMIREYLKSPSL
DRE LRRC32	CSSADSRVLWVSLMVALALGLALVLTVSLKLCHSRKHRFKRGFK
TRU LRRC32	CHQESIQNYTIVILMTLVL-LTITLGLLIKYFHSRRQKHSRSFS
HSA LRRC32	CEKGGLKNINLIIILTFILVSAILLTTLAACCVRQKFNQQYK
PTR LRRC32	CEKGGLKNINLIIILTFILVSAILLTTLATCCCVRRQKFNQQYK
PAB LRRC32	CEKGGLKNINLIIILTFILVSAILLTTLATCCCVRRQKFNQQYK
NLE LRRC32	CEKGGLKNINLIIILTFILVSAILLTTLATCCCVRRQKFNQQYK
CPO LRRC32	CEEGGLKNINLIIILTFTLALATLLTTLAACCVRQKFNQQYK
FCA LRRC32	CEKGGLKNVNLIIILTFALVSAVLLTTLATCCCVRRQKFNQQYK
AME Uncharacterized	CEKGGLKNVNLIIILTFALISAILLTTLATCCCVRRQKFSQQYK
BTA Uncharacterized	CEKGGLKNINLIIILTFAVVSAILLTTLATCCCVRRQKFSQQYK
TTR LRRC32	CEKGGLKNVNLIIILTFALVCAILLTTLAACCVRQKFNQQYK
SSC LRRC32	CEKGGLKNVNLVILTFALVAVLLTTLATCCCVRRQKFSQQYK
ECA Uncharacterized	CEKGGLKTVNLIIILTFTLVAAILLTTLATCCCVRRQKFNQQFK
MLU LRRC32	CEEGGLKNVNLIIILTFTLVSAIVLTMLATCCCVRRQKFNQQYK
PVA LRRC32	CEKGELKNVNLIIILTVAVVSAVLLTTLATCCCVRWQKFNQQYK
LAF LRRC32	CEKGGLKNVNLIIILTFALVSAILLTTLATCCYFRRHFTFNQQYK
MMU LRRC32	CEKGGLKNVNLILLLSFTLVSAIVLTTLATICFLRRQKLSQQYK
RNO LRRC32	CEKGGLKNVNLIIILSFTLVSAIVLTTLATCCFLRRQKLSQQYK
EEU LRRC32	CEQGGLGTVNLILLTFALVSLILLTTLATCCCVRRQKFSQQYK
MDO LRRC32	CEKEGLKKNLIIILIFALVLSILLVGLALFCCFCRQDQYITPR
SHA LRRC32	CEKEGLKKNVNLIIILVVLVLSVLLIGVALFCCFCRQEFNQHFK
GGA Uncharacterized	CEKEDLKKINFLIILTVVLVLSVIIIGVGSFFCFRRQNFSSQQFK
MGA Uncharacterized	CEKEDLKKINFLIILTVVLVLSVIIIGVGSFFCFRRQNFSSQQFK
TGU Uncharacterized	CEKEDLKKINFLIILTFVLVLSVIIIGVGSFFCFRRQNFSSHQFK
ACA LRRC32	CEKEDRKKMSVLIILAVALLLSLVVIGVAVFCCYRRHIAYNVIQ
XTR LRRC32	CEK-DWKKVN--VIVTLVLLVIAIGICFFFCFRNRLSRKYK
GAC LRRC32	YCLFHTKAQEINFGTMIVIVLFTVILTVLIIIFTRKRGYCHSVR
OLA Uncharacterized	YCLDK-DSEKVLHGQMVIIIVLFIVVLSATLIVFIRKL-CCLKIS

Tabelle B.3.: Alignment für die Modellierung von GARP

Das für die Erstellung der GARP-Struktur verwendete Aligment. Das Template wurde aus den PDB-Dateien 2O6Q und 2K9J erstellt./ = Unterbrechung der Polypeptidkette im Template

Template GARP	CETVTGCTCNEGKKEVDCQGKSLDSVPSGIPADTEKLDLQSTGLATLSDA --HQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTETLDLSGNQLRSILAS
Template GARP	TFRGLTKLTWLNLDYNQLQTLSAGVFDDLTELGTLGLANNQLA---SLPL PLGFYALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALHLEHLSLAHNRSLAMATLSA
Template GARP	GVFDHLTQLDKLYLGGNQLKSLPSGVFDRL----TELGTLGLANNQLASL GGLGPLPRVTSLDLSGN---SLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRL
Template GARP	PLGVFDHLTQLDKLYLGGNQLKSLPSGVFDRLTKLKELRLNTNQLQSIPA TRHTFRDMPALEQLDLHSNVLMIEDGAFEGPLRLTHLNLNRNSLTCTI--
Template GARP	GAFDKLTNLQTLSTNQLQSVPHK-----LDLQSTGLATLSDA -SDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPD-
Template GARP	TFRGLTKLTWLNLDYNQLQTLSAGVFDDLTELGTLGLANNQLASLPLGVF -LAALPRLIYLNLS-NNLIRLPTGPPQDSKGIHA---PSEGWSALPLSAP
Template GARP	D-----HLTQLDKLYLGGNQLKSLPSGVFDRLTKLKELRLNTNQLQSIP SGNASGRPLSQLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTE
Template GARP	AGAFDKLTNLQTLSTNQLQSVPHGADHLTQLDKLYLGGNQLKSLPSGV ARRLGSPLCLMLLDLSHNALETLELGARALGSLRTLLLQGNALRDLPPYT
Template GARP	FDRLTKLKELRLNTNQLQSIPAGAFDKLTNLQTLSTFRGLTKLTWLNLDYN FANLASLQRLNLQGNRVS--PCGGPDEPGPSGCVAFSGITSLRSLSLVDN
Template GARP	QLQTLSTAGVFDDLTELGTLGLANNQLASLPLGVFDHL-TQLDKLYLGGNQ EIELLRAGAFHL-TPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQNG
Template GARP	LKSLPSGVFDRLTKLKELRLNTNQLQSIPAFDDLTELGTLGLANNQLASL LMVLQVDL-PCFICLKRLNLAENRSLHLPWTQAVSLEVLDLRNNSFSL
Template GARP	PLGVFDHL-TQLDKLYLGGNQLKSLPSGVFDRLTKLKELRLNTNQLQSIP PGSAMGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWL--AAQLHQGRVDVDTQDLI
Template GARP	AGAFDKLTNLQTLSTNQLQSG-----LVIAGILFILGILIVLSRRC C-RFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGKLNINLIIILTFILVSAILLTTAAC
Template GARP	RC----KFNQQQRT CCVRRQKFNQYKA

Tabelle B.4.: Alignment der GARP-Ectodomäne aus *H.sapiens* und *C.milii*
 Die Sequenzen wurde mit ClustlX und den Standardeinstellungen alignt. Die Grenzen der *H. sapiens* Domänen sind oberhalb der Seequenz markiert. Konservierte Cysteine sind blau und nicht konservierte rot markiert.

C. milii		┌	LRR 1	└	LRR 2
H. sapiens	CQDRDLQRIPKGLPLDIRRLNLSVNRISQSLTIDNLTQYSSVHYLNLRNSG				
C. milii		┌	LRR 3	└	LRR 4
H. sapiens	LEFVQPGTFTNLSRLEVLDLADN---FLDLSQRGLGSIPHLRRLLELGGN				
C. milii		┌	LRR 5	└	LRR 6
H. sapiens	SLYNGVVEAFLQALQLHHLSLARNSLTKLTASTFQGCPSLTHLDLQHNI				
C. milii		┌	LRR 7	└	LRR 8
H. sapiens	IIEIESGAFSSLPNLSLTLDLAMETNSITCVVNFSLTQLQVLNLSRNSIES				
C. milii		┌	LRR 9	└	LRR 10
H. sapiens	FQVADS-VEEHQLRWLDLSTNNLLHLPLFPHRNRLEHLDLSRNSIQDFSG				
C. milii		┌	Prolinreiche Region		└
H. sapiens	RPSTLDTEQLDTANRTQPPTPPPPPPPLQVY-FPKLLHLEMETSUNEITAI				
C. milii		┌	LRR 12	└	LRR 13
H. sapiens	PPDLFLRMETPRLVFLNLSNCLDDFSLEAGAGLDALTVDLSSNSLVNL				
C. milii		┌	LRR 14	└	LRR 15
H. sapiens	TLAPGSLPHLRLLYLQENRLHSPHNAFRGLHSLYILSLQNSISICGGG				
C. milii		┌	Cystein loop		└
H. sapiens	LGPSEGGLEPGSGRSRGLGGVPPSSDCLAFHGMETRTLRYLYLKDNGIQ				
C. milii		┌	LRR 17	└	LRR 18
H. sapiens	SVPALAFHLTPSLVDLSINPGLRLHPTSLDGLEVTLTRLSLRGNGLSSL				
C. milii		┌	LRR 19	└	LRR 20
H. sapiens	PLDLAWFPGLRVLDASENHLSELVGGPGAALHLQLSNNNFQALGQAWL				
C. milii		┌	LRRC-T		└
H. sapiens	QVDLPCFICLKRLNLAENRSLHPAWTQAVSLEVLDLRNNSFSLPGSAM				
C. milii		┌	LRRC-T		└
H. sapiens	GRLNATLRTLTLQGNPFNCCQAAWLHC---LERVQVLDLDRPLVQCRYPGNK				
C. milii		┌	Transmembran Bereich		└
H. sapiens	GGLETSLRRLYLQGNPLSCCNGWLAAQLHQGRVDVDTQDLICRFSSQE				
C. milii		┌	Transmembran Bereich		└
H. sapiens	EEMHRLFDSDSLGPASGLCMASSSPEWSRNVLGLALACAAFLAAAILG				
C. milii		┌	Transmembran Bereich		└
H. sapiens	E-----VLSHVRPED---CEKGGKKNINLIIILTFILVSAILLTT--LA				
C. milii		┌	Transmembran Bereich		└
H. sapiens	TYLLWRRKVGLLFVHHVKA				
C. milii		┌	Transmembran Bereich		└
H. sapiens	ACCCVRRQK---FNQYKA				

C. Zusätzliche Daten

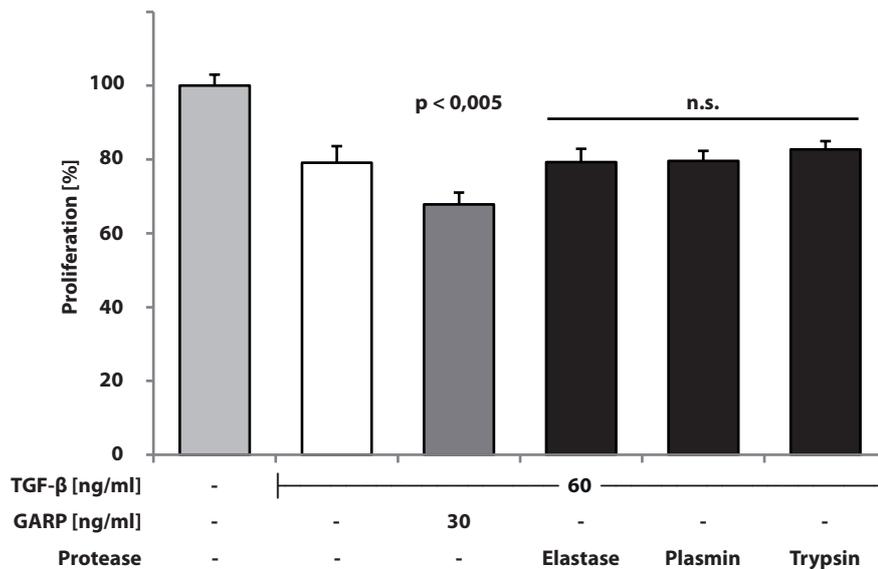


Abbildung C.1.: Kontrolle der Proteasen Elastase, Plasmin und Trypsin auf die TGF-β Aktivierbarkeit

$2,5 \cdot 10^4$ Mv1Lu Zellen wurden für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen an latentem TGF-β_{Strep} allein (weiß), sowie zusammen mit GARP (dunkelgrau) oder mit den Proteasen Elastase, Plasmin und Trypsin inkubiert (Schwarz). Das TGF-β_{Strep} wurde hierbei für mindestens 4 h bei RT mit GARP oder den für den Versuch aus Abbildung 3.31 verwendeten Proteasekonzentrationen inkubiert. Unbehandelte Mv1Lu Zellen dienen dabei als Kontrolle (hellgrau). Anschließend wurde die Zellproliferation über eine Methylenblaufärbung nach FINLAY ET AL. (1984) berechnet. Signifikanzwerte beziehen sich auf die Probe aus TGF-β alleine (weiß).

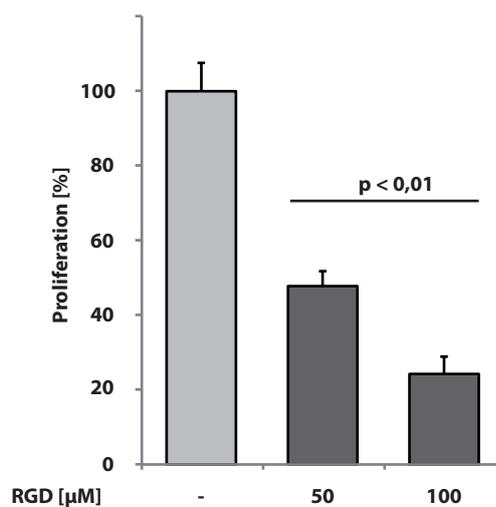


Abbildung C.2.: Kontrolle des Einflusses von RGD–Peptiden auf die Proliferation von Mv1Lu Zellen

$2,5 \cdot 10^4$ Mv1Lu Zellen wurden für 48 h alleine (hellgrau) oder mit 50, beziehungsweise 100 μM des RGD–Peptides (RGDS, *Sigma–Aldrich*) inkubiert (dunkelgrau). Anschließend wurde die Zellproliferation über eine Methylenblaufärbung nach FINLAY ET AL. (1984) berechnet. Signifikanzwerte beziehen sich auf die Zellkontrolle (hellgrau).

D. Plasmidkarten

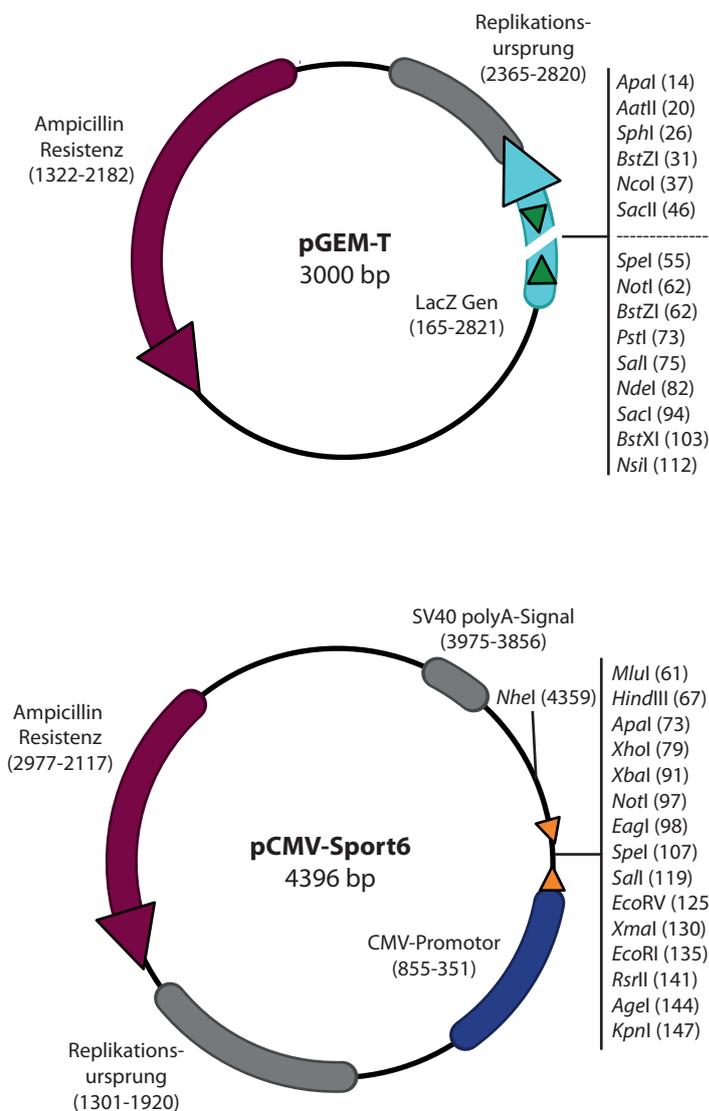


Abbildung D.1.:

pGem-T Vektor

PCR Produkte können direkt über ihre Thymidin Überhänge kloniert werden. Das Insert liegt zwischen dem T7 (2984–3) und SP6 Promoter (143–124) und kann mit entsprechenden Primern sequenziert werden (grüne Dreiecke). Bei der Klonierung wird ein LacZ Gen unterbrochen, sodass ein Blau-Weiß Selektion möglich ist.

Abbildung D.2.:

pCMV-Sport6 Vektor

DNA Abschnitte können mittels des Gateway Klonierungssystems rekombiniert werden. Die Ziel-DNA liegt in der MCS innerhalb der attB Erkennungssequenzen (orange Dreiecke, 36–60 und 157–153). Zusätzlich kann die DNA auch konventionel über den integrierten CMV Promotor in eukaryotischen Zellen exprimiert werden.

Abbildung D.3.:
pBluescriptR Vektor
 In diesem Vektor können DNA-Abschnitte mittels der M13 Primerpaare (grüne Dreiecke, *forward* Primer: 600-616, *reverse* Primer: 863-845) sequenziert werden.

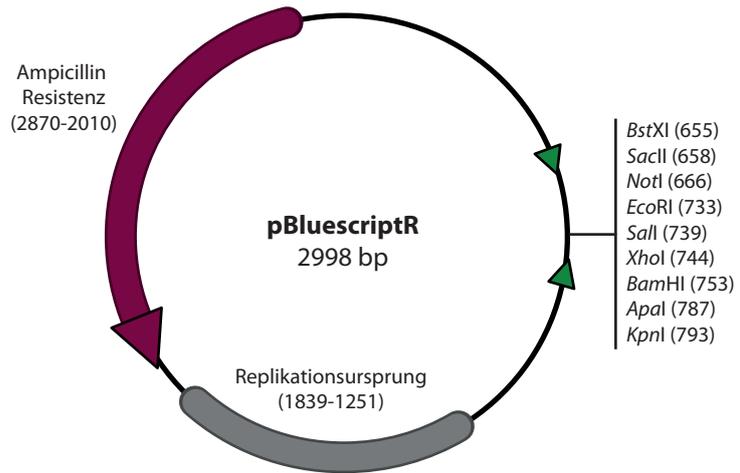


Abbildung D.4.:
pIRES-neo2 Vektor
 Bei dem pIRES-neo2 Vektor handelt es sich um einen eukaryotischen Expressionsvektor, bei dem eine Neomycinresistenz mit dem Wunschprotein coexprimiert wird. Dies wird von einer IRES Struktur im Vektor bewerkstelligt.

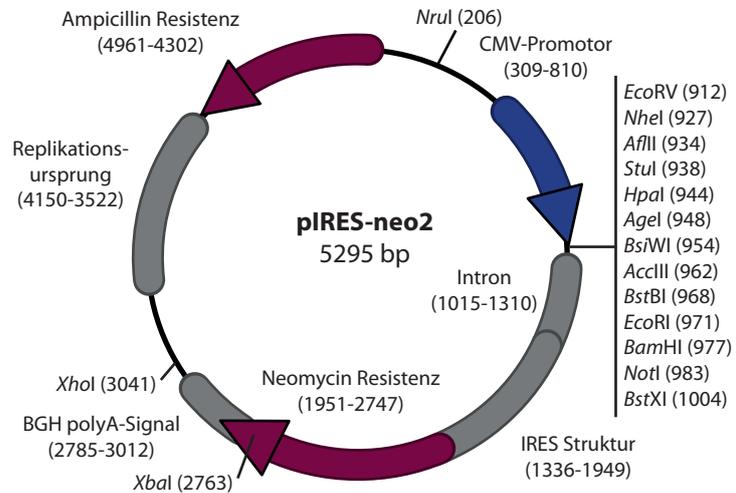
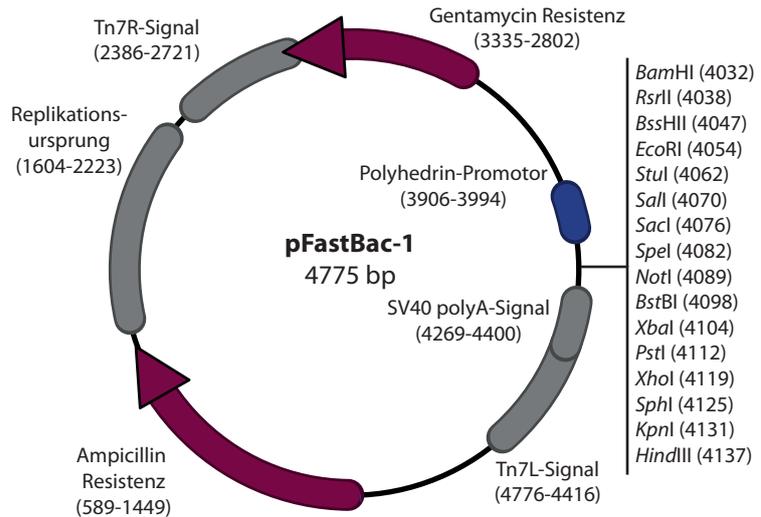


Abbildung D.5.:
pFastBac1 Vektor
 cDNA, die in den pFastBac1 Vektor kloniert wurde kann in das Genom eines Baculovirus (*AcMNPV*) transponiert werden. Mit Hilfe dieser Viren kann dann das Wuschgen in Insektenzellen exprimiert werden.



E. Primer

Tabelle E.1.: **Sequenzen der verwendete Primer**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer zur Erstellung rekombinanter Expressionsvektoren mit ihrer Sequenz, enthaltenen Restriktionsschnittstellen und Tag-Sequenzen. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, Tag-Sequenzen unterschlingelt.

BEZEICHNUNG	SEQUENZ (5'-3')
GARP	
5' UTR	<u>GCT AGC</u> AGC TGA GCG GCC TGC TCC TCC TCG
C-Terminus	TCG GAT CCT ATT <u>TTT CGA ACT GCG GGT GGC TCC</u> <u>AGG CTT TAT ACT GTT GGT TAA ACT TC</u>
TGF-β	
Signalpeptid	GGC <u>CGG CCG GCC</u> GCG GGA CTA TCC <u>TGG AGC CAC</u> <u>CCG CAG TTC GAA AAA</u> ACC TGC AAG ACT
C-Terminus	GAG AAT TCT AGC TGC ACT TGC AGG AGC GCA CGA TCA TGT TG
Bacmid-Primer	
pUC/M13 sense	CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG
pUC/M13 antisense	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG

Tabelle E.2.: Primersequenzen des mRNA Screenings

Die Sequenz aller in dieser Arbeit für das mRNA Screening verwendeten Primer mit ihrer Schmelztemperatur und Produktlänge.

PROTEIN	SEQUENZ (5'-3')	T _m [°C]	PRODUKTLÄNGE
ADAM10			
sense	CCC TGT GCT CTT CTG CTT CAC TCA	60	600 bp
antisense	CCA AGC CAG ACC AAG TAC GCC A	61	
ADAM17			
sense	TCT GGC CGC TGT GTG CCC TA	61	586 bp
antisense	TTC TGG CGA CCG GAT GGT CC	61	
BMP1			
sense	CGT GAG AAC ATC CAG CCA GG	55	559 bp
antisense	CAA CCC AAT TGC TGC TGC TG	55	
GAPDH			
sense	GTT GCC ATC AAT GAC CCC TTC ATT G	59	700 bp
antisense	GCT TCA CCA CCT TCT TGA TGT CAT C	59	
Meprin α			
sense	AAG TCG CAC ACA TCT CCA GC	55	579 bp
antisense	GAT CAC CAT GCC CAG GAC AC	55	
Meprin β			
sense	CAC TGG GAG CTG GCA ACT TT	55	534 bp
antisense	GTT CCA TAG CCC CCA CCT CT	55	
mTLD			
sense	GGC ACC GGG TCA AGC TGA CC	61	237 bp
antisense	CGC ACT CTG TGG CGT GGG AG	61	
Ovastacin			
sense	CAA CAA ATG GCC CAT GGG TGG TA	60	363 bp
antisense	GGC AGG ATC TCG TTC CAG TTG ACA C	62	
TLL1			
sense	AAA TCA GCG CCA CTC CCG GC	63	506 bp
antisense	TGG TGG CCC GGA TCC ACA GA	63	
TLL2			
sense	GGA GTT CCG CAG CAG CAG CA	61	455 bp
antisense	TGG TGG CCC GGA TCC ACA GA	61	

F. DNA- und Proteinsequenzen

Tabelle F.1.: DNA- und Proteinsequenz des Konstrukts TGF- β Strep

```
1 M P P S G L R L L L L L L P L L W L L V L T P G R
1 ATGCCGCCCTCCGGCTGCGGCTGCTGCTGCTGCTACCGCTGCTGTGGCTACTGGTGTGACGCCCTGGCCGG
26 P A A G L S W S H P Q F E K T C K T I D M E L V K
76 CCGGCCCGGGACTATCCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAACCTGCAAGACTATCGACATGGAGCTGGTGAAG
51 R K R I E A I R G Q I L S K L R L A S P P S Q G E
151 CGGAAGCGCATCGAGGCCATCGCGGCCAGATCCTGTCCAAGCTGCGGCTGCCAGCCCCCGAGCCAGGGGGAG
76 V P P G P L P E A V L A L Y N S T R D R V A G E S
226 GTGCCGCCCGCCCGCTGCCCGAGGCGGTGCTGCGCCTGTACAACAGCACCCCGGACCCGGGTGGCCGGGAGAGT
101 A E P E P E P E A D Y Y A K E V T R V L M V E T H
201 GCAGAACCGGAGCCCGAGCCTGAGGCGGACTACTACGCCAAGGAGTCAACCGCGTGCTAATGGTGGAAACCCAC
126 N E I Y D K F K Q S T H S I Y M F F N T S E L R E
276 AACGAAATCTATGACAAGTTCAAGCAGAGTACACACAGCATATATATGTTCTTCAACACATCAGAGCTCCGAGAA
151 A V P E P V L L S R A E L R L R L K L K V E Q H
351 GCGGTACCTGAACCCGTGTTGCTCTCCCGGCAGAGCTGCGTCTGCTGAGGCTCAAGTTAAAAGTGGAGCAGCAC
176 V E L Y Q K Y S N N S W R Y L S N R L L A P S D S
426 GTGGAGCTGTACCAGAAATACAGCAACAATTCCTGGCGATACCTCAGCAACCCGGTGTGGCCACCCAGCGACTCG
201 P E W L S F D V T G V V R Q W L S R G G E I E G F
501 CCAGAGTGGTTATCTTTTGTATGTCACCGGAGTTGTGCGGAGTGGTTGAGCCGTGGAGGGGAAAATTGAGGGCTTT
226 R L S A H C S C D S R D N T L Q V D I N G F T T G
576 GCGCTTAGCGCCACTGCTCCTGTGACAGCAGGGATAACACACTGCAAGTGGACATCAACGGGTTCACTACCGGC
251 R R G D L A T I H G M N R P F L L L M A T P L E R
651 CGCCGAGGTGACCTGGCCACCATTTCATGGCATGAACCGGCTTTCTGCTTCTCATGGCCACCCCGCTGGAGAGG
276 A Q H L Q S S R H R R A L D T N Y C F S S T E K N
726 GCCCAGCATCTGCAAAGCTCCCGGCACCCCGAGCCCTGGACACCAACTATTGCTTCCAGCTCCACGGAGAAGAAC
301 C C V R Q L Y I D F R K D L G W K W I H E P K G Y
801 TGCTGCGTGCGGCAGCTGTACATTGACTTCCGCAAGGACCTCGGCTGGAAGTGGATCCACGAGCCCAAGGGCTAC
326 H A N F C L G P C P Y I W S L D T Q Y S K V L A L
876 CATGCCAATTCTGCCTCGGGCCCTGCCCTACATTTGGAGCCTGGACACGCAGTACAGCAAGTCTCGGCCCTG
351 Y N Q H N P G A S A A P C C V P Q A L E P L P I V
951 TACAACAGCATAACCCGGGCGCCTCGGCGGCGCGTGTGCGTGCCGAGGCGCTGGAGCCGCTGCCATCGTG
376 Y Y V G R K P K V E Q L S N M I V R S C K C S -
1026 TACTACGTGGCGCGCAAGCCCAAGGTGGAGCAGCTGTCCAACATGATCGTGGCTCCTGCAAGTGCAGTAG
```

Tabelle F.2.: DNA- und Proteinsequenz des Konstrukts GARP_{FL}

1 M R P Q I L L L L A L L T L G L A A Q H Q D K V P
1 ATGAGACCCAGATCCTGCTCCTGGCCCTGCTGACCCTAGGCTGGCTGCACAACACCAAGACAAAGTGCCC
26 C K M V D K K V S C Q V L G L L Q V P S V L P P D
76 TGTAAAGTGGTGACAAGAAGGTCTCGTGCCAGGTCTGGGCCTGCTCCAGGTCCCTCGGTGCTCCCGCCAGAC
51 T E T L D L S G N Q L R S I L A S P L G F Y T A L
151 ACTGAGACCCTGATCTATCTGGGAACCGACTGGCAGTATCCTGGCCTCACCCCTGGGCTTCTACACGGCACTT
76 R H L D L S T N E I S F L Q P G A F Q A L T H L E
226 CGTACCTGGACCTGAGCACCAATGAGATCAGCTTCTCCAGCCAGGAGCCTTCCAGGCCCTGACCCACTGGAG
101 H L S L A H N R L A M A T A L S A G G L G P L P R
301 CACCTCAGCCTGGCTCACACCGGCTGGCGATGGCCACTGCGCTGAGTGTGGTGGCCCTGGGCCCTGCCACGC
126 V T S L D L S G N S L Y S G L L E R L L G E A P S
376 GTGACCTCCCTGGACCTGTCTGGGAACAGCCTGTACAGCGGCCTGCTGGAGCGCTGCTGGGGGAGGCACCCAGC
151 L H T L S L A E N S L T R L T R H T F R D M P A L
451 CTGCATACCCTCTACTGGCGGAGAACAGTCTGACTCGCCTCACCCGCCACACCTTCCGGGACATGCCTGCGTG
176 E Q L D L H S N V L M D I E D G A F E G L P R L T
526 GAGCAGCTTGACCTGCATAGCAACGTGCTGATGGACATCGAGGATGGCGCCTTCGAGGGTCTGCCCGCCTGACC
201 H L N L S R N S L T C I S D F S L Q Q L R V L D L
601 CATCTCAACCTCTCCAGGAATTCCTCACCTGCATCTCCGACTTCAGCCTCCAGCAGCTGCGGGTCTAGACCTG
226 S C N S I E A F Q T A S Q P Q A E F Q L T W L D L
676 AGCTGCAACAGCATCGAGGCCTTTCAGACGGCCTCCAGCCCAGGCTGAGTTCAGCTCACCTGGCTGACCTG
251 R E N K L L H F P D L A A L P R L I Y L N L S N N
751 CGGGAGAACAACTGCTCCATTTCCCGACCTGGCCGCTCCCGAGACTCATCTACCTGAACCTGTCCAACAAC
276 L I R L P T G P P Q D S K G I H A P S E G W S A L
826 TCATCCGGCTCCCCACAGGGCCACCCAGGACAGCAAGGCATCCACGCACCTTCCGAGGGCTGGTCAGCCCTG
301 P L S A P S G N A S G R P L S Q L L N L S Y N
901 CCCCTCTCAGCCCCAGCGGAATGCCAGCGGCCGCCCTTCCAGCTCTTGAATCTGATTGAGCTACAAT
326 E I E L I P D S F L E H L T S L C F L N L S R N C
976 GAGATTGAGCTCATCCCGACAGCTTCTTGAGCACCTGACCTCCCTGTGCTTCCAGAACCTCAGCAGAACTGC
351 L R T F E A R R L G S L P C L M L L D L S H N A L
1051 TTGCGGACCTTTGAGGCCCGCGCTTAGGCTCCCTGCCCTGCCTGATGCTCCTTACTTAAGCCACAATGCCCTG
376 E T L E L G A R A L G S L R T L L L Q G N A L R D
1126 GAGACTGGAACCTGGCGCCAGAGCCTGGGTCTCTGCGGACGCTGCTCCTACAGGCAATCCCTGCCGAC
401 L P P Y T F A N L A S L Q R L N L Q G N R V S P C
1201 CTGCCCCATACACCTTTGCCAATCTGGCCAGCCTGCAGCGGCTCAACCTGCAGGGGAACCGAGTCAGCCCTGT
426 G G P D E P G P S G C V A F S G I T S L R S L S L
1276 GGGGGCCAGATGAGCTGGCCCTCCGGCTGTGTGGCCTTCTCCGGCATCACCTCCCTCCGAGCCTGAGCCTG
451 V D N E I E L L R A G A F L H T P L T E L D L S S
1351 GTGGATAATGAGATAGAGCTGCTCAGGGCAGGGCCTTCTCCACACCCCACTGACTGAGCTGGACCTTTCTCC
476 N P G L E V A T G A L G G L E A S L E V L A L Q G
1426 AATCCTGGGCTGGAGGTGGCCACGGGGCCTTGGGAGGCTGGAGGCTCCTTGGAGGCTGGCACTGCAGGGC
501 N G L M V L Q V D L P C F I C L K R L N L A E N R
1501 AACGGCTGATGGTCTGCAGGTGGACCTGCCCTGCTCATCTGCCTCAAGCGGCTCAATCTTCCGAGAACCGC
526 L S H L P A W T Q A V S L E V L D L R N N S F S L
1576 CTGAGCCACCTTCCCGCTGGACACAGGCTGTGTCACTGGAGGTGCTGGACCTGCGAAACAACAGCTTACGCCTC
551 L P G S A M G G L E T S L R R L Y L Q G N P L S C
1651 CTGCCAGGCACTGATGGTGGCTGGAGACAGCCTCCGGCCTCTACCTGCAGGGGAATCCACTCAGCTGC
576 C G N G W L A A Q L H Q G R V D V D A T Q D L I C
1726 TCGGCAATGGCTGGTGGCAGCCAGCTGCACCAGGGCCGTGTGGACGTGGACGCCACCCAGGACCTGATCTGC
601 R F S S Q E E V S L S H V R P E D C E K G G L K N
1801 CGCTTCAGCTCCAGGAGGTGTCCTGAGCCAGTGGCTCCCGAAGACTGTGAGAAGGGGGACTGAAGAAC
626 I N L I I I L T F I L V S A I L L T T L A A C C C
1876 ATCAACCTCATCATCCTCCTCATACTGGTCTCTGCCATCCTCCTCACCAGCTGGCCGCTGCTGCTGC
651 V R R Q K F N Q Q Y K A W S H P Q F E K -
1951 GTCCGCGGCAGAAGTTTAACCAACAGTATAAAGCCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAATAG

Tabelle F.3.: DNA- und Proteinsequenz des Konstrukts GARP_{TS}

1 M R P Q I L L L L A L L T L G L A A Q H H H H H H
 1 ATGAGACCCAGATCCTGCTGCTCCTGGCCCTGCTGACCCTAGGCTGGCTGCACAACCCATCACCATCACCAT
 26 Q L E Q D K V P C K M V D K K V S C Q V L G L L Q
 76 CAACTCGAGCAAGACAAAGTGCCTGTAAGATGGTGGACAAGAAGGTCTCGTGCCAGGTTCTGGCCCTGCTCCAG
 51 V P S V L P P D T E T L D L S G N Q L R S I L A S
 151 GTCCCCCTGGTGTCCCGCCAGACTGAGACCCTTGATCTATCTGGGAACCAGCTGCGGAGTATCCTGGCCTCA
 76 P L G F Y T A L R H L D L S T N E I S F L Q P G A
 226 CCCCTGGGCTTCTACACGGCACTTCGTCACCTGGACCTGAGCACCAATGAGATCAGCTTCTCCAGCCAGGAGCC
 101 F Q A L T H L E H L S L A H N R L A M A T A L S A
 301 TTCCAGGCCCTGACCCACCTGGAGCACCTCAGCCTGGCTCACAACCGGCTGGCGATGGCCACTGCGCTGAGTGT
 126 G G L R V P A L E Q L D L S G N S L Y S G L E
 376 GGTGGCCTGGGCCCCCTGCCACGGTGACCTCCCTGGACCTGTCTGGGAACAGCCTGTACAGCGGCCTGCTGGAG
 151 R L L G E A P S L H T L S L A E N S L T R L T R H
 451 CGGCTGCTGGGGGACCCAGCCTGCATACCCTCTACTGGCGGAGAAGCTGACTCGCCTCACCCGCCAC
 171 T F R D M P A L E Q L D L H S N V L M D I E D G A
 526 ACCTTCCGGGACATGCCTGCGCTGGAGCAGTTGACCTGCATAGCAACGTGCTGATGGACATCGAGGATGGCGCC
 201 F E G L P R L T H L N L S R N S L T C I S D F S L
 601 TTCCAGGGTCTGCCCGCCTGACCCATCTCAACCTTCCAGGAATCCCTCACCTGCATCTCCGACTTCCAGCCTC
 226 Q Q L R V L D L S C N S I E A F Q T A S Q P Q A E
 676 CAGCAGCTGCGGGTGTAGACTGAGCTGCAACAGCATCGAGGCCCTTTCAGACGGCCTCCAGCCCCAGGCTGAG
 251 F Q L T W L D L R E N K L L H F P D L A A L P R L
 751 TTCCAGCTCACCTGGCTTACCTGCGGGAGAACAACCTGCTCCATTCCCGACCTGGCGCGCTCCCGGAGCTC
 276 I Y L N L S N N L I R L P T G P P Q D S K G I H A
 826 ATCTACCTGAACCTTGTCCAACAACCTCATCCGGCTCCCCACAGGCCCACCCAGGACAGCAAGGCATCCACGCA
 301 P S E G W S A L P L S A P S G N A S G R P L S Q L
 901 CCTTCCGAGGGCTGTGTCAGCCCTGCCCTCTCAGCCCCAGCGGAATGCCAGCGGCGCCCTTCCAGCTC
 326 L N L D L S Y N E I E L I P D S F L E H L T S L C
 976 TTGAATCTGGATTTGAGCTACAATGAGATTGAGCTATCCCGACAGCTTCTTGGAGCAGCTGACCTCCCTGTGC
 351 F L N L S R N C L R T F E A R R R L G S L P C L M L
 1051 TTCTGAACCTCAGCAGAACTGCTTGGCGACCTTTGAGGCCCGGCGCTTAGGCTCCCTGCCCTGCCCTGAGCTC
 376 L D L S H N A L E T L E L G A R A L G S L R T L L
 1126 CTTGACTTAAGCCACAATGCCCTGGAGACTGGAAGTGGCGCCAGAGCCCTGGGGTCTCTGGCGAGCTGTCTC
 401 L Q N L A L R D L P P Y T F A N L A S L Q R L N L
 1201 CTACAGGGCAATGCCCTGCGGGACCTGCCCCATACACCTTTGCCAATCTGGCCAGCCTGCAGCGGCTCAACCTG
 426 Q G N R V S P C G G P D E P G P S G C V A F S G I
 1276 CAGGGGAACCGAGTACGCCCTGTGGGGGCGAGATGAGCCTGGCCCTCCGGCTGTGTGGCCTTCTCCGGCATC
 451 T S L R S L V D N E I E L L R A G A F L H T P
 1351 ACCTCCCTCCGACGCTGAGCCTGGTGGATAATGAGATAGAGCTGCTCAGGGCAGGGCCCTTCTCCACACCCCA
 476 L T E L D L S S N P G L E V A T G A L G G L E A S
 1426 CTGACTGAGCTGGACCTTCTTCCAATCCTGGGCTGGAGGTGGCCACGGGGCCTTGGGAGGCTGGAGGCCTCC
 501 L G L A L Q G N G L M V L Q V D L P C F I L K
 1501 TTGGAGTCTGGCACTGCAGGGCAACGGGCTGATGGTCTGCAGGTGGACCTGCCCTGCTTATCTGCTCAAG
 526 R L N L A E N R L S H L P A W T Q A V S L E V L D
 1576 CGGCTCAATCTTGCCGAGAACCGCCTGAGCCACCTTCCCGCTGGACACAGGCTGTGTCAGTGGAGGTGTGGAC
 551 L R N N S F S L L P G S A M G G L E T S L R R L Y
 1651 CTGCGAAACAAGCTTACGCTCCTGCCAGGCAGTGCATGGGTGGCCTGGAGACCAGCCTCCGGCGCTCTAC
 576 L Q G N P L S C C G N G W L A A Q L H Q G R V D V
 1726 CTGACGGGAATCCACTCAGCTGCTGCGCAATGGCTGGCTGGCAGCCAGCTGCACCAGGGCCGTGTGGACGTG
 601 D A T Q D L I C R F S S Q E E V S L S H V R P E D
 1801 GAGCCACCCAGGACCTGATCTGCCGCTTACGCTCCAGGAGGAGTGTCCCTGAGCCAGTGCCTCCCGAAGAC
 626 C E K G G L K N I N L E W S H P Q F E K P T K G K
 1876 TGTGAGAAGGGGGACTGAAGAACATCAACCTCGAGTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAACCCCTAAAAGGCAAA
 651 R L S P Q G L I L Q G Q E Q Q V S E E G S G K A M
 1951 AGACTGAGCCCCAAGGCCTATTCTCCAAGGCCAGGAGCAGGCTCCTCGAAGAAGGTTCCGGAAAGGCCATG
 676 L E E A L P V S L S Q G Q P S R Q K R S V E N T G
 2026 TTAGAGGAAGCCCTACCTGTGAGCCTGAGCCAGGGGAGCCAGCCAGCAGAGAAGCGGTGGTGGAGAACACAGGC
 701 P L E D H N W P Q Y F R D P C D P N P C Q N D G I
 2101 CCCCTGGAGGACCATAAAGTGGCCACAGTACTTACAGAGCCCATGTGACCCAAACCTTGCAAAATGACGGCATC
 726 C V N V K G M A S C R C I S G H A F F Y T G E R C
 2176 TGTGTGAACGTGAAGGGATGGCGAGCTGCAGGTGCATCTCTGGACATGCTTCTTCTACACGGGGAGCGCTGT
 751 Q A V Q V H G S V L G M V I G G T A G V I F L T F
 2251 CAGGCCGTGACAGTGCACGGCAGTGTCTGGCATGTTGATCGGAGGCACGGCTGGCGTATCTTCTGACCTTC
 776 S I I A I L S Q R P R K -
 2326 TCCATCATCGCCATCCTTCCCAAAGGCCAAGGAAGTGA

G. Hersteller und Produzenten

Hersteller	Kontakt	URL
Applichem GmbH	Ottoweg 4 64291 Darmstadt-D	www.applichem.com
Biomers.net GmbH	Söflinger Str. 100 89077 Ulm-D	www.biomers.net
Carl-Roth GmbH & Co. KG	Schoemperlenstr. 1-5 76231 Karlsruhe-D	www.carlroth.de
DIANOVA GmbH	Warburgstr. 45 20354 Hamburg-D	www.dianova.com
Friedrich-Löffler Institut	Suedufer 10 17493 Greifswald-D	www.fli.bund.de
GE Healthcare GmbH	Beethovenstr. 239 42655 Solingen-D	www.gehealthcare.de
Hellma GmbH & Co. KG	Klosterrunsstr. 5 79379 Müllheim-D	www.hellma-analytics.com
IBA GmbH	Rudolf-Wissel-Str. 28 37079 Göttingen-D	www.iba-lifesciences.com
imaGenes GmbH	Robert-Rössle-Str. 10 13125 Berlin-D	www.imagenes-bio.de
Jasco Labor- und Datentechnik GmbH	Robert-Bosch-Str. 11 64823 Gross-Umstadt-D	www.jasco.de
Life Technologies GmbH	Frankfurter Str. 129B 64293 Darmstadt-D	www.lifetechnologies.com
Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Valenciener Str. 11 25335 Düren-D	www.mn-net.com

G. Hersteller und Produzenten

Merck Millipore	Am Kronberger Hang 5 65824 Schwalbach-D	www.emdmillipore.com
New England Biolabs GmbH	Brüningstr. 50 65926 Frankfurt/Main-D	www.neb-online.de
Peqlab Biotechnologie GmbH	Carl-Thiersch-Str. 2B 91052 Erlangen-D	www.peqlab.de
Promega GmbH	Schildkrötstr. 15 68199 Mannheim-D	www.promega.de
Qiagen GmbH	Qiagen Str. 1 40724 Hilden-D	www.qiagen.com
RnD Systems GmbH	Borsigstr. 7a 65205 Wiesbaden-D	www.rndsystems.com
Roche Deutschland Holding GmbH	Emil-Barell-Str. 1 79639 Grenzach-Wyhlen	www.roche.de
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Riedstr. 2 89555 Steinheim-D	www.sigmaaldrich.com

Curriculum Vitae

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit wurde bisher nicht veröffentlicht oder einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Wiesbaden, den 16. Januar 2015

.....

(Sven Fridrich)