Aus dem Institut für Immunologie des Diagnostikzentrums des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor Prof. Dr. Bernhard Fleischer

## Die posttranslationale Modifikation des IL-2-Rezeptors durch ADP-Ribose

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

> Alexander Hann aus Jasi/Rumänien

unter der Betreuung von Prof. Dr. Friedrich Nolte

Hamburg 2008

# Die posttranslationale Modifikation des IL-2-Rezeptors durch ADP-Ribose



Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 8.5.2009 Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. F. Nolte Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. F. Haag Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD. E. Mohr

# Dank

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Friedrich Nolte für die Überlassung des interessanten Themas, seine exzellente Betreuung und seine Hilfsbereitschaft in allen Phasen der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Haag danke ich sehr für seine Betreuung und dafür, dass er immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte.

Herrn Prof. Dr. Michel Seman und Herrn Dr. Sahil Adriouch möchte ich für die Möglichkeit danken unter einer besonders guten Betreuung an der Université de Rouen einen Teil meiner Arbeit zu vollenden. Herrn Prof. Dr. Friedrich Nolte und Herrn Dr. Sahil Adriouch danke ich in diesem Zusammenhang für die Herstellung der Transfektanten in Abb. 15.

Herrn PD Dr. Friedrich Buck aus dem Institut für Klinische Chemie (UKE) danke ich für die massenspektroskopischen Untersuchungen (Tab. 7 und Tab. 8).

Frau Fenja Braasch danke ich für das Einarbeiten in FACS-Analysen und Radio-ADP-Ribosylierungs-Assays (Abb. 13)

Ich möchte Herrn Dr. Peter Bannas besonders danken für die Hilfe bei der Affinitätsaufreinigung etheno-ADP-ribosylierter Proteine (Abb. 8) und den kritischen Gedankenaustausch.

Herrn Dr. Stefan Kernstock, Herrn Dr. Jan Reyelt, Herrn Nikolaus Deigendesch und Herrn Cary MacMillan danke ich für die bereichernden wissenschaftlichen Diskussionen. Frau Fabienne Seyfried und Frau Gudrun Dubberke danke ich für die Tipps bei praktischen Problemen und Hilfestellung bei der Durchführung von Experimenten.

Bei allen Mitgliedern des Diagnostiklabors und des Forschungslabors des Instituts für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf sowie bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Fleischer bedanke ich mich für die Unterstützung, die freundliche Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit im Labor.

Ein großer Dank gebührt meinen Eltern, Frau Carmen Hann und Herrn Dr. Florian Hann, die mich während aller Phasen dieser Arbeit unterstützt haben.

# Inhaltsverzeichnis

1.	Zus	ammenfassung	7
	1.1	Abstract	8
2.	Einl	eitung	9
	2.1	ADP-Ribosylierung	9
	2.1.	1 ADP-Ribosyltransferasen	9
	2.1.	2 Prokaryotische Toxin-ADP-Ribosyltransferasen	9
	2.1.	3 Struktur und Lokalisation der ART2	.10
	2.1.	4 Enzymatische Reaktion der mono-ADP-Ribosylierung	.11
	2.1.	5 Rolle der ART1 und ART2 im Immunsystem	.12
	2.2	Der Interleukin-2-Rezeptorkomplex	.13
	2.2.	1 Die alpha-Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors	.14
	2.2.	2 Signaltransduktionskaskade des IL-2-Rezeptors	.15
	2.2.	3 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> regulatorische T-Zellen	.17
3.	Ziel	setzung	. 19
4.	Mat	erialien	.20
	4.1	Laborgeräte	.20
	4.2	Verbrauchsmaterialien	.20
	4.3	Mausstamm	.20
	4.4	Zelllinien	.20
	4.5	Bakterienstamm	.21
	4.6	Antikörper	.21
	4.7	Chemikalien	.21
	4.8	Enzyme	.22
	4.9	Primer	.22
	4.10	Plasmide	.24
	4.11	Medien und Lösungen	.24
	4.11	.1 Zellkulturmedien	.24
	4.11	.2 Bakterienkulturmedien	.25
	4.11	.3 Puffer für Zelllysen	.25
	4.11	.4 Gey-Lösung zur Erythrozytenlyse	.25
	4.11	.5 SDS-PAGE und Westernblot	.26
	4.12	Reagenzsysteme (Kits)	.26
5.	Met	hoden	.27
	5.1	Immunologische Methoden	.27
	5.1.	1 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	.27
	5.1.	2 Messung der ART2.2-Aktivität	.27
	5.1.	3 FACS-Assay der STAT5-Phosphorylierung	.29
	5.2	Methoden der <i>in silico</i> Recherche	.30
	5.2.	1 Virtueller Verdau von Proteinen	.30
	5.2.	2 Multiple Sequenzalignments	.30
	5.2.	3 3D-Strukturvorhersagen	.30
	5.3	Methoden der Zellbiologie	.31
	5.3.	1 Kultivierung eukaryotischer Zellen	.31
	5.3.	2 Gewinnung von humanen T-Lymphozyten aus Vollblut	.31
	5.3.	3 Gewinnung von CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten aus Maus-Lymphknoten und Milz	.31
	5.3.	4 ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen mittels <sup>32</sup> P-NAD	.32
	5.3.	5 Transiente Transfektion von HEK-T Zellen mit Hilfe des JetPEI-Reagenz	.32

	5.4 Meth	hoden Proteinbiochemie	33
	5.4.1	Immunpräzipitation mit Protein-G-Sepharose	33
	5.4.2	Immobilisation des 1G4 mAb an eine Immunpräzipitationsmatrix	33
	5.4.3	SDS-PAGE und Westernblot-Analysen	34
	5.4.4	Chemilumineszenz-Detektion und Autoradiographie	34
	5.5 Meth	hoden der Molekularbiologie	34
	5.5.1	Gesamt RNA Isolierung	34
	5.5.2	Konzentrationsbestimmung der RNA	35
	5.5.3	cDNA-Synthese	35
	5.5.4	PCR-Primer Design	35
	5.5.5	Gradienten PCR Amplifikation	36
	5.5.6	Agarose-Gelelektrophorese	36
	5.5.7	Aufreinigung von DNA Banden aus Agarosegelen	37
	5.5.8	Restriktionsenzymatischer Verdau von DNA-Fragmenten	37
	5.5.9	Ligation von DNA Fragmenten	37
	5.5.10	DNA-Sequenzierung nach Sanger	38
6.	Ergebniss	Se	39
	6.1 Nacl	hweis von ART2-Zielproteinen auf der murinen T-Lymphomzelllinie YAC-	-1
	und auf prin	nären murinen T-Zellen	39
	6.1.1	Expression und Aktivität von ART2 auf der Lymphomzelllinie YAC-1	40
	6.1.2	Markierung und Aufreinigung von ART2-Zielproteinen	40
	6.1.3	Massenspektrometrische Identifikation der aufgereinigten ART2-Zielprotei 43	ine
	6.1.4	Nachweis der ADP-Ribosylierung bestimmter identifizierter ART2-	
	Zielprotei	ine	46
		Nachweis der Expression mittels FACS	46
		Beeinflussung der Bindung von Antikörpern gegen ART2-Zielproteine du	ırch
		etheno-ADP-Ribosylierung	47
		Nachweis der ADP-Ribosylierung bestimmter Zelloberflächenproteine	
		mittels radioaktiv markiertem NAD	48
	6.1.5	ADP-Ribosylierung von CD25 durch die ART2 auf murinen CD4 <sup>+</sup> T-Zelle	n 50
	6.2 Anal	lyse von CD25 als Zielprotein der ART auf IL-2-abhängigen Zelllinien	51
	6.2.1	Transfektion von muriner ART2.2 und humaner ART1 in die IL-2-abhängi	gen
	Lymphon	nzelllinien CTLL-2 und Kit 225	51
	6.2.2	ADP-Ribosylierung von murinem und humanem CD25 durch die ART2.2	und
	ANTT 6.2.2	J2 Hammung dar H. 2 induziartan STAT5 Dhaenharuliarung durah ADD	
	0.2.5 Dibogulio	rung von Zollmombrannrotoinon	54
	6.2 Klor	nung von Zeinnemoranproteinen	
	bumonom C	D25 zur Identifikation der ADP Ribegylierungsstelle	56
	6 3 1	Klonierung des murinen und humanen CD25	50
	632	ADP Ribosylierung auf ART transient transfizierten HEK T Zellen	50
	633	Restimmung der Arginine in der Sekundärstruktur von CD25	57
	634	ADP-Ribosylierung der konservierten Arginine in murinem CD25	
	635	ADP-Ribosylierung der nicht konservierten Arginine in murinem CD25	00
	636	ADP-Ribosylierung der konservierten Arginine in humanem CD25	
7	Diskussic	n	, 0
/.	71 Nacl	hweis von ART2-Zielproteinen auf der murinen T-I vmnhomzelllinie VAC-	.1 72
	7.2 CD2	25 als Zielprotein der ART1 und ART2 2 auf IL-2-abhängigen Zelllinien	77
	7.3 Loka	alisation der ADP-Ribosylierungsstelle am CD25	79
	=	,	

7.4	Ausblick	. 82
8. Li	iteratur	. 83
9. A	nhang	. 89
9.1	Aminosäuresequenz der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine	. 89
9.2	Übersicht der per Massenspektrometrie identifizierten putativen ART2-Zielprotei	ne
	92	
9.3	Abkürzungsverzeichnis	.95
10.	Lebenslauf	.96
11.	Eidesstattliche Erklärung	. 98

# 1. Zusammenfassung

Die ADP-Ribosylierung ist eine reversible, kovalente Modifikation von Proteinen, bei der ADP-Ribose von NAD auf Aminosäure-Seitenketten in Zielproteinen übertragen wird. Zu den Arginin-spezifischen Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) gehören bakterielle Toxine wie Choleratoxin und *Salmonella enterica* SpvB Toxin sowie membranständige Ektoenzyme von Säugetieren. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Identifikation von Zielproteinen auf der ART2-exprimierenden Zelllinie YAC-1 und der anschließenden Charakterisierung des neu beschriebenen ART-Zielproteins CD25.

Im ersten Teil der Arbeit wurden ART-Zielproteine in der murinen YAC-1 Lymphomzelllinie mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen identifiziert. Die alpha-Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) sowie das Adhäsionsprotein CD229 wurden mittels radioaktivem ADP-Ribosylierungs-Assay als Hauptziele dieser posttranslationalen Modifikation in dieser Zelllinie bestätigt. CD25 stellt in diesen Zellen dabei das Zielprotein dar, das am meisten Radioaktivität inkorporiert. Es konnte gezeigt werden, dass CD25 ebenfalls auf der Oberfläche von primären murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen ADP-ribosyliert wird. Diese CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Zellen (so genannte natürliche regulatorische T-Zellen, Tregs) machen in der Maus nur einen kleinen Prozentsatz der CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus.

Nach stabiler Transfektion von humaner ART1 bzw. muriner ART2.2 in die Interleukin-2 (IL-2)-abhängige humane Kit 225 sowie die murine CTLL-2 Zelllinien gelang im zweiten Teil der Arbeit der Nachweis, dass sowohl die murine als auch die humane Form von CD25 auf diesen Zellen prominente Zielproteine der ADP-Ribosylierung darstellen. Mit diesen stabil-transfizierten Zellen wurde zudem ein Zellkulturmodell etabliert zur Untersuchung der ob die ADP-Ribosylierung einen Einfluss auf die IL-2-abhängige Frage, Signaltransduktionskaskade ausübt. Es konnte in der Tat gezeigt werden, dass die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen auf CTLL-2 Zellen die IL-2-abhängige Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT5 hemmt.

Der dritte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Identifikation der ADP-Ribosylierungsstelle(n) in der extrazellulären Domäne von murinem und humanem CD25. *In silico*-Analysen zeigen, dass sechs Arginine bei CD25 aus Maus, Mensch und Ratte konserviert, sowie je fünf weitere bei Maus und Mensch nicht konserviert sind. Die 3D-Kristallstruktur der humanen und das mit Hilfe dessen angefertigte 3D-Strukturmodell der murinen CD25 zeigen, dass alle konservierten Arginine an der Moleküloberfläche liegen und damit ART1 bzw. ART2.2 prinzipiell zugänglich sind. Die Ergebnisse von ADP-Ribosylierungs-Assays nach Kotransfektionen von ART2.2 und murinem bzw. humanem CD25 in humane HEK-T Zellen zeigen, dass humanes CD25 in diesen Zellen wesentlich stärker als die murine Form ADP-ribosyliert wird. Die Beobachtung, dass sämtliche zielgerichtete Arginin-Einzelmutanten von CD25 nach Ko-transfektion mit ART in HEK-T Zellen noch radio-ADP-ribosyliert werden, legt nahe, dass CD25 an mehr als einem Arigninrest ADP-ribosyliert wird.

Die Ergebnisse der Arbeit weisen neue potentielle ART-Zielproteine auf und geben Hinweise auf eine mögliche funktionelle Rolle der posttranslationalen Modifikation der Interleukin-2-Rezeptor alpha-Untereinheit (CD25) mit ADP-Ribose.

### 1.1 Abstract

ADP-ribosylation is a reversible covalent protein modification in which ADP-ribose is transferred from NAD to side chains of target proteins. Members of the group of arginine specific mono-ADP-ribosyltransferases (ARTs) are bacterial toxins like Cholera toxin and *Salmonella enterica* SpvB toxin as well as endogenous mammalian membrane bound ecto enzymes. The present study focuses on the identification of target proteins on the ART2-expressing lymphoma cell line YAC-1 and the subsequent analysis of the newly identified ART target protein CD25.

In the first part of the study (etheno)-ADP-ribosylated proteins on the YAC-1 lymphoma cell line were isolated and identified by mass spectrometry. The alpha subunit of the interleukin-2 receptor (CD25) as well as the adhesion molecule CD229 were confirmed as main targets of the ADP-ribosylation on YAC-1 cells by radioactive ADP-ribosylation assays. On these cells, CD25 incorporates more radioactivity than any other target protein. Additional results show that CD25 can be ADP-ribosylated on the cell surface of murine CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. These CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> cells (called regulatory T cells, Tregs) represent a small group of the CD4<sup>+</sup> T cell population.

In the second part of the study, stable transfection of human ART1 or murine ART2.2 in the interleukin 2 dependent human cell line Kit 225 and murine cell line CTLL-2 led to the confirmation of CD25 as a prominent ADP-robosylation target in these cells as well. The ART2.2-transfected interleukin 2 dependent cell line CTLL-2 provided a new model for measuring the effect of cell surface ADP-ribosylation on signal transduction via the interleukin 2 receptor. Indeed, the results of this study indicate that ADP-ribosylation of cell surface proteins inhibits the interleukin 2-induced phosphorylation of STAT5.

The third part of the study concerns the identification of the ADP-ribosylation site(s) in the extracellular domains of human and murine CD25. *In silico* analyses revealed six conserved arginine residues in human, mouse and rat CD25, as well as additional five nonconserved arginines each, in human and mouse CD25. The 3D-structure of human CD25 and a subsequent computer generated 3D-model of murine CD25 reveal that all conserved arginines are exposed on the protein surface and, therefore, present potential ADP-ribosylation sites. The results of radio-ADP-ribosylation assays with human HEK-T cells transiently co-transfected with ART2.2 and human or murine CD25 indicate that the human form is a much better ADP-ribosylation target in these cells than its murine counterpart. Site-directed mutagenesis of each arginine in murine CD25 and each conserved arginine in human CD25 to lysine and subsequent radioactive ADP-ribosylation assays in ART-co-transfected HEK cells provided evidence that CD25 is ADP-ribosylated on multiple sites.

Taken together, the results of this study identify new potential ART-target proteins and indicate possible functional consequences of the posttranslational modification of CD25 by ADP-ribose.

# 2. Einleitung

## 2.1 ADP-Ribosylierung

Bei der Adenosindiphosphat (ADP)-Ribosylierung handelt es sich um eine kovalente, reversible Modifikation von Proteinen. Durch diese posttranslationale Modifikation kann die Funktionsweise diverser Zielproteine verändert werden. Bei der Mono-ADP-Ribosylierung, die bakterielle Toxine und bei Säugetieren extrazelluläre, endogene Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) katalysieren, wird ADP-Ribose von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) auf ein Substrat, welches meist eine Aminosäure ist, übertragen (Haag and Koch-Nolte 1997; Corda and Di Girolamo 2003; Fieldhouse and Merrill 2008; Koch-Nolte, Kernstock et al. 2008). Poly-ADP-Ribose-Polymerasen (PARPs) katalysieren die Poly-ADP-Ribosylierung, bei der am Zielprotein ein verzweigtes Polymer aus ADP-Ribosegruppen erzeugt wird (Hassa and Hottiger 2008). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der ADP-Ribosylierung von Membranproteinen auf der Oberfläche von Lymphozyten.

## 2.1.1 ADP-Ribosyltransferasen

Die Familie der ARTs besteht aus vier Mitgliedern in der humanen (ART1, ART3, ART4, und ART5) und sechs Mitgliedern in der murinen (ART1, ART2.1, ART2.2, ART3, ART4 und ART5) Spezies (Glowacki, Braren et al. 2002). Die Familie der PARPs besitzt Mitglieder bestehend aus mehreren Domänen, welche intrazellulär zu finden sind. Dabei ist die katalytische ART-Domäne mit anderen Domänen verbunden. Diese können verschiedene Funktionen ausüben, wie z.B. Protein-, oder Nukleinsäurebindungen ausbauen. Es sind 17 Mitglieder in der humanen und 16 in der murinen Spezies beschrieben. Dabei fehlt der Maus das Gen für PARP7 (Otto, Reche et al. 2005).

#### 2.1.2 Prokaryotische Toxin-ADP-Ribosyltransferasen

Viele prokaryotische ADP-Ribosyltransferasen werden als Toxin-Enzyme sezerniert. Man war sich daher der klinischen Auswirkungen von Erregern, die ART-Toxine bildeten, schon früh bewusst. So erhielt Emil von Behring 1901 den ersten Nobelpreis für Medizin aufgrund seiner Arbeit mit Paul Ehrlich in welcher er das Serum immunisierter Pferde dazu benutze, um die Diphtherie zu behandeln (Winau and Winau 2002). Das Diphtherietoxin wurde über 50 Jahre später als erstes Enzym mit ADP-Ribosylierungsfähigkeit beschrieben (Honjo, Nishizuka et al. 1968). Durch die ADP-Ribosylierung des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (EF2) konnte es die Proteinbiosynthese inhibieren (Collier 2001).

Eine Vielzahl weiterer bakterieller Toxine mit ART-Aktivität wurde seit dem beschrieben. Dazu zählen Toxine von Erregern wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Bordetella pertussis*, *Clostridium botulinum* und *Salmonella enterica*. Zu ihren intrazellulären Zielproteinen zählen GTP-bindende Proteine wie ras oder rho, aber auch Zytoskelettbestandteile wie Aktin (Aktories and Just 2000).

### 2.1.3 Struktur und Lokalisation der ART2

Bei der vorliegenden Dissertation wurde die Funktion von mono-ARTs des Menschen und der Maus untersucht. Dabei kamen Zellen der lymphoiden Zellreihe zum Einsatz. Auf diesen Zellen werden in der Maus die ursprünglich als RT6 bezeichneten Enzyme ART2 exprimiert. Das beim Menschen durch drei aufeinander folgende Stop-Codone inaktivierte ART2-Gen auf dem Chromosom 11 (Koch-Nolte, Haag et al. 1993; Haag, Koch-Nolte et al. 1994) wird bei der Maus in zwei Formen codiert (Hollmann, Haag et al. 1996). Die vermutlich durch Duplikation entstandenen Gene ART2.1 und ART2.2 liegen tandemartig in syntenischer Lage auf dem Chromosom 7 und zeigen zueinander eine hohe Nukleotidsequenzähnlichkeit von 87 % mit einer entsprechend hohen Aminosäuresequenzähnlichkeit von 79 %. Ein Unterschied stellt die Aktivität dar. ART2.1 ist wahrscheinlich aufgrund zweier zusätzlicher Cysteinreste, welche bei keiner anderen ART beschrieben sind (Glowacki, Braren et al. 2002), nur bei gleichzeitigem Vorhandensein von reduzierenden Mitteln wie Dithiothreitol (DTT) aktiv (Hara, Badruzzaman et al. 1999). Beide ART2-Enzyme werden bei der Maus auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten exprimiert und zeigen bei Überexpression in vitro ein ähnliches Muster von ADP-ribosylierten Proteinen an (Koch-Nolte, Duffy et al. 1999; Krebs, Koestner et al. 2003).

Die Tertiärstruktur der Ratten-ART2 wurde 2002 von Mueller-Dieckmann et al. durch kristallographische Röntgenstrukturanalysen aufgeklärt (Mueller-Dieckmann, Ritter et al. 2002; Mueller-Dieckmann, Scheuermann et al. 2002). Da sie mit dem Substrat NAD kokristallisiert wurde, konnte das aktive Zentrum besser dargestellt werden. Aufgrund des keilförmigen aktiven Zentrums in dem sonst rund anmutenden Enzym, wurde die Analogie zum "Pacman" gewählt und in den schematischen Abbildungen in dieser Arbeit fortgeführt.

Die ART2.2, welche zusammen mit der ART2.1 auf naiven T-Lymphozyten der Maus exprimiert wird (Ohlrogge, Haag et al. 2002), hat als Verbindung zur Zelloberfläche einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker (Okazaki, Kim et al. 1996). Diese Verbindung kann durch exogene Zugabe einer bakteriellen Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) oder durch endogen sezernierte Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase D (PI-PLD) gelöst werden. Alternativ kann nach Aktivierung der T-Zelle mit anti-CD3 mAb oder PMA die ART2.2 durch die Proteinase TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TACE) proteolytisch von der Zelloberfläche freigesetzt werden. Die somit losgelöste ART2.2 behält zwar noch ihre ADP-Ribosylierungsfunktion, verliert aber in *in vitro* Studien fast ihr gesamtes Potential Proteine auf der Zelloberfläche zu modifizieren (Kahl, Nissen et al. 2000).

Die Expression des GPI-Ankers legt die Assoziation von ART2.2 mit den sogenannten "membrane rafts" nahe (Horejsi 2003). Bekannte Beispiele für membrane rafts und ihre Funktionen stellen der T-Zell-Rezeptor (TCR) (Horejsi 2003) und die Immunologische Synapse (Bromley, Burack et al. 2001) dar.

In unserer Arbeitsgruppe konnte 2005 durch Bannas et al. gezeigt werden, dass ART2.2 ebenfalls mit "membrane rafts" assoziiert ist und diese Assoziation sich auf die Aktivität und

Spezifität des Enzymes auswirkt (Bannas, Adriouch et al. 2005). Nach Auflösung der "membrane rafts" durch Zugabe von Methyl-β-Cyclodextrin (MCD) vervielfachte sich die Anzahl an Zielprotein-Banden in dem radioaktiven ADP-Ribosylierungs-Assay auf so behandelten Zellen, was ein Indiz dafür ist, dass die Assoziation der ART2.2 mit "membrane rafts" die Zielproteinspezifität beeinflusst.

### 2.1.4 Enzymatische Reaktion der mono-ADP-Ribosylierung

Die ADP-Ribosylierung wird bei Säugetier-Mono-ARTs ART1, ART2.1, ART2.2 und ART5 argininspezifisch durchgeführt. Die dafür benötigte Aminosäuresequenz ist im aktivem Zentrum des Enzyms konserviert und lautet R-S-EXE (Glowacki, Braren et al. 2002).

Wie bereits erwähnt, wird bei der ADP-Ribosylierung NAD durch die ART gebunden und ADP-Ribose auf eine spezifische Zielaminosäure übertragen (Jacobson and Jacobson 1989; Aktories 1991). Im Fall der ART2.2 ist das die Aminosäure Arginin. Dabei wird Nicotinamid freigesetzt. Die Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung zwischen Nicotinamid und der Ribose-Gruppe des NAD ist aufgrund des hohen Energiegehaltes der Bindung eine exotherme Reaktion. Es entsteht -34,3 kJ/mol freie Energie. Diese Energie wird dazu verwendet die ADP-Ribosegruppe an dem Aminosäurerest zu binden. Siehe dazu Abb. 1. Der Nachweis ADP-ribosylierter Proteine wird in Kapitel 5.1.2 erläutert.



**Abb. 1 Modell der ADP-Ribosylierung** Die Abbildung zeigt die, über ein GPI-Anker membrangebundene mono-ADP-Ribosyltransferase (ART), welche mit Hilfe von NAD den Argininrest eines Proteins (hier: CD25) ADP-ribosyliert. Dabei wird Nicotinamid freigesetzt (Modifiziert nach Krebs, Koestner et al. 2003) a = Adenosin, r = Ribose, n = Nicotinamid

#### 2.1.5 Rolle der ART1 und ART2 im Immunsystem

Die ADP-Ribosyltransferase (ART) 2.2 wird in der Maus auf T-Lymphozyten exprimiert (Ohlrogge, Haag et al. 2002). Auf diesen Zellen ist es für die ADP-Ribosylierung verschiedener Zelloberflächenproteine, wie das Integrin LFA-1 (Nemoto, Yu et al. 1996) oder den Purinorezeptor P2X7 (Seman, Adriouch et al. 2003) verantwortlich. Weitere Zielproteine sind der Korezeptor für MHC I CD8, CD27, der Ligand von ICAM-1 CD43, ein Hyaluronanrezeptor CD44 und die Tyrosinphosphatase CD45 (Okamoto, Azhipa et al. 1998). Die Zugabe von NAD *ex vivo* zeigte bei T-Zellen eine Inhibierung der induzierten Zellproliferation, der Zytotoxizität, und eine inhibierte Zytokinsekretion. Ebenfalls wurde das Phänomen des NAD induzierten Zelltodes (NAD induced cell death, NICD) von murinen T-Zellen näher untersucht. Die Tatsache, dass ART2 KO Mäuse (Ohlrogge, Haag et al. 2002) und T-Zellen, welche zuvor mit Antikörpern gegen ART2 inkubiert wurden (Seman, Adriouch et al. 2003) dieses Phänomen nicht aufweisen, macht eine Beteiligung des *ecto*-Enzymes wahrscheinlich. Die ADP-Ribosylierung des Purinorezeptors P2X7 an dem Arginin 125 (Adriouch, Bannas et al. 2007) wurde für die Porenformation des Rezeptors verantwortlich gemacht, die apoptotische Zellprozesse in Gang bringt. Dabei reichen bereits

inflammationsbedingte Mengen an NAD *in vivo* aus um ein NICD der T-Zellen auszulösen (Adriouch, Hubert et al. 2007). Ein Gegenspieler in diesem System stellen zum einen Metalloproteasen dar, welche die ART2 nach Aktivierung der T-Zelle von der Zelloberfläche lösen (Kahl, Nissen et al. 2000) und somit die ADP-Ribosylierung des P2X7 erschweren (Liu, Azhipa et al. 2001).

Ein anderer Gegenspieler, welcher dazu führt, dass das freigesetzte NAD rasch abgebaut wird, ist die *ecto*-NAD-Glukohydrolase (*ecto*-NADase) CD38 (Krebs, Adriouch et al. 2005). Dieses Enzym verhindert somit ebenfalls die ADP-Ribosylierung von P2X7 und dadurch den NICD. Um die ADP-ribosylierten Proteine in dieser Arbeit besser untersuchen zu können, wurden zu dem NAD größere Mengen an ADP-Ribose hinzugefügt. Dieses sollte CD38 kompetitiv hemmen (siehe Kapitel 5.3.4). Es wurde ebenfalls darauf geachtet, bei der Charakterisierung des ADP-Ribosylierungsmusters auf murinen T-Zellen *ex vivo*, P2X7 KO Mäuse zu verwenden, um einen NICD zu verhindern (siehe Kapitel 6.1.5)

Im Zusammenhang mit der Rolle der humanen ART1 im Immunsystem wurde als Zielprotein das "neutrophil-derived peptide1" (HNP-1) beschrieben. Dieses, zur Klasse der Defensine gehörende Protein, wird zum angeborenen Immunsystem gezählt und übt neben antimikrobiellen auch chemotaktische Funktionen aus (Ganz 1999). Durch die humane ART1 wird HNP-1 an den Argininen 14 und 24 ADP-ribosyliert, was zu einem Verlust seiner zytotoxischen und antimikrobiellen Aktivität führt. Es behält jedoch seine chemotaktische Wirkung (Paone, Wada et al. 2002). Diese Modifikation des Defensins wurde in Lungen von Rauchern, Patienten mit Zystische Fibrose oder Asthma, beobachtet (Paone, Stevens et al. 2006).

## 2.2 Der Interleukin-2-Rezeptorkomplex

Interleukin 2 (IL-2) übt seine Funktion aus, indem es sowohl mitogene (Smith 1988) als auch differenzierende Wirkungen (Tigges, Casey et al. 1989) auf Lymphozyten aufweist. Das Zytokin wirkt über den heterotrimeren Komplex des Interleukin-2-Rezeptors. Dabei bindet IL-2 zuerst an die α-Kette des Rezeptors (p55, Tac, CD25), welche sich anschließend mit der β- (p75, CD122) und γ-Kette (common Gamma, p64, CD132) zusammenlagert (Rickert, Wang et al. 2005). Die Aufgabe der α-Kette ist es, aufgrund ihrer IL-2-Affinität, zur schnellen Assoziationsrate des heterotrimeren Rezeptors beizutragen. Aufgrund ihrer kurzen zytoplasmatischen Domäne beteiligt sie sich nicht an der Signaltransduktion (Wang and Smith 1987). Mutationen der intrazellulären Phosphorylierungsstellen zeigten keine für die IL-2 Affinität oder den Ablauf der intrazellulären Konsequenzen Signaltransduktionskaskade (Hatakeyama, Minamoto et al. 1986). Einfluss auf die Signaltransduktionskaskade haben die beiden anderen Rezeptoruntereinheiten  $\beta$  und  $\gamma$ (Nakamura, Russell et al. 1994), welche üblicherweise alleine auf naiven T Zellen exprimiert werden (Kondo, Ohashi et al. 1994). Ihre Affinität zu IL-2 ist jedoch so gering, dass 10-50 fach höhere Konzentrationen des Zytokins, als in vivo beschrieben sind, nötig wären um sie zu aktivieren (Gaffen 2001).

Der Rezeptor teilt sich die für die Signaltransduktion wichtige  $\beta$ -Kette mit dem IL-15-Rezeptor (Grabstein, Eisenman et al. 1994) und die  $\gamma$ -Kette mit dem IL-4-Rezeptor (Kondo, Takeshita et al. 1993; Russell, Keegan et al. 1993), IL-7-R (Noguchi, Nakamura et al. 1993), IL-9-R (Kimura, Takeshita et al. 1995) und dem IL-15-R (Giri, Ahdieh et al. 1994). In der vorliegenden Arbeit wird die posttranslationale Modifikation des CD25 durch ADP-Ribose untersucht.

#### 2.2.1 Die alpha-Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors

Obwohl die alpha-Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) nicht an der Signaltransduktion aufgrund ihres kurzen zytoplasmatischen Teils teilnimmt, spielt sie bei der physiologischen Antwort auf den IL-2-Reiz eine wichtige Rolle. Die beta- und gamma-Kette können zwar *in vitro* die Zellen zusammen mit IL-2 aktivieren (Nakamura, Russell et al. 1994). Durch ihre niedrige Affinität zu dem Zytokin bräuchte es jedoch höhere IL-2 Konzentrationen als unter physiologischen Bedingungen beobachtet wurden. Dies wird ebenfalls durch den ähnlichen Phänotyp von IL-2 KO- *versus* IL-2Rα KO-Mäusen deutlich (Sadlack, Merz et al. 1993; Willerford, Chen et al. 1995). Fallberichte, in denen die Alphauntereinheit beim Menschen funktionsunfähig wurde, machen ebenfalls deutlich, dass die körpereigenen IL-2-Konzentrationen nicht ausreichen, um den Ausfall zu kompensieren (Sharfe, Dadi et al. 1997).

Die Kristallstruktur der humanen Interleukin-2-Rezeptoruntereinheit a zeigt, dass sie zwei "sushi-like"-Domänen D1 (Glutaminsäure 1 bis Serin 63) und D2 (Glycin 102 bis Glycin 165) besitzt. Die räumlich wie ein Ober- und Unterarm anmutenden CD25-Bestandteile sind in einem Winkel von 70-90 ° zueinander angewinkelt (Siehe Abb. 29). Die Domänen bestehen jeweils aus fünf beta-Faltblättern. Der D1-Domäne kommt dabei die Aufgabe der IL-2-Bindung zu, bei der sie sich mit ca. 82 % der Interaktions-Bindungsfläche beteiligt. Beide Domänen werden durch ein 42 Aminosäuren langes Linker-Peptid verbunden (Threonin 65 bis Histidin 103). Die Verbindung zum Zytoplasma bildet ein weiteres 54 Aminosäuren langes Polypeptid (Glycin 165 bis Glutaminsäure 217). Dieses ist mit der D2-Domäne verbunden. Interessanterweise zeigen kristallographische Röntgenstrukturanalysen des humanen CD25 mit IL-2 (Rickert, Wang et al. 2005) oder des heterotrimeren IL-2-Rezeptorkomplexes mit IL-2 (Wang, Rickert et al. 2005; Stauber, Debler et al. 2006), dass sich in den beiden als Ober- und Unterarm anmutenden CD25-Bestandteilen jeweils beide Sushi-like Domänen D1 (Abb. 2, grün) und D2 (Abb. 2, cyan) beteiligen.



**Abb. 2 CD25 Domänentopologie** Das Schema zeigt die 2D-Struktur des humanen CD25 durch Anlehnung an die kristallographisch identifizierten Strukturmerkmale. Die Arginine sind unter anderem als rote und blaue "R" hervorgehoben. Siehe dazu auch die Kristallstruktur in Abb. 29 (Rickert, Wang et al. 2005).

CD25 findet zusätzlich als induzierbares Oberflächenprotein bei Aktivierungs-Assays von T-Zellen durch den T-Zell-Rezeptor oder über polyklonale Stimulantien wie Concanavalin A (Con A), Phytohemagglutinin (PHA) oder "Pokeweed-Mitogen" (PWM) (Letwin and Quimby 1987) eine wichtige Rolle in der Medizin. Es werden ebenfalls Antikörper gegen die Rezeptoruntereinheit eingesetzt (Depper, Leonard et al. 1983), welche die durch IL-2 ausgelöste Vermehrung von T-Zellen bei Transplantatabstoßung blockieren sollen (Waldmann and O'Shea 1998; Nashan 2005).

#### 2.2.2 Signaltransduktionskaskade des IL-2-Rezeptors

Die Signaltransduktion des Interleukin-2-Rezeptors beruht auf der Bildung des quaternären Komplexes aus IL-2 und den drei Rezeptoruntereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Wie oben beschrieben sind die Untereinheiten  $\beta$  und  $\gamma$  entscheidend für die Signaltransduktionskaskade (Nakamura, Russell et al. 1994). Der zytoplasmatische Teil dieser beiden Ketten leitet das Signal, welches von außen auf die Zelle wirkt, nach innen weiter. Die  $\beta$ -Kette tritt durch die Dimerisierung mit der  $\gamma$ -Kette in Interaktion mit den Januskinasen 1 und 3 (JAK1 und JAK3) (Zhu, Berry et al. 1998). Diese räumliche Nähe führt zur gegenseitigen Phosphorylierung der beiden Kinasen an ihren Tyrosinresten in den aktiven Zentren, was ihre Kinaseaktivität erheblich steigert (Liu, Gaffen et al. 1997). Die nun aktivierten Kinasen phosphorylieren die Tyrosinreste an der  $\beta$ -Kette, was die Bindung weiterer Komponenten der Signaltransduktionskaskade begünstigt.

Die gebundenen Komponenten werden ihrerseits durch die Nachbarschaft zu den Januskinasen selber phosphoryliert und tragen somit das Signal weiter. Man unterscheidet dabei, wie in Abb. 3 vereinfacht dargestellt ist, drei Wege: Links den "Phosphatidylinositol-3-Kinasen" (PI3K) Weg, in der Mitte den "Signal Transducer and Activator of Transcription 5" (STAT5) Weg und rechts den "Mitogen-Activated Protein Kinase" (MAPK) Weg (Gaffen 2001).

Der STAT5-Weg wurde in dieser Arbeit für die Überprüfung der Aktivierung des Interleukin-2-Rezeptors herangezogen. Dabei lagert sich STAT5 an einen der phosphorylierten Tyrosinreste der  $\beta$ -Kette an und gerät somit in Nachbarschaft zu der aktivierten Januskinase. Diese Kinase phosphoryliert STAT5, welches durch die eigene "src-homology 2" (SH2) Domäne mit einem ebenfalls phosphorylierten STAT5 Homodimere bilden kann. Diese Dimere wandern in den Nukleus, wo sie als Transkriptionsfaktoren auf die Genregulierung Einfluss nehmen (Liu, Gaffen et al. 1998). Ein am Tyrosinrest 694 phosphoryliertes STAT5 indiziert somit die Aktivierung des IL-2-Rezptors (siehe dazu Kapitel 5.1.3).

Der PI3-Kinasen-Weg hat über die Aktivierung der Akt-Kinase (auch als Protein Kinase B bekannt) Einfluss auf den Transkriptionsfaktor E2F. Dieser Faktor ist wichtig für den Zellzyklus. Ein weiterer Einfluss von PI3K führt über die Aktivierung der p70<sup>S6</sup>-Kinase zu einer Phosphorylierung der 40S-Ribosomenuntereinheit. Dieses hat wiederum Einfluss auf die Proteinbiosynthese und somit auf den Zellzyklus.

Der MAP-Kinase Weg ist in Abb. 3 rechts dargestellt. Er involviert die Bindung verschiedener Adaptorproteine wie Shc, oder Grb2 an den phosphorylierten Tyrosinresten der  $\beta$ -Kette. Dabei bindet Grb2 das Effektorprotein "Ras-guanine exchange factor" SOS, was dazu führt, dass das energiearme GDP bei Ras durch dessen energiereiche Gegenstück GTP ausgetauscht wird. Ras phosphoryliert darauf hin die Kinase Raf1, welche weitere Kinase-Ketten aktiviert. Letztendlich führt dies dazu, dass verschiedene Transkriptionsfaktoren wie Aidos phosphoryliert werden und somit auf die Genexpression Einfluss genommen wird.



Abb. 3 Signaltransduktionskaskade IL-2R Die Abbildung die des zeigt Signaltransduktionskaskade des Interleukin-2-Rezeptors nach Aktivierung durch IL-2. Die Abbildung wurde mit Hilfe von der "Pathway Tools" von Genecarta.com erstellt (http://www.biocarta.com/pathfiles/h il2Pathway.asp).

### 2.2.3 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen

Die alpha-Untereinheit des IL-2-Rezeptors (CD25) wird konstitutiv zusammen mit den beiden anderen Untereinheiten auf CD4<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (Tregs) exprimiert. Diese Lymphozytenuntergruppe ist aktiv an der Tolerierung von körpereigenen Antigenen beteiligt. Eine CD25 "knock out"-Maus zeigt massive Vergrößerung peripherer lymphatischer Organe wie Milz und Lymphknoten mit polyklonaler B- und T-Zell-Vermehrung. Dies resultiert unter anderem in autoimmun entzündlichen Darmerkrankungen und einer hämolytischen Anämie (Horak, Lohler et al. 1995; Willerford, Chen et al. 1995). Die Funktion von Tregs ist dementsprechend der Einfluss auf das Entstehen von Autoimmunkrankheiten (Sakaguchi 2005) und die Beeinflussung der Tumorimmunität (Nomura and Sakaguchi 2005). Dabei wird die Rolle von IL-2 für diese Zellen in letzter Zeit kontrovers diskutiert. Es scheint, als ob sich diese Zellen, gekennzeichnet durch den Transkriptionsfaktor Foxp3 (Hori, Nomura et al. 2003), ohne CD25 entwickeln können und ihre immunmodulierende Funktion beibehalten. Sie sind dabei jedoch stark in ihrer Anzahl vermindert (Fontenot, Rasmussen et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Tregs eine besondere Sensitivität zu der in Kap. 2.1.5 erwähnten NICD haben. Der Effekt wird durch die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen ermöglicht und involviert den Purinorezeptor P2X7 (Aswad, Kawamura et al. 2005).

# 3. Zielsetzung

Ein Ziel der Dissertationsarbeit war die Identifizierung von prominenten ART2-Zielproteinen auf der Lymphomzelllinie YAC-1 mittels massenspektrometrischer Analyse sowie ggf. deren Bestätigung mittels radioaktiver Nachweismethode.

Die sich daraus ergebene zentrale Fragestellung der Dissertationsarbeit war die Charakterisierung der ADP-Ribosylierung von CD25 durch ART2. Untersucht werden sollte die ADP-Ribosylierung von humanem und murinem CD25 auf humanen und murinen Lymphomzelllinien sowie auf primären murinen T Zellen. Mittels zielgerichteter Mutagenese sollte versucht werden, die durch die ART2 modifizierten Argininreste in CD25 zu bestimmen. Schließlich sollte eine mögliche Beeinflussung der ADP-Ribosylierung auf die Signaltransduktion des IL-2-Rezeptors in IL-2-abhängigen Zelllinien erfasst werden.

# 4. Materialien

## 4.1 Laborgeräte

Biometra T3 PCR-Maschine	Whatman Biometra, Göttingen
Edas 290 + Kamera DC290	Kodak Company, Connecticut (USA)
Entwicklungsmaschine Fuji FPM 100A	Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Fujix BAS2000 Phosphoimager	Fuji Film, Tokyo (Japan)
High Voltage Power Pack P30	Biometra, Göttingen
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech, Wien (Österreich)
Ultrazentrifuge, SW40-Rotor	Beckman-Coulter, Krefeld
XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen, Groningen (Niederlande)

## 4.2 Verbrauchsmaterialien

FACS Röhrchen 5 ml roundbottom	Falcon / Becton Dickinson, Heidelberg
Hyperfilm ECL	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
Kodak Biomax MR Röntgenfilm	Kodak Company, Connecticut (USA)
Kulturplatten	Nunc, Roskilde (Dänemark)
Nitex Membran (80 µm Maschenweite)	Cadish Precision Meshes Ltd., London (GB)
Nitrozellulose-Hybond-C	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
NuPAGE precast Gele	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
Polyvinyldendifluorid-ImmobilonP	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
(PVDF)	
Sterilfiltrationsapparaturen Steriflip,	Millipore, Billerica (USA)
Stericup	
Untersuchungshandschuhe Peha-Soft	Hartmann, Heidenheim

## 4.3 Mausstamm

P2X7 KO C57BL/6J	Christopher	Gabe	l, Pfize	r Inc.,	Grot	on,
	Conneticut	(USA)	(Labasi,	Petrushov	'a et	al.
	2002)					

## 4.4 Zelllinien

YAC-1	Lymphomzelllinie aus der A/Sn Maus (ATCC
	Nummer: TIB-160)
HEK-T	Humane Embryonale Nierenzelllinie

CTLL-2	Zytotoxische T-Lymphozyten Zelllinie aus der
	C57BL/6 Maus (ATCC Nummer: TIB-214)
Kit 225	Humane T-Zelllinie von einem Patienten mit
	Chronisch Lymphatischer Leukämie

## 4.5 Bakterienstamm

Zur Transformation von Ligationsansätzen und Retransformation wurden ultrakompetente XL-10 Gold Zellen von Stratagene, Amsterdam (Niederlande) benutzt.

## 4.6 Antikörper

Maus  $\alpha$  etheno Adenosin IgG2 $\alpha$  Alexa488 Inst. f. Immunologie, Hamburg Maus  $\alpha$  etheno Adenosin IgG2 $\alpha$ Inst. f. Immunologie, Hamburg Pharmingen, Heidelber Ratte α Maus CD4 IgG2α FITC, RM45 Ratte a Maus ART2.1/2.2 Alexa488, Ali Inst. f. Immunologie, Hamburg Ratte aMaus ART2.2 IgG2a PE, NIKA Inst. f. Immunologie, Hamburg Ratte αHuman ART1 Ig2β Alexa488, A3 Inst. f. Immunologie, Hamburg Ratte α Maus CD25 IgG2β PE, 3C7 Pharmingen, Heidelberg Rette α Maus CD25 IgG1 APC, pc61 Becton Dickinson, Heidelberg Ratte α Muas CD25 IgG1, pc61 Pharmigen, Heidelberg Pharmingen, Heidelberg Maus α Human CD25 IgG1K APC, M-A251 Ratte a Maus CD25 IgM FITC, 7D4 Pharmigen, Hamburg Ratte α Maus CD229.1 IgG2aK FITC, 30CO7 Pharmigen, Hamburg Kaninchen α Maus P2X7 RH23 A44 FITC, polyklonal Inst. f. Immunologie, Hamburg Kaninchen α Maus P2X7 / K1G, polyklonal Inst. f. Immunologie, Hamburg Pharmigen, Heidelberg Maus  $\alpha$  Human Phospho-Stat5 (Y694) IgG1 Alexa647, 47 Maus α Human CD4 IgG1 FITC, SK3 Becton Dickinson, Heidelberg Ente αRatte IgG (H+L) F(ab')2 PE Dianova, Hamburg

## 4.7 Chemikalien

ADPR	Sigma-Aldrich, München
BSA	New England Biolabs, Schwalbach
<sup>32</sup> P-NAD, 1000 Ci/mmol	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
Carbenicillin	Serva, Heidelberg
Coloidal Blue Staining Kit	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
DNA Ladepuffer	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
DNA Typing Grade Agarose	GibcoBRL, Karlsruhe
ECL Western blotting detection reagent	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

GeneRuler 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
G418	Gibco BRL, Eggenstein
Loading Dye 10 x	<ul><li>50% Glycerol OMNI Lifescience, Bremen</li><li>50% 20x TAE Gibco BRL, Eggenstein</li><li>1 Sptl.sp. Orange G Merck, Darmstadt</li></ul>
MultiMark	Invitrogen-Novex, Leek (Niederlande)
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
NuPAGE LDS sample buffer	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
NuPAGE sample reducing agent	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
NuPAGE SDS-PAGE MES running buffer	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
NuPAGE SDS-PAGE MOPS running buffer	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
NuPAGE SDS-PAGE transfer buffer	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
Propidiumjodid	Pharmingen, Hamburg
20 x TAE-Puffer	Gibco BRL, Eggenstein

## 4.8 Enzyme

AmpliTaq GOLD DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Forster City (USA)
SuperScript® II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
PFU-Turbo DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)
T4-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
Not I (20.000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Eco</i> RI (20.000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt

Für die Einzelverdaus wurden die Enzyme mit den mitgelieferten Puffern eingesetzt. Doppelverdaus wurden entsprechend der Empfehlungen von New England Biolabs durchgeführt. Falls es erforderlich war, wurde gereinigtes bovines Serumalbumin in der Konzentration 100  $\mu$ g/ml zugesetzt.

## 4.9 Primer

Primer für die Klonierung und Mutageneseprimer wurden mit den Programmen von DNA-Star, Madison (USA) entworfen und bei MWG, Ebersberg bestellt.

Tab. 1Auflistung der verwendeten KlonierungsprimerDas Restriktionsenzym steht amAnfang des Namens (EcoR1 = Eco RI, Not = Not I), gefolgt von der Spezies des CD25 (m = Maus, h =Mensch). Am Ende des Namens findet man die Orientierung des Primers (F = Vorwärts, R =Rückwärts). Die Restriktionsenzymschnittsequenz ist hervorgehoben.

Name	Nukleotidsequenz
EcoR1_hCD25F	GTC <b>GAATTC</b> ATGGATTCATACCTGCTGA
Not_hCD25R	TGTTCTT <b>GCGGCCGC</b> CTAGATTGTTCTTCTACTCTTCC

Eco\_mCD25F TGCCGAATTCATGGAGCCACGCTTGCTG

Not mCD25R TCTGACTTTT**GCGGCCGC**CTAGATGGTTCTTCTGCTCTTCCTC

Tab. 2Primer für elF2a (eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha)DasRestriktionsenzym steht am Anfang des Namens (Hind = Hind III), gefolgt von der Spezies des elF2a(h = Mensch). Am Ende des Namens findet man die Orientierung des Primers (F = Vorwärts, R =Rückwärts).

Name	Nukleotidsequenz
h eIF2a -F	CAAGAGACCTGGATATGGTGCC
Hind h eIF2a -R	TTCAAGCTTATCTTCAGCTTTGGCTTCCATTTC

 Tab. 3
 Auflistung der verwendeten Mutageneseprimer. Der Anfangsbuchstabe repräsentiert die Spezies (m = Maus, h = Mensch). Er ist gefolgt von der Arginin zu Lysin Mutationstelle und der Orienteirung des Primers (F = Vorwärts, R = Rückwärts). Hervorgehoben ist jeweils das veränderte Triplett.

 Name
 Nutlestidessurge

Name	Nukleotidsequenz
mR32,35,36K_F	CTAAACTGTGAATGCAAG <b>AAA</b> GGTTTCAAAAAACTAAAG
mR32,35,36K_R	CTTTAGTTTTTTGAAACC <b>TTT</b> CTTGCATTCACAGTTTAG
mR35,36K_F	GCAAGAGAGGTTTC <b>AAA</b> AAACTAAAGGAATTGG
mR35,36K_R	CCAATTCCTTTAGTTT <b>TTT</b> GAAACCTCTCTTGC
mR32K_F	CTAAACTGTGAATGCAAG <b>AAA</b> GGTTTCCGAAGACTAAAG
mR32K_R	CTTTAGTCTTCGGAAACC <b>TTT</b> CTTGCATTCACAGTTTAG
mR35K_F	CAAGAGAGGTTTC <b>AAA</b> AGACTAAAGGAATTG
mR35K_R	CAATTCCTTTAGTCT <b>TTT</b> GAAACCTCTCTTG
mR36K_F	CAAGAGAGGTTTCCGA <b>AAA</b> CTAAAGGAATTGGTC
mR36K_R	GACCAATTCCTTTAG <b>TTT</b> TCGGAAACCTCTCTTG
mR101K_F	CTTACAGGTCACTGC <b>AAG</b> GAGCCACCTCCTTGG
mR101K_R	CCAAGGAGGTGGCTC <b>CTT</b> GCAGTGACCTGTAAG
mR113K_F	CATGAAGATTCCAAG <b>AAA</b> ATCTATCATTTCG
mR113K_R	CGAAATGATAGAT <b>TT</b> CTTGGAATCTTCATG
mR136K_F	GATACAAGGCTCTACAG <b>AAA</b> GGTCCTGCTATTAGC
mR136K_R	GCTAATAGCAGGACC <b>TTT</b> CTGTAGAGCCTTGTATC
mR44K_F	GGAATTGGTCTATATG <b>AAA</b> TGCTTAGGAAACTCC
mR44K_R	GGAGTTTCCTAAGCA <b>TTT</b> CATATAGACCAATTCC
mR65K_F	CTCCCATGACAAATCG <b>AAA</b> AAGCAAGTTACAGCTC
mR65K_R	GAGCTGTAACTTGCTT <b>TTT</b> CGATTTGTCATGGGAG
mR163K_F	CACATGTGTAGATGAA <b>AAA</b> GAACACCACCGATTTC
mR163K_R	GAAATCGGTGGTGTTC <b>TTT</b> TTCATCTACACATGTG
mR167K_F	GAAAGAGAACACCAC <b>AAA</b> TTTCTGGCTAGTGAGG
mR167K_R	CCTCACTAGCCAGAAA <b>TTT</b> GTGGTGTTCTCTTTC
mR178K_F	GGAATCTCAAGGAAGC <b>AAA</b> AATTCTTCTCCCGAG
mR178K_R	CTCGGGAGAAGAATT <b>TTT</b> GCTTCCTTGAGATTCC
hR35,36K_F	GCAAGAGAGGTTTC <b>AAAAAA</b> ATAAAAAGCGGGTCAC

hR32K_FCTGTGAATGCAAGAAAGGTTTCCGCAGAATAAAAAGChR32K_RGCTTTTTATTCTGCGGAAACCTTTCTTGCATTCACAGhR35K_FCAAGAGAGGTTTCAAAAGAATAAAAAGCGGGhR35K_RCCCGCTTTTTATTCTTTGAAACCTCTCTTGhR36K_FGAGAGGTTTCCGCAAAAATAAAAAGCGGGGTCAChR36K_RGTGACCCGCTTTTTATTTTGCGGAAACCTCTCmR105K_FCTTCCAGGTCACTGCAAGGAACCTCCACCATGGmR105K_RCCATGGTGGAGGTTCCTTGCAGTGACCTGGAAGhR117K_FGAAGCCACAGAGAAAATTTATCATTTCGTGhR117K_RCACGAAATGATAAATTTTCTCTGTGGCTTChR140K_FCAGGGCTCTACACAAAGGTCCTGCTGAGAGCGhR185K_FCAAGCCCCGAAGGCAAACCTGAGAGAGACTTC	hR35,36K_R	GTGACCCGCTTTTTAT <b>TTTTTT</b> GAAACCTCTCTTGC
hR32K_RGCTTTTTATTCTGCGGAAACCTTTCTTGCATTCACAGhR35K_FCAAGAGAGGTTTCAAAAGAATAAAAAGCGGGhR35K_RCCCGCTTTTTATTCTTTGAAACCTCTCTTGhR36K_FGAGAGGTTTCCGCAAAAATAAAAAGCGGGGTCAChR36K_RGTGACCCGCTTTTTATTTTGCGGAAACCTCTCmR105K_FCTTCCAGGTCACTGCAAGGAACCTCCACCATGGmR105K_RCCATGGTGGAGGTTCCTTGCAGTGACCTGGAAGhR117K_FGAAGCCACAGAGAAAATTTATCATTCGTGhR117K_RCACGAAATGATAAATTTTCTCTGTGGCTTChR140K_FCAGGGCTCTACACAAAGGTCCTGCTGAGAGCGhR140K_RCGCTCTCAGCAGGACCTTTGTGTAGAGCCCTGhR185K_FCAAGCCCCGAAGGCAAACCTGAGAGTGAGACTTC	hR32K_F	CTGTGAATGCAAG <b>AAA</b> GGTTTCCGCAGAATAAAAAGC
hR35K_FCAAGAGAGGTTTCAAAAGAATAAAAGCGGGhR35K_RCCCGCTTTTTATTCTTTGAAACCTCTCTTGhR36K_FGAGAGGTTTCCGCAAAATAAAAAGCGGGTCAChR36K_RGTGACCCGCTTTTTATTTTGCGGAAACCTCTCmR105K_FCTTCCAGGTCACTGCAAGGAACCTCCACCATGGmR105K_RCCATGGTGGAGGTTCCTTGCAGTGACCTGGAAGhR117K_FGAAGCCACAGAGAAAATTTATCATTTCGTGhR140K_FCACGAAATGATAAATTTTCTCTGTGGAGAGCGhR140K_RCGCTCTCAGCAGGACCTTGAGAGCCCTGhR185K_FCAAGCCCCGAAGGCAAACCTGAGAGTGAGACTTC	hR32K_R	GCTTTTTATTCTGCGGAAACC <b>TTT</b> CTTGCATTCACAG
hR35K_RCCCGCTTTTTATTCTTTGAAACCTCTCTTGhR36K_FGAGAGGTTTCCGCAAAATAAAAAGCGGGGTCAChR36K_RGTGACCCGCTTTTTATTTGCGGAAACCTCTCmR105K_FCTTCCAGGTCACTGCAAGGAACCTCCACCATGGmR105K_RCCATGGTGGAGGTTCCTTGCAGTGACCTGGAAGhR117K_FGAAGCCACAGAGAGAAATTTATCATTTCGTGhR117K_RCACGAAATGATAAATTTCTCTGTGGCTTChR140K_FCGCTCTCAGCAGGAGCCTTGTGTGAGAGCCGhR185K_FCAAGCCCCGAAGGCAAACCTGAGAGTGAGACTTC	hR35K_F	CAAGAGAGGTTTC <b>AAA</b> AGAATAAAAAGCGGG
hR36K_FGAGAGGTTTCCGCAAAATAAAAAGCGGGTCAChR36K_RGTGACCCGCTTTTTATTTGCGGAAACCTCTCmR105K_FCTTCCAGGTCACTGCAAGGAACCTCCACCATGGmR105K_RCCATGGTGGAGGTTCCTTGCAGTGACCTGGAAGhR117K_FGAAGCCACAGAGAAAATTTATCATTTCGTGhR117K_RCACGAAATGATAAATTTCTCTGTGGCTTChR140K_FCAGGGCTCTACACAAAGGTCCTGCAGAGAGCGhR185K_FCAAGCCCCGAAGGCAAACCTGAGAGTGAGACTTC	hR35K_R	CCCGCTTTTTATTCT <b>TT</b> GAAACCTCTCTTG
hR36K_RGTGACCCGCTTTTTATTTGCGGAAACCTCTCmR105K_FCTTCCAGGTCACTGCAAGGAACCTCCACCATGGmR105K_RCCATGGTGGAGGTTCCTTGCAGTGACCTGGAAGhR117K_FGAAGCCACAGAGAAAATTTATCATTTCGTGhR117K_RCACGAAATGATAAATTTTCTCTGTGGCTTChR140K_FCAGGGCTCTACACAAAGGTCCTGCTGAGAGCGhR140K_RCGCTCTCAGCAGGACCTTTGTGTAGAGCCCTGhR185K_FCAAGCCCCGAAGGCAAACCTGAGAGTGAGACTTC	hR36K_F	GAGAGGTTTCCGC <b>AAA</b> ATAAAAAGCGGGTCAC
mR105K_FCTTCCAGGTCACTGCAAGGAACCTCCACCATGGmR105K_RCCATGGTGGAGGTTCCTTGCAGTGACCTGGAAGhR117K_FGAAGCCACAGAGAAAATTTATCATTTCGTGhR117K_RCACGAAATGATAAATTTTCTCTGTGGCTTChR140K_FCAGGGCTCTACACAAAGGTCCTGCTGAGAGCGGhR140K_RCGCTCTCAGCAGGACCTTTGTGTAGAGCCCTGhR185K_FCAAGCCCCGAAGGCAAACCTGAGAGTGAGACTTC	hR36K_R	GTGACCCGCTTTTTAT <b>TT</b> GCGGAAACCTCTC
mR105K_RCCATGGTGGAGGTTCCTTGCAGTGACCTGGAAGhR117K_FGAAGCCACAGAGAAAATTTATCATTTCGTGhR117K_RCACGAAATGATAAATTTTCTCTGTGGCTTChR140K_FCAGGGCTCTACACAAAGGTCCTGCTGAGAGCGGhR140K_RCGCTCTCAGCAGGACCTTTGTGTAGAGCCCTGhR185K_FCAAGCCCCGAAGGCAAACCTGAGAGTGAGACTTC	mR105K_F	CTTCCAGGTCACTGC <b>AAG</b> GAACCTCCACCATGG
hR117K_FGAAGCCACAGAGAGAAAATTTATCATTTCGTGhR117K_RCACGAAATGATAAATTTTCTCTGTGGCTTChR140K_FCAGGGCTCTACACAAAGGTCCTGCTGAGAGCGhR140K_RCGCTCTCAGCAGGACCTTTGTGTAGAGCCCTGhR185K_FCAAGCCCCGAAGGCAAACCTGAGAGTGAGACTTC	mR105K_R	CCATGGTGGAGGTTC <b>CTT</b> GCAGTGACCTGGAAG
hR117K_RCACGAAATGATAAATTTTCTCTGTGGCTTChR140K_FCAGGGCTCTACACAAAGGTCCTGCTGAGAGCGhR140K_RCGCTCTCAGCAGGACCTTTGTGTAGAGCCCTGhR185K_FCAAGCCCCGAAGGCAAACCTGAGAGTGAGACTTC	hR117K_F	GAAGCCACAGAG <b>AAA</b> ATTTATCATTTCGTG
hR140K_FCAGGGCTCTACACAAAGGTCCTGCTGAGAGCGhR140K_RCGCTCTCAGCAGGACCTTTGTGTAGAGCCCTGhR185K_FCAAGCCCCGAAGGCAAACCTGAGAGTGAGACTTC	hR117K_R	CACGAAATGATAAAT <b>TTT</b> CTCTGTGGCTTC
hR140K_R CGCTCTCAGCAGGACC <b>TTT</b> GTGTAGAGCCCTG hR185K_F CAAGCCCCGAAGGC <b>AAA</b> CCTGAGAGTGAGACTTC	hR140K_F	CAGGGCTCTACAC <b>AAA</b> GGTCCTGCTGAGAGCG
hR185K_F CAAGCCCCGAAGGC <b>AAA</b> CCTGAGAGTGAGACTTC	hR140K_R	CGCTCTCAGCAGGACC <b>TTT</b> GTGTAGAGCCCTG
	hR185K_F	CAAGCCCCGAAGGC <b>AAA</b> CCTGAGAGTGAGACTTC
hR185K_R GAAGTCTCACTCTCAGG <b>TTT</b> GCCTTCGGGGGCTTG	hR185K R	GAAGTCTCACTCTCAGG <b>TTT</b> GCCTTCGGGGGCTTG

## 4.10 Plasmide

pcDNA6/V5-His ABC 5,1 kb	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
pCMV SPORT6 4,4 kb	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
pME	DNAX Research Institute, Palo Alto (USA)

## 4.11 Medien und Lösungen

## 4.11.1 Zellkulturmedien

1 x Dulbecco's PBS	$2,67 \ mM  KCl,  1,47 \ mM  KH_2PO_4,  137,93 \ mM$
	NaCl, 8,06 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4, Invitrogen,
	Groningen (Niederlande)
Blasticidin S	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
DMEM-komplett	DMEM mit 10 % FKS, 1 mM, Natriumpyruvat,
	2 mM L-Glutamin, 1 x, nicht-essenziellen
	Aminosäuren, 1 x Gentamicin und 10 mM
	HEPES-Puffer
Dulbecco's modified Eagle medium	GibcoBRL, Karlsruhe
(DMEM)	
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Gentamicin 50 mg/ml	Gibco BRL, Karlsruhe
HEPES-Puffer, 1 M	Gibco BRL, Karlsruhe
jetPEI Transfektionsreagenz	Polyplus, New York (USA)
L-Glutamin, 200 mM	Gibco BRL, Karlsruhe

Natriumpyruvat, 100 mM	Gibco BRL, Karlsruhe
Nicht-essenzielle Aminosäuren, 100x	Gibco BRL, Karlsruhe
RPMI-Medium	RPMI-1640, Gibco BRL, Karlsruhe
RPMI-Medium, komplett	RPMI-Medium mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin
	und 1 mM Natriumpyruvat
Tetracyclin-freies DMEM-komplett	DMEM mit 10 % Tetracyclin-freiem FKS, 1 mM,
	Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 1 x nicht-
	essenziellen Aminosäuren und 10 mM HEPES-
	Puffer.
TrypLE (Trypsin-like enzyme)	Gibco BRL, Karlsruhe

## 4.11.2 Bakterienkulturmedien

LB-Agar (Formulierung nach Miller)		iller)	Difco/ Becton Dickinson, Heidelberg
LB-Medium	(Formulierung	nach	1 % Trypton, 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt,
Miller)			Invitrogen, Groningen (Niederlande)
MDG-Agar			1 % Agar-Agar in MDG-Medium, Glukose und
			Aspartat wurden nach dem Autoklavieren
SOC-Medium			zugesetzt.
			2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 8,6 mM NaCl,
			2,5 mM KCl, 20 mM MgSO4, 20 mM Glukose,
			Gibco BRL, Karlsruhe

## 4.11.3 Puffer für Zelllysen

Lysispuffer	1 % TritonX100, 1 mM AEBSF, 1 mM ADP-
	Ribose, 100 µM NAD, 2 mM EDTA in PBS

## 4.11.4 Gey-Lösung zur Erythrozytenlyse

Lösung	Bestandteil	Menge
<b>A:</b>	NH <sub>4</sub> Cl	35 g
	KCl	1,85 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,5 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,119 g
	Glukose	5 g
	Phenolrot	0,05 g
	dH <sub>2</sub> O	auf 1 L
<b>B:</b>	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,42 g
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,14 g
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,34 g

	dH <sub>2</sub> O	auf 100 ml
C:	NaHCO <sub>3</sub>	2,25 g
	dH <sub>2</sub> O	auf 100 ml
D:	dH <sub>2</sub> O	

## 4.11.5 SDS-PAGE und Westernblot

Antikörperpuffer	0,05 % Tween-20, 5 % Milchpulver in TBS
Blockpulver	5 % Milchpulver in TBS
Blotpuffer	10 % Methanol, 0,1 % Antioxidans, 1 x
	Transferpuffer
MES-Puffer	50 mM 2-(N-morpholino)-ethansulfonsäure
	(MES), 50 mM TRIS-Base, 3,5 mM SDS, 1 mM
	EDTA, pH 7,7
MOPS-Laufpuffer	1 M 3-(N-morpholino)-propansulfon-säure
	(MOPS), 1 M TRIS-Base, 69,3 mM
	Natriumdodecylsulfat (SDS), 20,5 mM EDTA
Silberlösung	20 % Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Lösung gemischt mit 9 ml H <sub>2</sub> O,
	500 µl 40 % Na-Citrat und 100 µl 20 % AgNO3
Tansferpuffer (20x)	0,5 M Bicin, 0,5 M BIS-TRIS, 20,5 mM EDTA,
	1mM Chlorobutanol
TBS	0,025 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl
Waschpuffer	0,05 % Tween-20 in TBS

# 4.12 Reagenzsysteme (Kits)

Gelextraktion	QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden
Antikörper-	AminoLink Plus Immobilization Kit, Pierce
Immunpräzipitationsmatrix	Biotechnology, Rockford (USA)
Endofree Plasmid-Präparation	QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden
PCR-Aufreinigung	QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden
RNA Präparation	RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden
Separation von CD4 <sup>+</sup> Zellen	Mouse CD4 Cell Negative Isolation Kit, Dynal,
	Karlsruhe
Sequenzierreaktionen	BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied
	Biosystems, Foster City (USA)

# 5. Methoden

## 5.1 Immunologische Methoden

### 5.1.1 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Durch die Methode der Durchflusszytometrie ist es möglich, mikroskopisch kleine Partikel wie Zellen nach ihrer Größe, Struktur und den Oberflächeneigenschaften zu charakterisieren. Die Geräte, die dafür nötig sind, nehmen die Lösung in der die Zellen sich befinden auf und bringen sie durch eine Trägerflüssigkeit in einen laminaren Strom. In diesem Strom liegen die Zellen einzeln hintereinander. Der Probenstrom fließt durch eine Messküvette, in welcher die Zellen einzeln einen Laser treffen. Dieser wird durch die Eigenschaften der Zelle abgelenkt, was anschließend gemessen wird. So wird die Messung der Vorwärtsstreuung als Forwardscatter (FSC) bezeichnet und gibt Auskunft über die Größe der Zelle. Das im Winkel von 90° zur Seite abgelenkte Licht wird durch den Sidescatter (SSC) gemessen. Bei einer sehr heterogenen Zelloberfläche nimmt dieser Wert zu und gibt damit Auskunft über die Granularität einer Zelle. Des Weiteren macht man sich das Markieren von Zellen mit Fluorochromen zu nutze. Diese Stoffe absorbieren das monochrome Laserlicht und emittieren es in einem anderen Wellenlängenbereich. Diese Emission ist spezifisch für einzelne Fluorochrome und ermöglicht es ihnen an Antikörpern gekoppelt verschiedene Oberflächenstrukturen einer Zelle gleichzeitig zu charakterisieren. Es wurden in dieser Arbeit die Fluorochrome Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Alexa 488 (gAlexa), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Alexa Fluor 647 und Propidiumjodid (PI) verwendet.

Die Anfärbung der jeweiligen Zellsuspensionen erfolgte durch die Zugabe von üblicherweise 1  $\mu$ g Fluorochrom-gekoppelter Antikörper zu 1 x 10<sup>6</sup> Zellen. Die Zellen wurden anschließend für 30 Minuten bei 4°C gelagert, um durch einen niedrigen Zellstoffwechsel zusätzliche Interaktionen mit den Antikörpern zu verringern. Vor dem Messen wurden 10  $\mu$ g/ml Propidiumjodid zugegeben. Dieser DNA-bindende Farbstoff tritt in apoptotischen Zellen ein und erlaub es, diese während der Messung auszuschließen.

Eine andere Möglichkeit der Zellanfärbung besteht durch die vorherige Permeabilisierung. Diese erlaubt es intrazelluläre Strukturen anzufärben. In dieser Arbeit wurde somit der phosphorylierte Transkriptionsfaktor "signal transducer and activator of transcription 5" (STAT5) detektiert (siehe dazu Kapitel 5.1.3).

Es wurde für die Messungen und die anschließenden Auswertungen das FACSCalibur mit der CellQuest Software von Becton, Dickinson and Company, Heidelberg verwendet.

#### 5.1.2 Messung der ART2.2-Aktivität

Die ADP-Ribosylierung von Zielproteinen, welche im Kapitel 2.1.4 erläutert wurde, lässt sich auf verschiedene Arten nachweisen. Ein Beispiel ist das mit dem Radioisotop <sup>32</sup>P markierte NAD (<sup>32</sup>P-NAD), welches nach einem Westernblot der markierten Proteine mit

anschließender Autoradiographie sichtbar gemacht werden kann. Die radioaktiv markierten Banden entsprechen den ADP-ribosylierten Proteinen. Ein anderes Beispiel ist das NAD-Analogon etheno-NAD (eNAD, siehe Abb. 4). Die etheno-Adenosin-Gruppe kann nach ART2-vermittelter Übertragung auf ein Protein in Form von etheno-ADP-Ribose durch den monoklonalen Maus-Antikörper 1G4 gebunden und somit detektiert werden. Dieser Antikörper wurde ursprünglich für den intrazellulären Nachweis von DNA-Addukten (1-N6-Ethenoadenosin) nach Vinylchlorid Exposition entwickelt (Young and Santella 1988). Er wird als Hybridomaüberstand in einem Verhältnis von 1:5000 in dem Westernblot eingesetzt. Seine Detektion erfolgt mittels eines Sekundär-Antikörpers, welcher an Peroxidase gekoppelt ist.

Eine andere Möglichkeit des Nachweises einer ART2-Aktivität ist die Durchflusszytometrie. Dabei werden ART2-exprimierende Zellen mit dem Substrat eNAD inkubiert und anschließend mit dem Fluorochrom-gekoppelten 1G4 mAb angefärbt. Dieser bindet an alle ADP-ribosylierten Proteine mit einem etheno-Adenosin-Rest, was zu einer Intensitätszunahme im Emissionsspektrum des Fluorochroms führt (siehe Abb. 7). Durch die Anfärbung der gleichen Zellgruppe ohne vorherige eNAD-Inkubation lassen sich unspezifische Bindungen des Antikörpers an den Zellen subtrahieren.

Ein neuer, jedoch in dieser Arbeit nicht verwendeter Weg die ADP-Ribosylierung von Proteinen zu detektieren, sind gegen ADP-ribosylierte-Argininreste gerichtete polyklonale Antikörper (Osago, Terashima et al. 2008). Durch das Fehlen der Ethenogruppe am NAD könnten mögliche Interaktionen dieser Zusatzgruppe vermieden werden.



Abb. 4 Modell der ADP-Ribosylierung und ihrer Detektion mittels etheno-NAD oder radioaktiver Markierung. Die Abbildung zeigt die, über einen GPI-Anker membrangebundene mono-ADP-Ribosyltransferase (ART), welche mit Hilfe von etheno-NAD den Argininrest eines Proteins (hier: CD25) ADP-ribosyliert. Dabei wird Nicotinamid freigesetzt. Der monoklonale Antikörper 1G4 erkennt den etheno-Adenosinrest in der übertragenen etheno-ADP-Ribosylgruppe und kann somit indirekt das entsprechende Protein binden. Zusätzlich ist die Möglichkeit der ADP-Ribosylierung durch <sup>32</sup>P radioaktiv markiertes NAD (rotes Sternchen) dargestellt, die den alternativen Weg des Nachweises ADP-ribosylierter Proteine repräsentiert. In diesem Fall fällt die etheno-Gruppe aus diesem Schema (rot markiert) jedoch weg. (Modifiziert nach Krebs, Koestner et al. 2003)

#### 5.1.3 FACS-Assay der STAT5-Phosphorylierung

Die FACS-Analyse des intrazellulär gelegenen Transkriptionsfaktors STAT5 und seiner Phosphorylierung an dem Tyrosinrest 694 erfordert die Permeabilisierung der Zellen. Die Methode dazu wurde in Anlehnung an eine Veröffentlichung zur intrazellulären Phosphorylierungsdetektion mittels FACS-Analyse durchgeführt (Krutzik and Nolan 2003). Nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Reagenzien wie IL-2, NAD oder dem ART2.2-Inhibitor VHH S+16a wurde zu den Zellen, welche sich in 5 ml RPMI-komplett befanden, 4 ml 4 % PFA zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 1,8 % PFA für ihre Fixierung erreicht wurde. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit reinem Methanol (Endkonzentration 80%) bei 4 °C für 10 Minuten fixiert. Es folgte das Auswaschen des Methanols mit gleichzeitigem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen durch mehrmalige Zugabe von 1 % BSA in PBS. Anschließend wurden, durch Zugabe von CD16 und CD32 spezifischen Antikörpern, die Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche der Lymphomzellen blockiert. Dies führte dazu, dass bei der anschließenden Inkubation mit Anti-Phospho-Stat5 (Y694) mAb (Antikörperklon 47) unspezifische Bindungen weiter gemindert wurden. Nach dieser Inkubation wurde noch einmal mit 1 % BSA in PBS gewaschen, bevor die Proben im Durchflusszytometer untersucht wurden.

## 5.2 Methoden der *in silico* Recherche

### 5.2.1 Virtueller Verdau von Proteinen

Für den virtuellen Verdau von Proteinen, die mit der Massenspektrometrie als ART2-Zielproteine identifiziert wurden kam ein Programm von ExPASy namens PeptideMass zum Einsatz (URL: http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html) (Wilkins, Lindskog et al. 1997). Der ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server gehört zu dem Schweizer Institut für Bioinformatik (SIB) in Basel (URL: http://www.isb-sib.ch). In dem Programm wurden die Sequenzen der Proteine mit den folgenden Parametern virtuell Trypsinverdaut: methionines oxidized; cysteines treated with iodoacetamide; [M+H]<sup>+</sup>; monoisotopic; one allowed missed cleavage; display the peptides with a mass bigger than 500 Da.

#### 5.2.2 Multiple Sequenzalignments

Multiple Sequenzalignments von Proteinsequenzen wurden mit dem Programm T-COFFEE erstellt (URL: www.tcoffee.org) (Notredame, Higgins et al. 2000). Ein solches Alignment der Aminosäuresequenz von Human, Maus und Ratten CD25 ist in Abb. 23 zu sehen.

#### 5.2.3 3D-Strukturvorhersagen

Die Vorhersage der 3D-Kristallstruktur von murinem CD25 wurde anhand eines Alignments der humanen und murinen Aminosäuresequenz ermöglicht. Bei dem Alignment wurde als Quelle der humanen CD25 Aminosäuresequenz die, in der 3D-Kristallstrukur vorkommenden Aminosäuren aus der Publikation von Stauber et al. gewählt (Stauber, Debler et al. 2006, PDB ID code 2ERJ). Das Alignment erfolgte mit dem oben beschriebenen Programm T-COFFEE. Der so identifizierte Sequenzausschnitt des murinen CD25 wurde mit Hilfe des Programms SWISS-MODEL (Automated Protein Modelling Server, URL: http://swissmodel.expasy.org/, Schwede, Kopp et al. 2003) auf das bereits bekannte 3D-Kristallstrukturmodell von CD25 modelliert. Das Ergebnis ist in Abb. 29 C und D zu sehen.

## 5.3 Methoden der Zellbiologie

### 5.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Adhärent wachsende Zellen, wie die in dieser Arbeit verwendeten HEK-T Zellen, wurden üblicherweise in T25 Zellkulturflaschen (Nuc) mit DMEM-komplett bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und mit 1 ml in PBS gelösten Trypsin geerntet. Die Subkultivierung erfolgte im Verhältnis 1:5 bis 1:20 im Abstand von zwei Tagen. In Suspension wachsende Zellen wie YAC-1, CTLL-2 oder Kit 225 wurden in RPMI-komplett Medium in 10 cm durchmessenden Petrischalen kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte ebenfalls im Verhältnis 1:20. Bei stabil transfizierten Zellen wurde zu dem Medium Geniticin (G418) mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. IL-2 abhängige Zelllinien wurden mit 50 U/ml IL-2 kultiviert, um ein schnelles Wachstum zu gewährleisten.

### 5.3.2 Gewinnung von humanen T-Lymphozyten aus Vollblut

Zur Gewinnung von humanen T-Lymphozyten wurden jeweils 20 ml Vollblut von zwei gesunden Probanden in Heparinröhrchen entnommen. Anschließend wurden die mononukleären Leukozyten (Lymphozyten und Monozyten) aus dem Blut unter sterilen Bedingungen mit Hilfe des Ficoll-Hypaque-haltigem "Mono-Poly Resolving Medium" angereichert. Die Zellen wurden mit RPMI-komplett gewaschen und darin kultiviert. Der Zusatz des Antibiotikums Gentamicin (Endkonzentration 50 µg/ml) gewährleistete Schutz vor Kontaminationen, die bei der Blutentnahme entstanden sein könnten.

## 5.3.3 Gewinnung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus Maus-Lymphknoten und Milz

Die Isolation von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus Lymphknoten und Milz von Mäusen erfolgte mit Hilfe des "Mouse CD4 Cell Negative Isolation Kits" (Dynal). Es wurden zwei weibliche P2X7 KO C57BL/6J Mäuse im Alter von neun Wochen verwendet. Die sekundär lymphatischen Organe (Milz und Lymphknoten) wurden entnommen und die Zellen mittels eines feinen Siebes (80 µm Maschenweite, Nitex Membran) vom parenchymatischen Gewebe getrennt. Es folgte ein weiterer Filtrationsschritt mittels eines 0,4 µm Filters von Becton Dickinson, Heidelberg. Anschließend wurde ein Großteil der isolierten Erythrozyten aus der Milz durch Zugabe von Gey-Lösung lysiert. Die Bestandteile von Gey-Lösung (20 Teile A (5 ml), 5 Teile B (1,25 ml), 5 Teile C (1,25 ml), 70 Teile D (17,5 ml)), wovon 25 ml pro Milz verwendet wurden, sind in Kap. 4.11.4 zusammengefasst. Alle Komponenten wurden vor dem Gebrauch autoklaviert. Die Milzzellen wurden mit Gey-Lösung für 10 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend abzentrifugiert und in RPMI-komplett resuspendiert. Danach wurden sie gezählt um entsprechende Mengen an Antikörper einzusetzen.

Das Prinzip des "Mouse CD4 Cell Negative Isolation Kits" (Dynal) besteht darin, im ersten Schritt die nicht-CD4<sup>+</sup> Zellen an monoklonalen Antikörpern (Anti CD8, CD11b, CD16/32, CD45R und Ter-119) zu binden und sie anschließend im zweiten Schritt mit "Dynabeads" zu markieren. Durch einen Magneten werden sie aus dem Zellgemisch entfernt. Die durch negative Selektion angereicherten Zellen aus Lymphknoten und Milz sind CD4<sup>+</sup>-Zellen.

## 5.3.4 ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen mittels <sup>32</sup>P-NAD

4 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden mit einem auf PBS basierenden NAD Mix in 200 µl inkubiert. Der Mix enthielt 1,1 µM NAD/<sup>32</sup>P-NAD in einem Verhältnis von 1:10, bis 1:20 (entsprechend 5-10 µCi / Probe). Zusätzlich war im Mix 1 mM ADP-Ribose enthalten, um den Abbau der ADP-Ribosylverbindungen durch ADP-Ribosylhydrolasen wie CD38 zu inhibieren (Krebs, Adriouch et al. 2005). Die ADP-Ribosylierung fand für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) statt. Anschließend folgten fünf bis sieben Waschschritte, in denen nicht gebundenes, radioaktives Material von den Zellen entfernt wurde. Die Anzahl der Schritte richtete sich nach der Menge an freigesetzter Radioaktivität, welche nach dem Waschen im Überstand gemessen wurde. Eiskaltes PBS mit 500 µM ADP-Ribose wurde für die Waschschritte verwendet. Es folgte die Lyse der Zellen in 1 % Triton X-100 Lysispuffer auf der Basis von PBS für 20 Minuten bei RT. Im Puffer enthalten waren ebenfalls 1 mM AEBSF (welches den Abbau von Proteinen durch irreversible Hemmung von Serinproteasen verhindert), 1 mM ADP-Ribose, 100 µM NAD und 2 mM EDTA (welches durch die Bindung zweiwertiger Ionen, Kofaktoren von Enzymen entfernt). Siehe für gesamte Lysispufferzusammensetzung auch Kap. 4.11.3. Nach der Lyse wurden die Zellkerne pelletiert, indem die Lysate mit 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert wurden. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt mit 13 000 rpm für 5 Minuten, wobei der Rest der nicht gelösten Lysatbestandteile, wie z.B. Membranfragmente entfernt wurden. Bei diesen Arbeitsschritten konnte jeweils eine Probe des nun aufgereinigten Lysates als Gesamtzelllysat (GZL) vor der Immunpräzipitation (IP) abgenommen werden. Diese Proben wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

## 5.3.5 Transiente Transfektion von HEK-T Zellen mit Hilfe des JetPEI-Reagenz

Adhärent wachsende HEK-T Zellen wurden in T25 Flaschen ausgesät, so dass sie am folgenden Tag zu 60 % konfluent waren. Für die transiente Transfektion nach dem JetPEI-Protokoll (s.u.) wurden jeweils 2 µg Plasmid-DNA ART2.2, beziehungsweise 1 µg ART2.2 zusammen mit 3 µg Plasmid-DNA eines CD25-Konstruktes, eingesetzt. 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet und für die Experimente verwendet. Das Transfektionsprotokoll sieht vor, dass pro Transfektion jeweils 250 µl physiologischer Kochsalzlösung in zwei 1,5 µl Eppendorf Tubes vorgelegt werden. Im ersten Tube wurde anschließend die Menge an gewünschter DNA und im zweiten die dazu entsprechende Menge an JetPEI-Reagenz pipettiert und gut vermischt (vortex). Anschließend wurde das JetPEI-Reagenz auf die DNA-Lösung gegeben und erneut gut vermischt (vortex). Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 20 Minuten wurde die Transfektionslösung zu den adhärenten HEK-T Zellen mit frischem Medium-komplett dazugegeben.

## 5.4 Methoden Proteinbiochemie

### 5.4.1 Immunpräzipitation mit Protein-G-Sepharose

In diesem Teil der Experimente wurden bestimmte Proteine durch spezifische Antikörper aus Gesamtzelllysaten entfernt, um sie anschließend auf ihre inkorporierte Radioaktivität hin zu untersuchen.

Der Immunpräzipitation ging immer die Vorklärung voraus. Dabei wurden Gesamtzelllysate (siehe Kapitel 5.3.4) jeweils mit Protein-G-Sepharose, an der Serum-Antikörper immobilisiert waren (MacMillan-Crow and Thompson 1999), für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Dies unspezifisch bindender Proteine. Anschließend diente der Klärung folgte ein Zentrifugationsschritt mit maximal 2000 rpm für 2 Minuten. Der so geklärte Überstand wurde der Immunpräzipitation zugeführt. Dies war ebenfalls eine Protein-G-Sepharose-Matrix an welcher die entsprechenden spezifischen Antikörper zuvor gekoppelt wurden. Für die Kopplung wurden 1 µg Antikörper mit 20 µl Protein-G-Sepharose in 200 µl 1 % Triton X-100 in PBS verwendet. Die Immunpräzipitation geschah für eine Stunde bei 4 °C auf dem Rollinkubator. Die Matrices wurden anschließend vier mal mit 1 % Triton X-100 gewaschen. Zum Schluss wurden die Matrices in 1 x Probenpuffer (NuPage LDS Sample Buffer) mit entsprechendem 1 x Reduktionsmittel (NuPage Sample Reducing Agent) vermischt und bei 70 °C für 15 Minuten im Tisch-Schüttelinkubator erhitzt. Bei diesem Vorgang lösen sich die immunpräzipitierten Proteine von den Antikörpern und werden durch die Hitze denaturiert. Das Reduktionsmittel verhindert in diesem Fall eine erneute Faltung der Proteine bei niedrigeren Temperaturen, wie z.B. bei nachfolgenden SDS-PAGE-Gelelektrophoresen.

Zum Schluss wurden die Proben für fünf Minuten bei 13 000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Es folgte die SDS-PAGE-Gelelektrophorese.

#### 5.4.2 Immobilisation des 1G4 mAb an eine Immunpräzipitationsmatrix

Für die Immobilisation des 1G4-Antikörpers an einer Matrix, wurde der "AminoLink Plus Immobilization Kit" von Pierce Biotechnology, Rockford (USA) verwendet. Dabei wurde 1 ml Matrixsäule mit 1,5 mg 1G4-Antikörper kovalent gebunden. Es wurde nach dem Kit beigelegtem Protokoll verfahren. Die so entstandene Immunpräzipitationsmatrix war in der Lage etheno-ADP-ribosylierte Proteine zu binden.

### 5.4.3 SDS-PAGE und Westernblot-Analysen

Um die gewonnenen Proteinlösungen besser analysieren zu können, wurden sie mit Hilfe einer Gelelektrophorese (10 % NuPage Bis-Tris Polyacrylamid-Gel in MES Laufpuffer) aufgetrennt. Dies geschah bei einer Spannung von konstanten 200 V. Als Größenmarker diente Multimark (Invitrogen). Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA zunächst für drei Minuten auf eine Nitrocellulose-Membran (NC-Membran) und anschließend für 90 Minuten auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) im Blottingpuffer geblottet.

Die NC-Membran wurde einer Silberfärbung unterzogen bei der jeweils 400 µl einer Silberlösung (für Bestandteile siehe Kap. 4.11.5) verwendet wurden. Die Lösung führte nach einigen Minuten zum schwärzen der gebundenen Proteine. Somit ließen sich z.B. die Proteinbeladungsmengen der einzelnen Taschen miteinander vergleichen.

### 5.4.4 Chemilumineszenz-Detektion und Autoradiographie

Bei der Chemilumineszenz-Reaktion wird Luminol durch die Horseradish-Peroxidase (HRP) in einer Reduktions-Oxidations-Reaktion unter alkalischen Bedingungen oxydiert. Dieses ruft eine Lichtemission an der Stelle des HRP-gekoppelten Antikörpers hervor. Die Dokumentation der Reaktion erfolgt mittels eines lichtsensitiven Films.

Bei der Autoradiographie führt die Strahlung eines Radioisotopes, hier des  $\beta$ -Strahlers <sup>32</sup>P, über den zusätzlichen Effekt der Verstärkerfolie zu einer Schwärzung des Films. Dieses geschieht an der Stelle wo das radioaktiv markierte Protein auf der PVDF-Membran geblottet ist. Die Autoradiographie wurde über zwei bis vier Tage bei -80 °C durchgeführt.

## 5.5 Methoden der Molekularbiologie

#### 5.5.1 Gesamt RNA Isolierung

Die Isolierung von RNA aus Zellen wurde mittels des "RNeasy Mini Kits" (Qiagen) durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mittels des denaturierenden Guanidin Isothiocyanat (GTC)-haltigen Puffers lysiert und homogenisiert. Das chaotrope Salz, GTC stellte sicher, dass RNasen im ersten Schritt denaturiert und somit inaktiviert werden, um die RNA zu schützen. Die RNA wurde anschließend mit Hilfe von Ethanol über eine Affinitätsmatrix auf Silika-Gel-Membran Basis gebunden, durch mehrere Waschschritte gereinigt und zum Schluss mit 30 µl Wasser eluiert. Das Eluat sollte unter anderem ribosomale RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA) und messenger RNA (mRNA) enthalten.

### 5.5.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe des Photometers Ultrospec 2000 bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Ein Teil der Probe wurde dafür in einem Verhältnis von 1:50 mit RNase freiem Wasser verdünnt. Es wurde zusätzlich die  $OD_{280}$  nm gemessen, um mittels des Quotienten von  $OD_{260/280}$  eine Aussage über die Reinheit der Probe zu treffen.

### 5.5.3 cDNA-Synthese

Um aus der Gesamt-RNA eine einzelsträngige Komplementär-DNA (cDNA) herzustellen, bedarf es der Reversen Transkriptase (RT). 1,5  $\mu$ g der gesamt-RNA wurde mit 3  $\mu$ l zufälliger Hexamerprimer (0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l) (random hexamers) und H<sub>2</sub>O (Endvolumen 16,8  $\mu$ l) für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Damit war es möglich die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen und somit den Primern ein Anlagern zu ermöglichen.

In der anschließenden Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurden dann cDNA Stränge hergestellt. Dazu verwendet man ein 11,5  $\mu$ l RNA / "random hexamers"-Gemisch zusammen mit 1  $\mu$ l Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs), 2,5  $\mu$ l Dithiothreitol (DTT), 4  $\mu$ l 5 x "First Strand Buffer" und 1  $\mu$ l (200 U/ $\mu$ l) "SuperScript II Reverse Transcriptase" (Invitrogen). Für das RT-PCR Programm siehe Tab. 4.

1 av. 4	KI-FOK FIOgramm		
Schritt	Temperatur[°C]	Dauer [min]	Vorgang
1	24	10	Anlagerung der Primer
2	42	20	reverse Transkription
3	95	2	Hitzedenaturierung

#### Tab. 4 RT-PCR Programm

#### 5.5.4 PCR-Primer Design

Es wurden jeweils zwei Primer für die Klonierung von murinem und humanem CD25 erstellt. Der Primer, welcher am 5' gelegenem Ende der codierenden Sequenz in der komplementären DNA der messenger RNA von CD25 binden sollte, enthielt vor dem Start-Codon eine *Eco* RI Sequenz. Der Primer für die Bindung am 3' Ende der codierenden Sequenz enthielt nach dem Stop-Codon eine *Not* I Sequenz.

Die zumeist komplementären Mutageneseprimer waren ca. 30 Basenpaare lang und enthielten in ihrer Mitte ein Codon, welches derart verändert wurde, dass statt der Aminosäure Arginin Lysin kodiert wird. Siehe dazu Tab. 5.

Die Klonierungs- und Mutageneseprimer sind in Kap. 4.9 zu sehen.
Tab. 5Mutationsschema für die Veränderung eines Arginin-Codons zu einem Lysin-Codon. Links in der Tabelle sind alle Codons aufgeführt, die für Arginin codieren. Rechts stehenjeweils die veränderten Basen-Triplets, welche für ein Lysin codieren

Argin-Codon	Mutation zum
	Lysin-Codon
AGG	AAG
AGA	AAA
CGG	AAG
CGA	AAA
CGC	AAA

### 5.5.5 Gradienten PCR Amplifikation

Bei einer Gradienten-Polymerase-Kettenreaktion (Gradienten PCR) wird die Annealing-Temperatur variiert. Verschiedene Proben mit jeweils einer anderen Annealing-Temperatur werden so amplifiziert um so die Temperatur zu eruieren, bei der am meisten spezifisches Amplifikat entsteht. Zu dem Programm siehe Tab. 6.

Schritt	Temperatur[°C]	Vorgang	Dauer	Sprung	Wiederholungen
1	94	Polymeraseaktivierung	8 min		
2	94	DNA-Denaturierung	30 sec	J	
3	variabel	Annealing	30 sec		x29
4	72	Kettenverlängerung	1 min	)	
5	72	letzte Kettenverlängerung	8 min		
6	4		pause		

Tab. 6 Gradienten PCR-Programm

Es wurden in einem Volumen von 20  $\mu$ l, 14,2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l 10x Ampli Taq Gold Puffer, 1  $\mu$ l Forward Primer, 1  $\mu$ l Reverse Primer, 0,6  $\mu$ l dNTPs, 0,2  $\mu$ l Ampli Taq Gold und 1  $\mu$ l cDNA verwendet

### 5.5.6 Agarose-Gelelektrophorese

1 % Agarose, in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) gelöst, wurde mit  $0,1 \mu g/ml$ Ethidiumbromid (EtBr) versetzt. Dieser Farbstoff erhöht die Fluoreszenzintensität durch Interkalation in die Doppelhelix von Nukleinsäuren. Durch die Fluoreszenzdetektion bei einer UV-Bestrahlung von 250–310 nm kann somit die DNA sichtbar gemacht werden. Die Proben wurden jeweils mit einem 10 x Loading Dye (10 x TAE, 50 % (v/v) Glycerol, Orange G) gemischt und in die vorgesehenen Geltaschen pipettiert. Als DNA-Leiter wurde 10  $\mu$ l Ready Mix 1 kb DNA Ladder (Gene Ruler) mit 0,5  $\mu$ g pro Spur verwendet. Die Gelelektrophorese lief bei einer Spannung von 90 V (50 ml Gel), oder 120 V (100 ml Gel).

### 5.5.7 Aufreinigung von DNA Banden aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA Banden aus dem 1 % Agarosegel geschah mit dem "QIAquick Gel Extraktion Kits" (Qiagen). Dabei fällt die DNA durch Erhöhung der Konzentration eines chaotropen Salzes und Erniedrigung des pH Wertes unter 7.5 aus und bindet an eine Silika-Gel-Matrix. In den anschließenden Waschschritten können unter anderem Salze, Enzyme, Gelreste, Nukleotide und das Ethidiumbromid ungehindert durch die Matrix geführt und entfernt werden. Zum Schluss wird die DNA durch Wasser, oder einen 10 mM Trispuffer pH 8.5 eluiert.

### 5.5.8 Restriktionsenzymatischer Verdau von DNA-Fragmenten

Zum Verdau der DNA Fragmente wurden die Restriktionsendonukleasen *Eco* RI und *Not* I verwendet. Vorteile dieser Enzyme sind, dass sie nicht in der codierenden Sequenz von CD25 schneiden und die Produktenden nicht zueinander kompatibel sind. Damit ist eine gerichtete Klonierung des CD25 in den eukaryotischen Expressionsvektor pCMV SPORT oder pcDNA6, aus welchen vorher mit den gleichen Endonukleasen ein Insert rausgeschnitten wurde, möglich. Weitere Vorteile dieser beiden Enzyme sind das Entstehen so genannter "sticky ends" (siehe palindrome Erkennungssequenz mit überhängenden Basen in Abb. 5 und Abb. 6) nach dem Schneiden und die Möglichkeit sie nach der Reaktion bei 65 °C zu inaktivieren.

In einem 30 µl Ansatz wurden H<sub>2</sub>O, 3 µl 10x NEBuffer *Eco* RI, 3 µl 10x BSA, 1 µ *Eco* RI, 1 µl *Not* I und eine, dem Versuch entsprechende Menge an DNA, dazugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend, bei dem Verdau für einen Ligationsansatz, für 20 Minuten bei 65 °C im Heizblock gestellt um die Enzyme zu inaktivieren.

5' G С 3' Α Т Т А С 5' 3' С Т Т А А Abb. 5 Eco RI Erkennungssequenz 5' G С G G С С G С 3' 3' С С G С G 5' С G G Abb. 6 Not I Erkennungssequenz

### 5.5.9 Ligation von DNA Fragmenten

Die T4-Ligase ermöglicht die kovalente Verknüpfung der amplifizierten, kodierenden Sequenz mit dem eukaryotischen Expressionsvektor im Ligationsansatz. Verwendet wurde dazu 0,5  $\mu$ l der T4-Ligase von Invitrogen, Vektor, Insert, und 5  $\mu$ l des 5xT4-Ligasepuffers in einem 20  $\mu$ l Ansatz. Das Verhältnis von Vektor zu Insert betrug 1:3. Die Reaktion dauerte 14 Stunden bei 14 °C.

### 5.5.10 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die Ermittlung der Basenfolge bestimmter DNA Moleküle wurde mit Hilfe der Sequenzierungsmethode nach Sanger mit Fluorochrom-markierten Didesoxynukleotiden durchgeführt. Dazu wurde der BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet.

# 6. Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in drei Abschnitte unterteilt. Im ersten werden potentielle ART2-Zielproteine der endogen ART2 exprimierenden T-Lymphomzelllinie YAC-1 mittels Massenspektrometrie identifiziert. Der IL-2 Rezeptor CD25 und das Adhäsionsmolekül CD229 werden als prominente Zielproteine verifiziert.

Im zweiten Abschnitt werden die IL-2-abhängigen T-Lymphomzelllinien CTLL-2 der Maus und Kit 225 des Menschen stabil mit muriner ART2.2 bzw. humaner ART1 transfiziert. Sowohl murines, als auch humanes CD25 werden dabei als prominente Zielproteine bestätigt. Für die CTLL-2 wird gezeigt, dass die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen die IL-2-induzierte Phosphorylierung von STAT5 hemmt.

Im dritten Abschnitt werden die potentiellen Target Arginine der ADP-Ribosylierung in Maus und Human CD25 näher untersucht. Zunächst wird die Lage von konservierten und nicht konservierten Argininen in einem Aminosäurensequenz-Alignment aus humanen und murinen CD25 ermittelt. cDNA Expressionsvektoren für murines und humanes CD25 werden als Basis für die zielgerichtete Mutagenese der Arginine kloniert. Es werden murine ART2.2, beziehungsweise humane ART1 und die entsprechenden speziesspezifischen CD25-Argininmutanten in HEK-T Zellen kotransfiziert. Anschließend wird die ADP-Ribosylierung von Wildtyp-CD25 und den CD25-Argininmutanten vergleichend untersucht.

# 6.1 Nachweis von ART2-Zielproteinen auf der murinen T-Lymphomzelllinie YAC-1 und auf primären murinen T-Zellen

In diesem Kapitel wird die Identifikation von ART2-Zielproteinen beschrieben. Dazu wurde die murine T-Zell-Lymphomzelllinie YAC-1 gewählt. Die Wahl dieser Zelllinie geschah aufgrund ihrer hohen endogenen ART-Aktivität. Die Identifikation möglicher Zielproteine wurde in mehreren Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt fand die etheno-ADPgefolgt Ribosylierung Zelloberflächenproteinen von statt. von einer affinitätschromatographischen Aufreinigung und Größenfraktionierung mittels SDS-PAGE der so modifizierten Proteine. Die aufgereinigten Proteinbanden wurden im dritten Schritt durch massenspektrometrische Verfahren untersucht. Unter den eruierten Proteinen waren bereits bekannte Kandidaten wie CD229 oder CD205. Es befanden sich aber auch neue Zielproteine darunter. Eines der identifizierten Proteine war die alphapotentielle Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors (CD25). Mittels radioaktiver Nachweismethode wurden CD25 und CD229 als die markantesten Zielproteine der YAC-1 Zelllinie bestätigt.

### 6.1.1 Expression und Aktivität von ART2 auf der Lymphomzelllinie YAC-1

Die Zelllinie, welche für die Charakterisierung neuer ART2-Zielproteine ausgesucht wurde, sollte zwei wichtige Vorraussetzungen erfüllen. Zum Ersten sollte sie eine hohe endogene ART2-Aktivität aufweisen, um ADP-ribosylierte Proteine von sämtlichen Zellen zu erhalten. Zum Zweiten sollte sie sich in großen Mengen kultivieren lassen, um eine hohe Gesamtproteinausbeute für die Massenspektrometrie zu erhalten. Im folgenden Absatz wird die Erlangung der hohen ART-Aktivität auf der YAC-1 Lymphomzelllinie beschrieben. Die Zellen wurden dabei mit etheno-NAD inkubiert. Die erfolgreiche etheno-ADP-Ribosylierung ihrer Zelloberflächenproteine wurde durch den monoklonalen Antikörper (mAb) 1G4 nachgewiesen. Die Zellen mit einer hohen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) konnten durch wiederholte FACS-Sortierungen angereichert werden. Die so in drei Zyklen selektionierten Zellen zeichneten sich sowohl durch eine hohe ART2 Expression als auch durch eine hohe ART-Aktivität aus. Diese ließ sich durch einen FACS-Assay demonstrieren (Abb. 7). Die Ergebnisse zeigen die durch den mAb Ali detektierte Zelloberflächenexpression von ART2 an (Abb. 7 A). Die starke ADP-Ribosylierungsaktivität ist durch eine hohe MFI des Fluorochrom-gekoppelten mAb 1G4 dargestellt (Abb. 7 B).



Abb. 7 FACS-Assay der Zelloberflächenexpression von ART2 und deren ADP-Ribosylierungsfunktion. A) YAC-1 Lymphomzellen wurden mit (schattiertes Histogramm) und ohne (gepunktete Linie) Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen ART2 inkubiert. B) YAC-1-Lymphomzellen wurden mit (schattiertes Histogramm) und ohne (gepunktete Linie) 50 µM etheno-NAD inkubiert und anschließend mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper markiert. Dieser mAb erkennt etheno-Adenosinreste in den übertragenen etheno-ADP-Ribosylgruppen (Antikörperklon 1G4).

#### 6.1.2 Markierung und Aufreinigung von ART2-Zielproteinen

Nach der Überprüfung der ADP-Ribosylierung der Zelloberflächenflächenproteine wurden die YAC-1 Lymphomzellen für die Gewinnung ausreichender Mengen an ADP-ribosylierten Proteinen über eine Periode von einer Woche in immer größer werdenden Volumina kultiviert. Die so gewonnenen  $1 \times 10^9$  Zellen wurden anschließend mit relativ geringen

Mengen an eNAD  $(2 \mu M)$  für 20 Minuten inkubiert. Die niedrig gewählte eNAD-Konzentration entspricht der scheinbaren Km der ART2.2 für etheno-NAD und sollte eine übermäßige Aktivität der ART vermeiden (Krebs, Koestner et al. 2003; Bannas, Adriouch et al. 2005; Zhao, Gruszczynska-Biegala et al. 2005). Die so behandelten Zellen wurden bei 4 °C gründlich gewaschen und dann anschließend mit 1 % Triton X-100 lysiert. Durch Zentrifugation wurden die Zellkerne von den Zytoplasmabestandteilen und den löslichen Plasmamembranproteinen getrennt. Die etheno-ADP-ribosylierten Proteine wurden über eine Affinitätssäule getrennt, an die zuvor der mAb 1G4 kovalent gebunden worden war (siehe Kapitel 5.4.2). Um Gesamtprotein und ADP-ribosylierte Proteine unterscheiden zu können, wurden von den verschiedenen Schritten Proben genommen und die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte eine Coomassiefärbung (Abb. 8 A) für die Proteinmengenabschätzung, ein 1G4-Immunoblot (Abb. 8 B) diente der Darstellung ADPribosylierter Proteine.

In Abb. 8 A ist zu erkennen, dass die Gesamtproteinmengen in Lysat (L) und Säulendurchfluss (DF) in der Coomassiefärbung ähnlich sind. Jedoch sind die ADP-ribosylierten Proteine im Durchfluss vermindert (Abb. 8 B). Das deutet auf eine suffiziente, wenngleich auch nicht vollständige, Bindung der etheno-ADP-ribosylierten Proteine an die 1G4-Matrix. Die folgenden Waschgänge (W) der Säule zeigten nach dreimaliger Anwendung kein Ausschwemmen ADP-ribosylierter Proteine mehr. Im Folgenden wurden spezifisch die etheno-ADP-ribosylierten Proteine von der Matrix gelöst, indem sie mit etheno-Adenosin eluiert wurden. Die Eluat-Fraktionen (jeweils ein Säulenvolumen) zeigen, dass die höchste Konzentration an ADP-ribosylierten Proteine in der Fraktion (EL2) erscheinen in dem Immunoblot intensiver als in dem ursprünglichen Lysat (L). Dieser Effekt deutet auf eine höhere Konzentration ADP-ribosylierter Proteine in EL2 als im ursprünglichen Lysat. Das in der Coomassiefärbung sichtbare Bandenmuster in der Spur EL2 ähnelt dem Muster im 1G4-Immunoblot.



Abb. 8 Aufreinigung anhand von etheno-NAD markierten ART2-Zelloberflächenzielproteinen mittels SDS-PAGE und Detektion durch Coomassiefärbung (A) und 1G4-Immunoblot (B)  $1 \times 10^9$  YAC-1 Zellen wurden für 20 Minuten mit 2  $\mu$ M eNAD bei Raumtemperatur inkubiert, gewaschen und mit 1 % Triton X-100 lysiert. Nach dem Pelletieren der Zellkerne wurden die Zelllysate (L) über eine Säule mit immobilisierten 1G4-Antikörper gegeben um die etheno-Adenosin-Reste der ADP-ribosylierten ART2-Zielproteine zu binden. Nach durchlaufen der Lysate (DF) wurde die Säule zwei Mal gewaschen um ungebundene Proteine zu entfernen (W) und anschließend fünf mal hintereinander mit etheno-Adenosin eluiert (EL 1-5). Proben aus allen Fraktionen wurden per Westernblot aufgetrennt und dann mittels verschiedener Detektionsverfahren dargestellt (A, B)

Um die ADP-ribosylierten Proteine in dem zweiten Eluat näher zu charakterisieren, wurden sie in präparativen Maßstab gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurde ein 10 % Acrylamidgel von 1 mm Dicke und als Laufpuffer MOPS verwendet, um Proteine im höheren molekularen Bereich, wo viele ADP-ribosylierte Banden zu sehen waren, besser aufzutrennen. Als Größenmarker diente eine Lösung aus BSA (Größe von 66 kDa), Lysozym (14 kDa) und dem mAb 1G4 (150 kDa). Letzterer zerfällt durch das Erhitzen der Proben in SDS-haltiger Lösung größtenteils in eine schwere (55 kDa) und eine leichte Kette (25 kDa). Die Markerbestandteile wurden so gewählt um Verunreinigungen durch fremde Proteine, die von der Massenspektrometrie detektiert werden können, gering zu halten.

Die Geleektrophorese wurde zwei Mal ausgeführt und erlaubte somit zwei massenspektrometrische Untersuchungen (Analyse 1, Abb. 9 A, B und Analyse 2, Abb. 9 C, D). Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt (A und C) und es wurde zusätzlich ein 1G4-Immunoblot (B und D) angefertigt. Auch hier ziegt sich ein ähnliches Bandenmuster im Immunoblot und Coomassiefärbung, wobei letztere einige zusätzliche Banden aufweist. Die der im Immunoblot entsprechenden Coomassie-Banden wurden unter einem Stereomikroskop ausgeschnitten und dem Trypsinverdau für die Massenspektrometrie zugeführt. Diese wurde durch PD Dr. Friedrich Buck aus dem Institut für Klinische Chemie, UKE durchgeführt.



Abb. 9 SDS-PAGE mit Coomassiefärbung (A, C) und 1G4-Immunoblot (B, D) von YAC-1-Zelloberflächenproteinen nach eNAD-Inkubation und 1G4-Antikörper Affinitätschromatographie. Nach Elution der an die 1G4-Antikörper gekoppelten Matrix gebundenen Proteine, wurde in zwei Untersuchungen (A, B und C, D) das Eluat mit dem höchsten Proteingehalt (Eluat 2, Abb. 7) über zwei SDS-PAGE aufgetrennt. Das erste Gel wurde mit Coomassie gefärbt und das zweite durch einen 1G4-Immunoblot untersucht. Die in der Coomassie-Färbung sichtbaren Banden wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch auf die enthaltenen Proteine hin analysiert.

### 6.1.3 Massenspektrometrische Identifikation der aufgereinigten ART2-Zielproteine

Die Proteine in den ausgeschnittenen Banden wurden für die massenspektrometrischen Untersuchungen proteolytisch mit Trypsin, welches hinter Arginin- und Lysinresten schneidet, in kleinere Peptide fragmentiert. Anschließend wurden störende Salze und Seifen entfernt. Die Peptide konnten dann mittels nano-electrospray Massenspektrometrie in einem QTOF II Gerät durch eine weitere Fragmentierung näher untersucht werden. Die dabei detektierten Peptidfragmentmassen ermöglichten Rückschlüsse auf Teilsequenzen einzelner Peptide. Nach entsprechender Suche in Proteinsequenzdatenbanken konnte somit ein Teil der Peptide Proteinen zugeordnet werden. Abb. 10 veranschaulicht dies am Beispiel eines Peptids, das der alpha-Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) zugeordnet werden konnte. Hierbei wurde ein Peptid mit einer Masse von 1892,9 Da gemessen, welches im Anschluss weiter sequenziert wurde. Dabei erschienen Fragmente, die sich in ihren Massen voneinander unterschieden. Diese Unterschiede entsprechen den Molmassen einzelner Aminosäuren, die es erlauben die Sequenz des Peptids aufzuklären (Abb. 10).



Abb. 10 Massenspektrometrische Analyse eines fragmentierten Peptides aus CD25. Die einzelnen Peaks entsprechen Massen von Pepdidfragmenten eines 1892,9 Da schweren Peptides. Oben eingeblendet ist zum Vergleich die Sequenz des N-terminalen Trypsin-Fragmentes von CD25 mit den jeweils vorhergesagten Peptidfragment-Massen.

Bei der zwei Mal durchgeführten Massenspektrometrie konnten einige Peptide bestimmten Proteinen zugeordnet werden (Tab. 7 und Tab. 8). In der Tabelle sind bekannte oder vorhergesagte Zelloberflächenproteine fett hervorgehoben, da diese potentielle Zielproteine der ecto-ART2 darstellen. Im Gegensatz dazu können intrazelluläre Proteine am ehesten als Kopräzipitation mit einem ADP-ribosylierten Protein gedeutet werden.

Tab. 7	Zugeo	rdnete Pr	oteine in der	ersten m	assenspektroi	netrischen	Analyse.	Die den
ausgeschn	ittenen B	Banden (Ni	., entspricht de	en Banden	nummern in A	bb. 10) zug	eordneten	Proteine
(Protein) s	sind zur	besserer	Identifikation	mit ihrer	n zugehöriger	Genname	n (Gen)	und der
Proteindate	enbankeii	ntragskenr	ung (Entry) ang	gegeben. D	as anhand dei	<sup>.</sup> Peptidsequ	enz ausge	rechnete
Molekularg	ewicht de	es Proteins	s wird als Min.	W in kDa	angegeben. D	as Molekula	rgewicht de	er Bande
ist als Rela	at. MW in	kDa ange	geben. Unter P	ept. wird d	e Anzahl der p	ro Bande ge	emessener	Peptide
der Anzah	hl der o	dem Prot	ein zugeordne	ten Pepti	de gegenübei	gestellt. Di	ie bekann	te bzw.
vorhergesa	agte zellu	läre Lokali	sation des Prote	eins ist unt	er Lok. aufgefü	hrt.		

Nr.	Protein	Gen	Entry.	Lok.	Pept.	Min. MW	Relat. MW
1	-		-	-	5 / 0	-	144,99
2	Tyrosine phosphatase LAR	Ptprf	Q9EQ17	Tm Type 1	8 / 2	150-kD Unter- einheit	121,66
3	-		-	-	7 / 0	-	-
4	p100 co-activator	Snd1	Q78PY7	Nukl. / ER	5 / 2	102	104,75

5-9	-		-	-	30 / 0	-	-
10	heat shock protein 8 (Heat shock cognate 71 kDa protein)	Hspa8	P63017	Zytopl./ Zelloberfläche	8 / 1	71	80,41
11.1	Tubulin α-1A chain	Tuba1a	P68369	Zytoskelett	7 / 1	50	57,57
	Tubulin $\beta$ -4 chain	Tubb4	Q9D6F9	Zytoskelett	7 / 2	50	
	ATP synthase, H+	Atp5b	P56480	Mito. /	7 / 1	56	
	transporting			Zelloberfläche			
	mitochondrial F1						
	complex, p subunit	112mg	D01500	Tm Trma 1	7 / 1	201	
	interleukin 2	112ra	P01590	1 m Type 1	//1	28.4	
	(CD25)						
11.2	eukaryotic translation	Eef1a1	P10126	Zytopl.	8 / 2	50	53,14
	elongation factor 1 alpha 1						
11.3	Citrate synthase	Cs	Q3UDP3	Mito. Matrix	10 / 1	51	50,27

#### Tab. 8 Zugeordnete Proteine in der zweiten massenspektrometrischen Analyse

Nr.	Protein	Gene	Entry.	Lok.	Pept.	Min. MW	Relat. MW
1	CD205	Ly75	Q60767	Tm Type 1	6 / 1	194.56	162,16
2, 3	-		-	-	14 / 0	-	-
4	p100 co-activator	Snd1	Q78PY7	Nukl. / ER	7/4	102	113,22
5	-		-	-	6 / 0	-	-
6	CD229	Ly9	Q01965	Tm Type 1	9/3	67.81	103,83
	Elongation factor 2	Eef2	P58252	Zytopl.	9 / 1	95	
	Transcription intermediary factor 1- β	Trim28	Q62318	Nukl.	9 / 1	88	
7	Threonyl-tRNA synthetase	Tars	Q9D0R2	Zytopl.	10 / 1	83	97,25
	Nucleolin (Protein C23)	Ncl	P09405	Nukl. / Nukleolus / Zelloberfläche	10 / 1	77	
8	Villin 2 (Ezrin)	Vil2	P26040	Membranassoz	4 / 4	69	87,67
9	Moesin	Msn	P26041	Membranassoz	8 / 3	68	85,61
10	-		-	-	6 / 0	-	83,15
11	eukaryotic translation elongation factor 1 $\alpha$ 1	Eeflal	P10126	Zytopl.	14/3	50	53,06
	Citrate synthase	Cs	Q3UDP3	Mito. Matrix	14 / 1	51	
	interleukin 2 receptor, α chain (CD25)	Il2ra	P01590	Tm Type 1	14 / 2	28.4	

### 6.1.4 Nachweis der ADP-Ribosylierung bestimmter identifizierter ART2-Zielproteine

Der folgende Abschnitt schildert die Bestätigung der ADP-Ribosylierung der massenspektrometrisch identifizierten potentiellen ART2-Zielproteine CD25 und CD229. Dazu wurde zuerst deren Zelloberflächenexpression auf YAC-1 Lymphomzellen verifiziert. Anschließend wurde die ADP-Ribosylierung mittels radioaktiv basierter Nachweismethode bestimmt.

### Nachweis der Expression mittels FACS

Die Expression einiger der per Massenspektrometrie auf den YAC-1 Lymphomzellen identifizierten ART2-Zielproteine wurde im FACS-Assay untersucht. Dazu wurden YAC-1 Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten mAb gegen CD25 und CD229 inkubiert. Der P2X7 Purino-Rezeptor, der bereits als ART2 Zielprotein auf YAC-1 Zellen bekannt war (Bannas 2007), jedoch nicht in den Massenspektrometrie-Analysen identifiziert wurde, wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Für den Nachweis von CD25 wurden unterschiedliche mAb (Klon 3C7 und 7D4) verwendet. Für die Expression von P2X7 und CD229 wurden die Antikörperklone RH23 und 30CO7 entsprechend benutzt. In Abb. 11 wird gezeigt, dass alle drei Proteine auf den YAC-1 Zellen exprimiert wurden. P2X7 wies dabei mit einer geringeren MFI die niedrigste Zelloberflächenexpression auf.



Abb. 11 Darstellung der Zelloberflächenexpression potentieller ART2 Zielproteine mittels FACS-Assay. In diesem Assay wurden YAC-1-Lymphomzellen mit (schattiertes Histogramm) und ohne (gepunktete Linie) Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen CD25 (Antikörperklone A 3C7 und B 7D4), P2X7 (C) und CD229 (D) für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert und deren Bindung an der Zelloberfläche mittels FACS analysiert.

# Beeinflussung der Bindung von Antikörpern gegen ART2-Zielproteine durch etheno-ADP-Ribosylierung

Für die radioaktive Nachweismethode der ADP-Ribosylierung war eine Immunpräzipitation der so modifizierten Proteine mit einem mAb nötig. Deshalb musste davor festgestellt werden, dass die ADP-Ribosylierung der Proteine nicht die Antikörper / Antigen-Interaktion behindert. Es wäre vorstellbar, dass die kovalent gebundene ADP-Ribose das vom Antikörper erkannte Epitop derart verändert, dass dieser gar nicht mehr, oder nur noch schwach binden kann (Nemoto, Yu et al. 1996). Um das zu überprüfen wurden YAC-1 Lymphomzellen mit und ohne 50 µM eNAD für 10 Minuten inkubiert (siehe Abb. 7). Anschließend wurden die Antikörper gegen die entsprechenden ART2-Zielproteine zugegeben. Zu sehen ist in Abb. 12, dass für keines der untersuchten Antigene die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen zu einem dramatischen Bindungsverlust des Antikörpers führte. Es fand sich lediglich eine leichte Ab- bzw. Zunahme der MFI für die CD25 spezifischen Antikörper 3C7 und 7D4 nach ADP-Ribosylierung.



Abb. 12 FACS-Assay der Bindungsfähigkeit von Antikörpern gegen potentielle ART2-Zielproteine nach etheno-ADP-Ribosylierung. Lymphomzellen YAC-1 mit funktionsfähiger ART2-Zelloberflächenexpression (siehe Abb. 7) wurden mit (durchgezogene Linie) und ohne (gepunktete Linie) eNAD inkubiert und anschließend wie in Abb. 11 mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD25 (**A** und **B**), P2X7 (**C**) und CD229 (**D**) inkubiert. Die entsprechende Bindung des Antikörpers wurde dann mittels FACS-Assay ermittelt.

# Nachweis der ADP-Ribosylierung bestimmter Zelloberflächenproteine mittels radioaktiv markiertem NAD

Nach dem Nachweis der guten Antikörperbindung trotz ADP-Ribosylierung von CD25, CD229 und P2X7 in Abb. 12, folgte ein Versuch zur Bestätigung der ADP-Ribosylierung jener Proteine mit Hilfe von radioaktivem NAD. Dabei wurden YAC-1 Lymphomzellen mit <sup>32</sup>P-NAD inkubiert, gewaschen, lysiert, immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE-Autoradiographie weiter analysiert. In Abb. 13 sind die ADP-ribosylierten Proteine im Gesamtzelllysat vor und nach der Immunpräzipitation zu erkennen (GZL 1 und 2). Daneben werden die drei aufeinander folgenden Präzipitationen (IP 4 bis 6) dargestellt. Die Gesamtzelllysate weisen in den drei Versuchen ein ähnliches Bandenmuster auf. Das ADP-Ribosylierungsmuster besteht aus einer prominenten Bande bei 45 kDa und drei starken Banden bei 80 kDa, 90 kDa, und 120 kDa. Des Weiteren sind mehrere schwächere Banden, z.B. bei 35 kDa und 200 kDa zu erkennen. Wie anhand der Autoradiographie in Abb. 13 A zu erkennen ist, enthält eine breite Bande von 45 kDa einen großen Anteil der Radioaktivität aus dem Gesamtzelllysat. Diese Bande wurde mittels des anti-CD25 mAb fast vollständig

immunpräzipitiert und fehlt somit in der Spur des Gesamtzelllysates nach Immunpräzipitation. Es handelt sich dabei um die alpha-Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors (CD25). Das Molekulargewicht dieser Bande (ca. 45 kDa) entspricht dem der stark glykosylierten Form von CD25. Eine der beschriebenen Banden, welche ebenfalls eine hohe Intensität aufzeigt und sich bei ca. 90 kDa befindet, wurde durch die Immunpräzipitation als CD229 identifiziert (Autoradiographie B). Das relative Molekulargewicht dieser Bande entspricht dem vorhergesagten Molekulargewicht des glykosylierten CD229. Es handelt sich bei der Bande mit der zweitstärksten ADP-Ribosylierung auf YAC-1 Zellen also um CD229. In der Abb. 13 C zeigt die Immunpräzipitation des bekannten ART-Zielproteins P2X7 drei Banden (bei 75 kDa, 150 kDa und 200 kDa). Das relative Molekulargewicht der untersten Bande entspricht dem vorhergesagten Molekulargewicht des glykosylierten P2X7 von ca. 75 kDa. Bei den höheren Banden könnte es sich um P2X7 Dimere/Trimere oder um andere, kopräzipitierte Proteine handeln. In letzterem Fall würde es sich bei den Kopräzipitaten ebenfalls um ART-Ziele handeln. P2X7 scheint kein Hauptziel der ART2 auf dieser Zelllinie zu sein.

Zusätzlich ist zu erwähnen, dass in allen drei Experimenten offensichtlich keine ADPribosylierten Proteine unspezifisch an die mit PIS gesättigten Protein-G-Sepharose gebundenen haben (Autoradiographie A bis C Spur 3).

CD25 weist in den Autoradiographien die höchste Inkorporation und ist somit das Hauptziel der ART auf dieser Zelllinie. CD229 bindet ebenfalls viel Radioaktivität und ist damit ein prominentes ART-Zielprotein.



Abb. 13 Darstellung der ADP-Ribosylierung von CD25 als das wichtigste Zielprotein neben CD229 und P2X7 auf YAC-1 Zellen. Zellen wurden mit <sup>32</sup>P-NAD inkubiert, gewaschen und dann in 1 % Triton X-100 Puffer lysiert. Nach Klärung der Lysate durch Zentrifugation erfolgte eine sequentielle Immunpräzipitation mit einer vorgeschalteten Präzipitation mit an Protein-G-Sepharose immobilisierten Serumantikörpern (Spur 3) und drei auf einander folgende Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen CD25 (A), CD229 (B) und P2X7 (C). Proteine in den Gesamtzelllysaten (GZL) vor und nach der Immunpräzipitation (Spuren 1 und 2) und in Immunpräzipitaten (IP) (Spuren 4-6) wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und auf einer PVDF Membran geblottet. Radioaktiv markierte (ADP-ribosylierte) Proteine wurden auf der Membran mittels Autoradiographie detektiert.

### 6.1.5 ADP-Ribosylierung von CD25 durch die ART2 auf murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Nachdem festgestellt wurde, dass CD25 durch die endogene ART2 der YAC-1 Lymphomzellen ADP-ribosyliert wird, stellte sich die Frage nach der Manifestation einer solchen Beobachtung auf primären Zellen. Eine kleine Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, genannt regulatorische T-Zellen (Tregs) exprimiert konstitutiv CD25 (Sakaguchi 2005). Um eine ADP-Ribosylierung von CD25 durch ART2 zu untersuchen wurden die sekundär lymphatischen Organe Milz und Lymphknoten präpariert und die CD4<sup>+</sup> Zellfraktion durch negative Selektion angereichert. Diese CD4<sup>+</sup> Zellfraktion wurde anschließend mit radioaktivem NAD inkubiert, um wie in Abb. 13 das ADP-Ribosylierungsmuster auf den Zellen sichtbar zu machen. Die ADP-Ribosylierung von CD25 wurde dann wie zuvor bei den YAC-1 Lymphomzellen durch Immunpräzipitation und SDS-PAGE-Autoradiographie untersucht (Abb. 14). Die Autoradiographie der Proteine im Gesamtzelllysat (GZL 1) zeigt ein auffällig vielfältiges Bandenmuster. Dies deutet an, dass es auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine größere Vielfalt an ADP-ribosylierten Proteinen gibt als auf der YAC-1 Zelllinie. Bei dem immunpräzipitierten Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa handelt es sich offensichtlich um CD25 (Spur 4). Anders als bei YAC-1 Lymphomzellen erscheint die CD25-Bande als eine der schwächeren Banden. Ein Grund dafür könnte sein, dass nur ca. 5-10% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD25 konstitutiv exprimieren (Sakaguchi 2005). Fast alle peripheren, naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen weisen jedoch eine ART-Aktivität auf (Krebs, Koestner et al. 2003).



**Abb. 14 Darstellung der ADP-Ribosylierung von CD25 auf CD4<sup>+</sup> Zellen.** Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten einer P2X7KO Maus isoliert und die CD4<sup>+</sup> Fraktion durch negative Selektion angereichert, mit radioaktivem NAD inkubiert, gewaschen und lysiert. Die sequentielle Immunpräzipitation mit Serum (Spur 3) und anti-CD25-Antikörpern drei Mal in Folge (IP 4, 5, 6)

erfolgte wie in Abb. 13 beschrieben (Gesamtzelllysat vor und nach Immunpräzipitation, GZL 1 und 2). Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und dann in zwei Richtungen auf eine PVDF und eine Nitrocellulosemembran (NC) geblottet. Die PVDF Membran wurde für 96 h bzw 24 h (ganz links) autoradiographiert. Die NC Membran wurde silber gefärbt (B).

# 6.2 Analyse von CD25 als Zielprotein der ART auf IL-2abhängigen Zelllinien

Nachdem die IL-2-Rezeptoruntereinheit CD25 als prominentes ART-Zielprotein auf der murinen YAC-1 Lymphomzelllinie identifiziert worden war, stellte sich die Frage ob die Funktion von CD25 durch die ADP-Ribosylierung beeinflusst wird. Für diese Untersuchungen wurde die Zytotoxische T-Lymphozyten Zelllinie CTLL-2 gewählt. Diese Zellen proliferieren, anders als YAC-1 Zellen, streng Interleukin-2 abhängig. Da diese Zellen keine oder nur wenig endogene ART-Aktivität aufzeigen, wurden sie stabil mit ART2.2 transfiziert. Als Assay für den Nachweis der IL-2 induzierten Aktivierung des IL-2-Rezeptors wurde die Analyse der IL-2 induzierten Phosphorylierung von STAT5 gewählt. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von STAT5 durch eine ADP-Ribosylierung der Zelloberflächenproteine beeinflusst wird. In diesem Abschnitt wird ferner der Frage nachgegangen, ob die humane ART1, ebenso wie ART2.2 in der Lage ist, das entsprechend speziesspezifische CD25 zu ADP-ribosylieren.

## 6.2.1 Transfektion von muriner ART2.2 und humaner ART1 in die IL-2-abhängigen Lymphomzelllinien CTLL-2 und Kit 225

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass murines CD25 in der Lymphom-Zelllinie YAC-1 und in primären Mauszellen durch die ART2 ADP-ribosyliert wird. Die folgenden Experimente beschäftigten sich mit der Eruierung von Unterschieden in dem ADP-Ribosylierungsverhalten verschiedener ARTs in Bezug auf CD25 in verschiedenen Spezies. Um untersuchen zu können, ob humanes CD25 ebenfalls ein Zielprotein der ADP-Ribosylierung ist und ob die humane ART1 in der Lage ist, CD25 zu ADP-ribosylieren, wurden murine CTLL-2 Leukämiezellen mit endogen hoher CD25 Expression, jedoch geringer ART-Aktivität (Abb. 15 A) mit muriner ART2.2 oder mit humaner ART1 stabil transfiziert. Humane Kit 225 Zellen wurden ferner mit humaner ART1 transfiziert (nicht dargestellt). Stabile Transfektanten wurden durch Selektion mit G418 hergestellt. Abb. 15 B und C zeigt die Ergebnisse von FACS Analysen der ART2 Expression und ART-Aktivität auf diesen Zellen.



Abb. 15 ART-Expression und Aktivität auf CTLL-2 Zellen nach Transfektion mit ART2.2 und ART1. CTLL-2 Leukämiezellen wurden vor (A) bzw. 20 Tage nach Transfektion mit muriner ART2.2 (B) oder humaner ART1 (C) mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD25 (panel 1), ART2.2 (panel 2 und 4), ART1 (panel 6) (schattiertes Histogramm) oder Fluorochrom-gekoppelter Isotypkontroll-Antikörper (gepunktete Linie) inkubiert. ART-Aktivität wurde, wie in Abb. 7 beschrieben, durch Anfärbung mit Fluorochrom-konjugiertem 1G4 Antikörper nach Inkubation mit etheno-NAD bestimmt (panels 3, 5, 7).

# 6.2.2 ADP-Ribosylierung von murinem und humanem CD25 durch die ART2.2 und ART1

Um die ADP-Ribosylierung von CD25 in den transfizierten Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit radioaktivem NAD inkubiert und die ADP-Ribosylierung vor und nach Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern analog zu Abb. 13 analysiert. Wie in Abb. 16 A und B zu sehen ist, sind die Muster der durch Maus ART2 und humane ART1 ADP-ribosylierten Proteine in den murinen CTLL-2 Zellen sehr ähnlich. Es finden sich prominente

Banden bei 90, 80, 55 und 40 kDa. Die markierte Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa ist offensichtlich das murine CD25, da sie mit einem Antikörper gegen CD25 präzipitiert wird (Spur 4) und nach der Immunpräzipitation in dem Zelllysat nicht mehr sichtbar ist (Spur 2). CD25 stellt in dieser Zelllinie offensichtlich auch ein Hauptzielprotein dar.

ADP-Ribosylierung in einer murinen Zelllinie Neben der wurde das ADP-Ribosylierungsmuster auf der humanen Zelllinie Kit 225 untersucht. Der radioaktive Nachweis ADP-ribosylierter Proteine erfolgte bei Abb. 16 C methodisch wie bei den vorherigen Experimenten. Es ist zu erkennen, dass das Bandenmuster bei dieser Zelllinie anders ist als bei den CTLL-2, oder YAC-1 Zellen. Im Vergleich zu primären Mauszellen (Abb. 14) lässt sich jedoch sagen, dass auch hier wenig prominente Banden vorhanden sind. Es finden sich fünf prominente Banden bei 92, 52, 45, 40 und 32 kDa. Die Bande bei 52 kDa entspricht offensichtlich dem humanen CD25 da sie durch Immunpräzipitation mit dem antihuman CD25 Antikörper fast vollständig präzipitiert wird (vergleiche Abb. 16 C Spuren 1, 2 und 4). Humanes CD25 stellt in dieser Zelllinie offensichtlich ebenfalls ein Hauptzielprotein dar.



Abb. 16 Darstellung der ADP-Ribosylierung von murinem CD25 und humanem CD25 auf ART-transfizierten CTLL-2 und Kit 225 Zellen. Zellinien mit stabil transfizierter ART2 (A, CTLL-2 ART2) oder ART1 (B, CTLL-2 ART1, C, Kit 225 ART1) wurden mit radioaktivem NAD inkubiert,

gewaschen und fraktioniert lysiert. Die Gesamtzelllysate (GZL, 1) wurden dann anschließend mit Serum vorgeklärt (Spur 3) und dann mit, an Protein-G-Sepharose gekoppelten, anti speziesspezifischem CD25-Antikörpern drei mal aufeinander folgend immunpräzipitiert (IP 4, 5, 6). Das anschließende Gesamtzelllysat wurde ebenfalls kollektiert (GZL, 2). Die entsprechend entnommen Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF Membran geblottet und durch Autoradiographie ausgewertet (obere Bilderzeile). Zur Kontrolle der Geltaschenbeladung wurde ebenfalls auf eine Nitrocellulose Membran geblottet, welche per Silberfärbung ausgewertet wurde (untere Bilderzeile).

## 6.2.3 Hemmung der IL-2 induzierten STAT5-Phosphorylierung durch ADP-Ribosylierung von Zellmembranproteinen

Um die Frage, ob die ADP-Ribosylierung von CD25 die IL-2-Rezeptoraktivierung beeinflusst, näher untersuchen zu können, wurde eine Zelllinie verwendet, die einen funktionsfähigen IL-2-Rezeptor besitzt. Die CTLL-2 Zelllinie (CTLL-2 WT) besitzt so einen Rezeptor und zeigt darüber hinaus ein striktes IL-2-abhängiges Wachstum. Bei Ausbleiben des IL-2-Stimulus gehen die Zellen in Apoptose. Diese Zellen wurden mit ART2.2 stabil transfiziert (CTLL-2 ART2) (siehe dazu Kapitel 6.2.1). Die ART2.2-Expression vor und nach Transfektion ist in Abb. 17 Panel 1 zu sehen. Nun war es möglich, die Aktivierung des IL-2-Rezeptors durch IL-2 in der gleichen Zelllinie mit und ohne ART2.2 in Abhängigkeit von NAD zu untersuchen. Eine Methode dies zu untersuchen ist es, die Aktivierung von Elementen der Signaltransduktionskaskade des Rezeptors zu messen. Einer dieser Elemente ist der Transkriptionsfaktor STAT5 (Gaffen 2001). Dieser Faktor wird nach Bindung von IL-2 an den IL-2-Rezeptorkomplex unter anderem an dem Tyrosinrest 694 phosphoryliert. Er bildet dann Homo- und Heterodimere mit den Isoformen STAT5 A oder B und transloziert in den Zellkern. Für die Detektion der Aktivierung des Transkriptionsfaktors wurde ein Antikörper benutzt der spezifisch an Y694-phosphoryliertes STAT5 bindet (Siehe dazu Methoden-Kapitel 5.1.3).

Die STAT5- Phosphorylierung wurde zunächst nach vierstündigem IL-2-Entzug auf die erneute Gabe von IL-2 hin untersucht (Panel 2). Das basale Niveau der STAT5-Phosphorylierung nach vier-stündigem IL-2-Entzug ist durch die dünne Linie gekennzeichnet. Annähernd in allen Zellen war 15 Minuten nach IL-2-Gabe STAT5 verstärkt phosphoryliert (verstärkte Linie). Um einen möglichen Effekt von NAD, bzw. der ADP-Ribosylierung von Membranproteinen auf die basale STAT5-Phosphorylierung zu untersuchen, wurden untransfizierte und ART2-transfizierte Zellen für 15 Minuten zunächst in Abwesenheit von IL-2 mit NAD inkubiert (Panel 3, schattierte Histogramme). Die Ergebnisse zeigen, dass NAD keinen bzw. in ART2 transfizierten Zellen allenfalls einen minimal stimulierenden Effekt auf die basale STAT5-Phosphorylierung hat.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die ADP-Ribosylierung von Membranproteinen die IL-2-abhängige Phosphorylierung von STAT5 beeinflusst. Dazu wurden Zellen zuerst mit NAD und dann mit IL-2 inkubiert (Panel 4, schattiertes Histogramm). Das Ergebnis zeigt, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors bei den ART2.2 transfizierten Zellen durch die ADP-Ribosylierung im Vergleich zu den ausschließlich mit IL-2 stimulieren Zellen deutlich

geringer ausfällt (Abb. 17, Panel 4). Bei untransfizierten Zellen kommt es unter diesen Bedingungen zu keiner oder allenfalls einer nur minimalen Blockade der STAT5 Phosphorylierung.

Um den Einfluss der ART2.2-Aktivität auf den IL-2-Rezeptor und dessen Signaltransduktion weiter nachweisen zu können, wurde in einem weiteren Ansatz vor der Behandlung mit NAD ein ART2.2-blockierender Einzeldomänen-Antikörper (VHH s+16a) zugegeben (Koch-Nolte, Reyelt et al. 2007). Der Antikörper ist offensichtlich in der Lage, die hemmende Wirkung der ADP-Ribosylierung auf den IL-2-Rezeptor bei ART2.2-exprimierenden Zellen aufzuheben (Vergleiche Abb. 17 B, Panels 4 und 5). Bei untransfizierten Zellen hingegen, hat die Zugabe des Antikörpers keinen erkennbaren Einfluss auf die STAT5-Phosphorylierung (Vergleiche Abb. 17 A, Panels 4 und 5). Fazit ist, dass die NAD-abhängige ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen bei ART2.2-transfizierten Zellen einen Einfluss auf die anschließende IL-2-Stimulation hat. Es ist denkbar, dass dieses auf die ADP-Ribosylierung der Alpha-Untereinheit des IL-2-Rezeptors selbst zurückzuführen ist.



Abb. 17 Einfluss der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen auf die IL-2 induzierte STAT5-Phosphorylierung in CTLL-2 Lymphomzellen. Untransfizierte (A) und ART2.2-transfizierte (B) CTLL-2 Zellen wurden mehrfach gewaschen und dann für 4 Stunden unter Entzug von IL-2 vorinkubiert. Die Zelloberflächenexpression von ART2 wurde mittels FACS-Analyse an unbehandelten Zellen überprüft (Panel 1). Aliquots der Zellen wurden für 15 Minuten bei 37 °C in Anund Abwesenheit von IL-2 (20 U/ml) inkubiert (Panels 2-5). Das Ausmaß der STAT5-Phosphorylierung wurde dann mit Hilfe eines Fluorochrom-konjugierten Anti-Phosho-STAT5 Antikörper an fixierten und permeabilisierten Zellen untersucht (durchgezogene verstärkte Linie: mit IL-2 Behandlung (20 U/ml), durchgezogene dünne Linie: ohne IL-2 Behandlung, gestrichelte Linie: Isotypkontrolle) (Panels 2-5). Ein Aliquot der Zellen wurde für 15 min bei 37 °C mit NAD (50  $\mu$ M) ohne IL-2 inkubiert (Panel 3, schattiertes Histogramm). Weitere Aliquots der Zellen wurden sequentiell für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert mit: NAD und IL-2 (Panel 4, schattiertes Histogramm), bzw. mit einer ART2-inhibierenden VHH (10  $\mu$ g), NAD und IL-2 (Panel 5, schattiertes Histogramm).

# 6.3 Klonierung und zielgerichtete Mutagenese von Argininen in murinem und humanem CD25 zur Identifikation der ADP-Ribosylierungsstelle

In diesem Kapitel werden Experimente zur Identifizierung der ADP-Ribosylierungsstellen in murinem und humanem CD25 vorgestellt. Zunächst wurden dazu die cDNAs für murines und humanes CD25 kloniert und transient in HEK-T Zellen zusammen mit ART2 kotransfiziert. Mittels radioaktivem ADP-Ribosylierungs-Assay wurde untersucht, inwiefern sich die beiden Varianten auch in HEK-T Zellen ADP-ribosylieren lassen. Die potentiellen Arginine wurden anhand eines Alignments von muriner und humaner CD25 dargestellt. Schließlich wurde die Auswirkung der zielgerichteten Mutagenese individueller Arginine auf die ADP-Ribosylierung in transfizierten HEK-T Zellen untersucht. Die Ergebnisse deuten an, dass mehr als eine Aminosäure an CD25 ADP-ribosyliert wird.

### 6.3.1 Klonierung des murinen und humanen CD25

Nachdem in den vorherigen Kapiteln festgestellt wurde, dass murines wie humanes CD25 Hauptziele auf Lymphomzellen sind, wurde es für weitere Untersuchungen notwendig, die kodierenden cDNAs zu klonieren. Für die Klonierung des Maus CD25 wurden aus YAC-1 Zellen gesamt-RNA isoliert (Abb. 18 A) und diese durch reverse Transkription zu komplementärer DNA umgeschrieben. Aus der so gewonnenen cDNA wurde dann mit speziellen Primern die kodierende Sequenz per PCR amplifiziert. (Abb. 18 B). Die Primer enthielten flankierend zu der codierenden Sequenz eine *Eco* RI Not I und Restriktionsendonukleasen-Erkennungssequenz. Es folgte der Doppelverdau der Inserts und der beiden eukaryotischen Zielvektoren pcDNA6 und pCMV SPORT mit Eco RI und Not I (Abb. 18 C), die T4-Ligase katalysierte Ligation von Insert und Expressionsvektoren. Der Ligationsansatz wurde in ultrakompetenten XL-10 Gold Zellen (Stratagene) transformiert und anschließend ausplattiert. Plasmide aus individuellen Kolonien wurden auf das Tragen des Plasmides mit dem richtigen Insert durch den o.g. Doppelrestriktionsverdau überprüft. Bei einer entsprechenden Fragmentlänge des Inserts von ca. 800 bp (Abb. 18 E und F) wurde das Insert sequenziert. Ein Plasmid mit bestätigter unveränderter mCD25 Nukleotidsequenz wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt.



Abb. 18 Klonierung von Maus CD25 aus YAC-1 Zellen A) Zur Klonierung von Maus CD25 wurde die Gesamt-RNA aus YAC-1 Zellen isoliert und zur Kontrolle elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei sind die beiden ribosomalen Ribonukleotidsäuren 28 S rRNA und 18 S rRNA sowie etwas genomische zu erkennen. B) Mittels zweier Primer DNA (gDNA) mit eingebauten Restriktionsschnittstellsequenzen Eco RI am 5' und Not I am 3' Ende wurde aus der Gesamt RNA die gewünschte Maus CD25 codierende Sequenz amplifiziert. Dies wurde mittels einer Gradienten-PCR durchgeführt mit einer Annealing-Temperatur zwischen 40 °C und 65 °C. Als Positivkontrolle der PCR dienten Primer zur Amplifikation von eIF2a bei einer Annealing-Temperatur von 56,9 °C. C) Nachdem das gewünschte ca. 800 bp große CD25 Amplifikat aus dem Agarose Gel ausgeschnitten und aufgereinigt worden war, wurde es (3), genauso wie die zwei Vektoren pCMV SPORT (2) und pcDNA6 (1), mit Eco RI und Not I verdaut. Dabei wurden die Vektoren bei der anschließenden Gelelektrophorese von ihren herausgeschnittenen Inserts getrennt und aus dem Gel aufgereinigt (C, Stern). D) Zur Kontrolle der Reinheit und zur Abschätzung der Stoffmengenverhältnisse für die Ligation wurden die zwei Vektoren pcDNA6 (1), sowie pCMV SPORT (2) und das Insert (3) abermals elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Ligation in einem Stoffmengenverhältnis von 3:1 zugunsten des Inserts wurden die Vektoren in E. coli transformiert und ausplattiert. Aus den zwölf ausgewählten Bakterienklon-Kolonien pro Ligation wurden Vorkulturen für eine DNA Plasmidpräparation angesetzt. E) Der Eco RI / Not I Doppelverdau der Plasmidpräparation ergab bei der pcDNA6 / CD25 Ligation, dass neun der zwölf ausgewählten Klone CD25 als Insert im Vektor trugen (2, 3) und zwei (1) das Insert des parentalen Vektors (a). F) Bei der Ligation pCMV SPORT / CD25 enthielten elf der zwölf verdauten Plasmidpräparationen das richtige Insert (1, 2, 3) und einer (nicht im Ausschnitt) besaß das alte Insert aus dem parentalen Vektor (b)

Für die Klonierung von humanem CD25 wurde als Quelle Blut aus gesunden Spendern gewählt, da eine humane Zelllinie mit Expression des IL-2R $\alpha$  zu der Zeit nicht zur Verfügung stand. Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurde die mononukleäre Fraktion, welche Monozyten und Lymphozyten enthielt, isoliert. Da naive T-Zellen kein CD25 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, war der Anteil an CD25<sup>+</sup> Zellen nach der Blutentnahme

verschwindend gering. (Abb. 19, Panel 1). Die Lymphozyten eines Spenders wurden deshalb mit dem Lektin Concanavalin A (ConA) stimuliert so, dass eine polyklonale Proliferation der T-Zellen mit entsprechender Hochregulation der alpha-Untereinheit des IL-2 Rezeptors (Abb. 19, Panel 6) stimuliert wurde (Letwin and Quimby 1987). Wie an den Ergebnissen zu sehen ist, stieg der Anteil an CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> T-Helferzellen von 2,2 % am ersten Tag auf fast 23 % am dritten Tag nach Stimulation mit ConA (Abb. 19, Panel 4 und 6).



Abb. 19 FACS-Analyse der durch Concanavalin A-Stimulation induzierten Expression von CD25 auf humanen CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen. Die mononukleäre Zellfraktion (Monozyten und Lymphozyten) aus dem Vollblut zweier gesunder Spender wurden für drei Tage in Kultur genommen wobei ein Aliquot unstimuliert blieb und ein zweites mit Concanavalin A (ConA), einem mitogen wirksamen Lektin inkubiert wurde. Die FACS-Analyse direkt nach der Entnahme (Tag 1) mit anti-CD4 und anti-CD25 Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern ergab bei beiden Proben einen Anteil von CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> Zellen von ca. 2 % der Gesamtzellen. Diese Zellgruppe stieg bis zum dritten Tag (Tag 3) bei den Concanavalin A stimulierten Zellen auf 23 % der Gesamtzellen an, wohingegen sie bei der unstimulierten Kontrolle unter 2 % verblieb.

Die nun CD25-exprimierenden humanen Zellen, konnten für die Klonierung genutzt werden. Dabei wurde nach der gleichen Strategie wie für die Klonierung von murinem CD25 vorgegangen, wobei diesmal nur in den Expressionsvektor pCMV SPORT kloniert wurde.



Abb. 20 Klonierung von humanen CD25 aus Concanavalin A stimulierten mononukleären Zellen. A) Gewinnung von gesamt-RNA aus mononukleären Zellen, die drei Tage nach der Concanavalin A Stimulation eine erhöhte CD25<sup>+</sup> Expression aufwiesen. Zu sehen sind auf der gelelektrophoretischen Trennung die 28 S und 18 S ribosomale RNA (rRNA). B) Die RNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase und randomisierten Hexameren in cDNA umgeschrieben, woraus dann die CD25 Sequenz mit zwei Primern, die jeweils eine Restriktionsschnittstellsequenz besaßen (Eco RI und Not I), mit einer Gradienten-PCR amplifiziert werden konnte. Es wurden jeweils die ca. 800 bp großen Banden mit einer Annealing-Temperatur von 54 und 59,9 °C aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. C) Anschließend folgte der Verdau der aufgereinigten Inserts (1) und des Zielvektors pCMV SPORT (2). Nach dem Eco RI / Not I Doppelverdau wurden die Produkte elektrophoretisch aufgetrennt und ausgeschnitten (Stern). D) Ein Kontrollgel half bei der Stoffmengenbestimmung (Vektor pCMV SPORT, V und Insert CD25, I) E) Die Ligation erfolgte bei einem Stoffmengenverhältnis von 3 Teilen Insert zu einem Teil Vektor. Anschließend wurden E. coli mit den Ligationsprodukten transformiert und auf LB Agar Platten ausplattiert. Es wurden zwölf Bakterienklon-Kolonien ausgewählt, kultiviert und einer DNA-Plasmidpräparation unterzogen. Der Verdau dieser Plasmide ergab, dass bei acht (Ausschnitt 2, 3) der zwölf Klone ein Fragment mit der richtigen Größe (hCD25, ca. 800 bp) zu sehen war.

### 6.3.2 ADP-Ribosylierung auf ART transient transfizierten HEK-T Zellen

Die Funktionstüchtigkeit der klonierten Expressionsmutante wurde durch transiente Transfektion in HEK-T Zellen, die endogen weder CD25 noch Zelloberflächen ART-Aktivität exprimieren, getestet (Abb. 21). In CD25 und ART2 kotransfizierten Zellen wurde ferner getestet, ob ART2 in diesem Zellsystem CD25 ADP-ribosylieren kann. Die Ergebnisse der FACS-Analyse bestätigen die erfolgreiche Expression von CD25 auf der Zelloberfläche von transfizierten Zellen (Abb. 21 A). In der Autoradiographie (C) nach radioaktiver ADP-Ribosylierung ist zu sehen, dass untransfizierte HEK-T Zellen keine Radioaktivität inkorporieren. Damit wurde die Abwesenheit von endogener Zelloberflächen-ADP-Ribosylierungsfähigkeit bestätigt. Wie zu erwarten, findet sich bei transient mit CD25 transfizierten Zellen ebenfalls keine Inkorporation von Radioaktivität. Erst wenn die mit ART2.2 transfizierten Zellen mit radioaktivem NAD inkubiert werden, erscheinen radioaktiv

markierte Banden (C, GZL, Spur 3). Das Muster an ADP-ribosylierten Proteinen besteht aus deutlichen Banden um 140, 90 und 52 kDa sowie multiplen, schwächeren Banden zwischen 40 und 185 kDa. Nach Kotransfektion von CD25 und ART2.2 erscheint eine starke zusätzliche, breite Bande um 52 kDa sowie mehrere zusätzliche schwächere Banden im Bereich von 31 bis 15 kDa (C, GZL, Spur 4). In der Immunpräzipitation mit anti-CD25 mAbs erscheint ebenfalls eine Bande mit dem erwarteten MW von CD25 (52 kDa) (C, IP, Spur 4). Wie in der Silberfärbung unter B zu sehen ist, wurden bei den Gesamtzelllysaten gleiche Proteinmengen auf die einzelnen Spuren geladen.



Abb. 21 ADP-Ribosylierung von murinem CD25 nach transienter Kotransfektion mit ART2.2 in HEK-T Zellen. HEK-T Zellen wurden entweder untransfiziert, oder mit CD25 beziehungsweise ART2.2 transient transfiziert. Eine weitere Zellgruppe wurde mit CD25 und ART2.2 transient kotransfiziert. Der Erfolg der Transfektion wurde mittels FACS-Analyse (A) eruiert. Die Zellen wurden mit radioaktiv markiertem NAD inkubiert, gewaschen und anschließend fraktioniert lysiert. Die Proteine in einem Aliquot des Gesamtzelllysats (GZL) wurden per SDS-PAGE größenfraktioniert und aus dem Rest des Lysates wurde CD25 per Immunpräzipitation herauspräzipitiert. Die Proteine im Präzipitat wurden ebenfalls größenfraktioniert. Die Membranen des Westernblots wurden zum einen einer Silberfärbung unterzogen (B), um die Beladung der Spuren abschätzen zu können, zum anderen wurde mittels Autoradiographie (C) die inkorporierte Radioaktivität sichtbar gemacht.

In einem weiteren Experiment wurde der Frage nach der ADP-Ribosylierung von humanem CD25 in humanen HEK-T Zell-Transfektanten nachgegangen. Wie in Kapitel 6.2.2 beschrieben wird murines CD25 in murinen Zelllinien (CTLL-2 und YAC-1) durch die murine ART2.2 (Abb. 16 A und Abb. 13 A) und durch die humane ART1 (Abb. 16 B) effizient ADP-ribosyliert. Darüber hinaus wurde die gute ADP-Ribosylierung von humanem CD25 durch die humane ART1 in der humanen Zelllinie Kit 225 gezeigt (Abb. 16 C). Nun wurde der Frage nachgegangen, ob und inwiefern ART2.2 in einer humanen Zelllinie die beiden CD25-Formen (human und murin) ADP-ribosyliert. HEK-T Zellen wurden dafür mit gleichen Mengen an CD25-cDNA vom Menschen und von der Maus transient mit ART2.2 kotransfiziert. Zur Kontrolle wurden parallel Zellen allein mit ART2.2 transfiziert (mock). Die Expression der ART2.2 wurde in allen drei Gruppen mittels FACS-Analyse bestimmt (Abb. 22 A, durchgezogene Linie in Panels 1-3) und im Vergleich zu untransfizierten Zellen gesetzt (unterbrochene Linie). Die Ergebnisse zeigen, dass alle Transfektanten ART2.2 mäßig stark exprimieren. Die ART2.2 Expression der mock-Gruppe ist dabei etwas höher als die der kotransfizierten Zellen. Die beiden CD25-Formen werden ebenfalls exprimiert, wobei die MFI der mCD25 jedoch wesentlich höher als die von hCD25 ist.

Das Ergebnis des radioaktiven ADP-Ribosylierungs-Assays zeigt in der mock-Zellgruppe das bereits bekannte ADP-Ribosylierungsmuster von ART2.2 transfizierten HEK-T Zellen (B, Spur 1) aus mehreren unscharf begrenzten Banden (vergleiche Abb. 21). In den CD25kotransfizierten Zellen fällt jeweils eine zusätzliche Bande in Höhe von 52 kDa auf. Durch Immunpräzipitation mit einem mAb gegen mCD25 beziehungsweise hCD25 lies sich eine Bande dieser Größe jeweils spezifisch präzipitieren. Die Bande zeigt eine wesentlich höhere Intensität bei den mit human CD25 kotransfizierten Zellen als bei denen mit der murinen Form. Offensichtlich wird, bei gleicher Menge an eingesetzter cDNA und adäquater Zelloberflächen-Expression, das humane CD25 in HEK-T Zellen wesentlich besser durch die ART2.2 ADP-ribosyliert als die murine Variante



Nachweis der ADP-Ribosylierung von hCD25 und mCD25 auf mART2.2 Abb. 22 kotransfizierten HEK-T Zellen. HEK-T Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für ART2.2 alleine (mock) oder für ART2.2 und hCD25 bzw. mCD25 transient (ko)-transfiziert. Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion geerntet. (A) Die Zelloberflächenexpression von ART2, hCD25, und mCD25 wurde an einem Aliquot der Zellsuspension per FACS überprüft. Dabei wurden untransfizierte (gestricheltes Histogramm) und transfizierte Zellen (durchgezogenes Histogramm) mit einem spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper (siehe untere Panele) für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. (B und C) Die restlichen Zellen (6 x 10<sup>6</sup>) wurden für 10 Minuten bei RT mit 1 µM radioaktiv markiertem NAD inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei RT in 1 % Triton X-100 lysiert. Das Gesamtzelllysat (GZL) wurde einer sequentiellen Präzipitation mit an Protein-G-immobilisiertem Rattenimmunglobulin (Vorklärung = VK) und CD25-spezifischen Antikörpern unterzogen (Immunpräzipitation = IP). Proteine in dem GZL vor und nach IP (je 6 x  $10^5$  Zelläquivalente/Spur) (**B**) bzw. in den Immunpräzipitaten (IP) und Vorklärungen (VK) (**C**) wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und anschließend per Westernblot auf eine PVDF Membran transferiert. Inkorporierte Aktivität wurde mittels Autoradiographie durch Exposition eines Röntgenfilmes für 4 Tage bei -80 °C detektiert. Spur 1 = GZL und IP aus ART2.2-transfizierten Zellen. Spur 2 = GZL, IP und VK aus ART2.2 + hCD25 kotransfizierten Zellen. Spur 3 = GZL, IP und VK aus ART2.2 + mCD25 kotransfizierten Zellen

### 6.3.3 Bestimmung der Arginine in der Sekundärstruktur von CD25

In der nächsten Versuchsreihe wurde der Frage nach der Lokalisation der ADP-Ribosylierungsstelle von CD25 nachgegangen. Wie bekannt war, sind murine ART2.2 und humane ART1 argininspezifische ADP-Ribosyltransferasen (Koch-Nolte, Petersen et al. 1996; Glowacki, Braren et al. 2002). Es musste somit jeweils mindestens ein Arginin in den extrazellulären Domänen von murinem und humanem CD25 eine Zielaminosäure sein. Bei einem Alignment der humanen, murinen und ratten-Sequenzen, welches mit T-COFFEE erstellt wurde (Notredame, Higgins et al. 2000), wurden konservierte und nicht konservierte Arginine bestimmt. Diese sind in Abb. 23 entsprechend mit einem roten, beziehungsweise blauen R gekennzeichnet.

hNr	-21	1		3	32 3536
2erj		<mark>1</mark>	EEEE	EEE <mark>2</mark> 3	EEE
hCD25	MDSYLLMWGLLTH	FIMVPGCQAEL <mark>C</mark> DDD	PPEIPHATFKAMA	kegtmln <mark>c</mark> e <mark>c</mark> f	RGF <mark>RR</mark> IKS
mCD25	MEPRLLMLGFLSI	LTIVPSCRAEL <mark>C</mark> LYD	PPEVP <mark>NAT</mark> FKALS	K <mark>NGT</mark> ILN <mark>C</mark> ECF	RGF <mark>RR</mark> LKE
rCD25	MEPHLLMLGFLS	TIVPGCWAEL <mark>C</mark> LYD	PPEVP <mark>NAT</mark> FKALS	K <mark>NGT</mark> ILN <mark>C</mark> ECF	RGF <mark>RR</mark> LNE
	*:. *** *:*:	: :**.* **** *	***:*:*****	**:**:*****	****::.
mNr	-21	1		3	32 3536
hNr	40		67	83	
2ERJ	EE <mark>4</mark> E	EE <mark>2</mark> 3EE			
hCD25	GSLYML <mark>C</mark> TG <mark>NSS</mark> H	isswdnq <mark>c</mark> q <mark>c</mark> tssat:	R <mark>NTT</mark> KQVTPQPEE(	)KE <mark>R</mark> KTT-EMQS	SPMQPVDQA
mCD25	-LVYMR <mark>C</mark> LGNS	WSSN <mark>C</mark> Q <mark>C</mark> TSNSH	DKS <mark>R</mark> KQVTAQLEH(	OKEQQTTTDMQF	PTQSMHQE
rCD25	-LVYMA <mark>C</mark> LGNS	WSNN <mark>C</mark> Q <mark>C</mark> TSNSH	DNS <mark>R</mark> EQVTPQPEG(	QKEQQTT-DTQF	STQSVYQE
	:** * ***	*:****.:	:: :***.* *	***::** : *.	. *.: *
mNr	40 44		65		
hNr	99 105	117	136	L40	155
2erj	– <mark>4</mark>	EE	EEEEE <mark>5</mark> EEEB	C EEE <mark>1</mark> EE	EEE
hCD25	SLPGH <mark>C</mark> REPPPWI	ENEATERIYHFVVGQ	MVYYQ <mark>C</mark> VQGY <mark>R</mark> ALI	irgpaesv <mark>c</mark> kmi	HGKT <mark>R</mark> WTQ
mCD25	<mark>nlt</mark> Gh <mark>C</mark> reppwi	(HEDSK <mark>R</mark> IYHFVEGQ	SVHYE <mark>C</mark> IPGYKAL(	ORGPAISI <mark>C</mark> KMF	C <mark>C</mark> GKTGWTQ
rCD25	NLAGH <mark>C</mark> REPPPW	RHEDTK <mark>R</mark> IYHFVEGQ	IVLYT <mark>C</mark> IQGYKAL(	) <mark>r</mark> gpaisi <mark>c</mark> ktv	7 <mark>C</mark> GEIRWTH
	.*.*******	.:* ::****** **	* * *: **:**	**** *:**	*: **:
mNr	95 <b>101</b>	113	-	L36	
hNr	159	18	5		
2erj	EE <mark>5</mark> E				
hCD25	PQLI <mark>C</mark> TGEMETS(	)FPGEEKPQASPEG <mark>R</mark>	PESETSCLVTT <mark>T</mark> DI	7QIQ <mark>T</mark> EMAA <mark>T</mark> ME	TSIFT <mark>T</mark> EY
mCD25	PQLT <mark>C</mark> VDEREHH	RFLASEESQGSR <mark>NSS</mark>	PESETSCPITT <mark>T</mark> DI	PQP <mark>T</mark> ETTAMTE	TFVLTMEY
rCD25	PQLT <mark>C</mark> VDEKEHH(	QFLASEESQGS <mark>R</mark> NSF	PESEASCPTPN <mark>T</mark> DI	FSQL <mark>T</mark> EATT <mark>T</mark> ME	TFVFTKEY
	*** * * *	:**:.*.* :.	********	* ** :: *	* ::* **
mNr	155 163 16	57 178			
hNr	219				
hCD25	QVAVAGCVFLLIS	SVLLLSGLTWQRRQR	KSRRTI		
mCD25	KVAVASCLFLLIS	SILLLSGLTWQHRWR	KSRRTI		
rCD25	OVAVASCIFLLLS		VCDDTT		
	2	SILLESGF"IWQHRWR.	KOKKII		
	:****.*:***:	\$1LLLSGF"TWQHRWR *:*****:***:* *	*****		

Abb. 23 Vergleich der CD25-Aminosäurenseqenzen aus Mensch (hCD25), Maus (mCD25) und Ratte (rCD25). Das Einbuchstabencode-Alignment wurde mit T-COFFEE erstellt (Notredame, Higgins et al. 2000). Das Leaderpeptid (lila Buchstaben -21 bis 1), das für den Transport des Moleküls ins rauhe endoplasmatische Retikulum benötigt wird sowie die Transmembrandomäne des Rezeptors sind lila. Cysteinreste sind gelb unterlegt und mit der entsprechenden Nummer der Disulfidbrücken, die sie ausbilden, angegeben. Die  $\beta$ -Faltblätter sind über der entsprechenden Sequenz, soweit durch die 3D-Struktur bekannt, angegeben (Symbol: E). Konservierte Arginine sind rot dargestellt, nicht konservierte blau. Ihre entsprechenden Aminosäurennummern werden für die Humansequenz oben (hNr) und für die Maussequenz unten (mNr) angegeben. Grün unterlegt sind mögliche Glykosylierungsstellen. Die Strukturmerkmale  $\beta$ -Faltblätter und Disulfidbrücken sind anhand der Kristallstruktur von humanen CD25 dargestellt (Stauber, Debler et al. 2006, PDB ID code 2ERJ). In der 3D-Struktur nicht sichtbare Bereiche sind mit dem Symbol "-" gekennzeichnet.

Im nächsten Schritt wurden Arginine, welche als potentielle ADP-Ribosylierungsziele der ART2 dienen, mutiert. Die Aminosäure, welche für den Austausch vorgesehen wurde, sollte möglichst große Ähnlichkeit zu der Ursprünglichen haben, um an der Sekundär- und Tertiärstruktur des Moleküls möglichst wenig zu ändern. Gewählt wurde Lysin, aufgrund des langen Aminosäurerestes von vier unverzweigten Kohlenstoffatomen und der positiven Ladung an der Aminogruppe. Es ist somit der konservativste Aminosäurenaustausch, der möglich war. Die Mutation geschah mittels zielgerichteter Mutagenese anhand vorher generierter Mutageneseprimer. Die Plasmide wurden anschließend zur Erfolgskontrolle sequenziert (Abb. 24).



Abb. 24 Ausschnitt aus der Sequenzierung des Maus CD25 Konstruktes bei der die Aminosäure 35, Arginin zu Lysin mutiert wurde. Im Maus CD25 Insert des Vektors pCMV Sport wurde die Aminosäure 35, Arginin (A, blaues Rechteck) zu Lysin per zielgerichteter Mutagenese mutiert (B, blaues Rechteck). Anschließend wurden Bakterien mit dem Konstrukt transformiert, lysiert und einer Plasmid-DNA-Präparation unterzogen. Die Basenfolge des mutierten CD25 Inserts wurde anschließend zur Kontrolle sequenziert. Die Aminosäurennummer ist unten angegeben.

#### 6.3.4 ADP-Ribosylierung der konservierten Arginine in murinem CD25

Da sowohl murines als auch humanes CD25 Zielproteine der ADP-Ribosylierung sind, lag es nahe anzunehmen, dass beide an einem konservierten Argininrest modifiziert werden. Deshalb erfolgte in einer ersten Serie die zielgerichtete Mutagenese sämtlicher konservierter Arginine in CD25 zu Lysin. Da in anderen ART Zielproteinen Doppelarginine als Targets der ADP-Ribosylierung beschrieben waren (Paone, Wada et al. 2002; Adriouch, Bannas et al. 2007), wurde in dieser Serie ferner das Doppelarginin R35, 36 zu KK mutiert. (Dieses Doppelarginin liegt im Bereich der Bindungsstelle von humanem CD25 für Interleukin-2, die Mutation führt zum Verlust der IL-2 Bindung (Robb, Rusk et al. 1988)).

HEK-T Zellen wurden entweder allein mit muriner ART2.2 oder zusammen mit ART2.2 und einer CD25-Mutationsvariante kotransfiziert. Der Transfektionserfolg wurde mittels FACS-Analyse ermittelt (Abb. 25 A). Dabei wird in dem Histogramm jeweils die

Zelloberflächenexpression von CD25, beziehungsweise ART2.2 als verstärkte Linie im Vordergrund dargestellt. Zum Vergleich der Expression der jeweiligen Mutanten mit Wildtyp CD25 wurde letztere als schattiertes Histogramm in den Hintergrund gelegt. Ebenfalls dargstellt ist die MFI der nicht transfizierten HEK-T Zellen, welche mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert als Negativkontrolle dient (gestrichelte Linie). Die Ergebnisse zeigen, dass die Transfektion von ART2.2 und CD25 in sämtlichen Zellgruppen zu einer Zunahme der MFI führte. Dieses spricht für eine erfolgreiche Transfektion. Das Expressionsniveau der ART2.2 ist in sämtlichen Zellgruppen vergleichbar mit dem Niveau der ART2.2-Expression der mit CD25 Wildtyp kotransfizierten HEK-T Zellgruppe. Die CD25in Oberflächenexpression ist gekennzeichnet durch einen deutlichen Anstieg der MFI. Es zeigt sich eine leicht schwächere Expression von vier CD25-Mutanten (R36K, R101K, R113K und R136K) im Vergleich zu der Expression des Wildtyps (Vergleiche Abb. 25 A im unteren Panel die Verlagerung der verstärkten Linie in Relation zu dem schattierten Histogramm).

Nach der Transfektion wurde mittels radioaktivem Assay die ADP-Ribosylierung der CD25 Mutanten mit der des Wildtyps verglichen. Die Silberfärbung zeigt eine weitgehend gleichmäßige Beladung der Spuren mit Proteinen (Abb. 25 B). Die Autoradiographie bei den mit ART2.2 alleine transfizierten Zellen (mock) zeigt das bekannte Muster von ADPribosylierten Proteinen (Abb. 25 C GZL, erste Spur). Das Muster ist dabei vergleichbar mit dem der in Abb. 21 dargestellten Autoradiographie. Bei den mit ART2.2 und murinem CD25 Wildtyp kotransfizierten Zellen zeigt sich eine verstärkte Bande um 52 kDa (Abb. 25 C, GZL 2. Spur). Die Immunpräzipitationen mittels Antikörpern gegen CD25 zeigen jeweils eine entsprechende Bande bei 52 kDa sowie eine weniger intensive Bande um ca. 45 kDa (Abb. 25 C, IP). Es handelt sich somit um CD25. In den mit CD25 kotransfizierten Gesamtzelllysaten erscheinen ferner mehrere zusätzliche Banden bei Molekulargewichten von 15 bis 31 kDa, die möglicherweise Degradationsprodukte von CD25 darstellen. Die einzelnen CD25-Mutanten zeigen eine ähnlich starke Bandenschwärzung wie Wildtyp CD25. In keiner Spur zeigt sich eine deutliche Abnahme der Bandenintensität, die auf eine mangelnde ADP-Ribosylierung deuten könnte.



Abb. 25 Analyse der ADP-Ribosylierung von Wildtyp mCD25 und mCD25-Varianten mit Einzelsubstitutionen der konservierten Arginine. HEK-T Zellen wurden mit ART2.2 allein (mock), oder mit ART2.2 und CD25-Mutanten kotransfiziert. (A) 24 Stunden nach Transfektion wurde die Zelloberflächenexpression von ART2 und CD25 in einem Aliquot der Zellsuspension per FACS analysiert (gestrichelte Linie: untransfizierte Zellen, schattiertes Histogramm: Wildtyp, verstärkte durchgezogene Linie: die jeweils o.a. Mutante). (B, C) Die restlichen Zellen wurden für 10 Minuten bei RT mit radioaktivem NAD inkorporiert. Die Beladung der einzelnen Spuren mit Gesamtzelllysat wurde durch Silberfärbung überprüft (B). Die in den Proteinen inkorporierte Aktivität wurde wie in Abb. 22 mittels SDS-PAGE-Autoradiographie ermittelt (C). (D) Schematisches Diagramm der untersuchten mCD25 Mutanten (rot: konservierte Arginine, blau: nichtkonservierte Arginine).

### 6.3.5 ADP-Ribosylierung der nicht konservierten Arginine in murinem CD25

Nachdem die ADP-Ribosylierung der CD25-Moleküle nicht durch die Mutation einer einzelnen konservierten Arginin unterbunden werden konnte, folgte eine Serie von Mutanten in denen die nicht konservierten Arginine mutiert wurden. Ferner wurde eine Dreifachmutante der ersten drei Arginine erstellt (R32, 35, 36K).

Wie in dem vorherigen Experiment, ist in den FACS-Analysen (Abb. 26 A) eine vergleichbare Expression der ART2.2 in allen Transfektionsgruppen zu sehen. Es zeigen sich allenfalls minimale Abnahmen der CD25 Mutanten-Expression im Vergleich zum Wildtyp. Die Silberfärbung zeigt eine vergleichbare Ladung der SDS-PAGE mit Proteinen (Abb. 26 B). Der

radioaktive ADP-Ribosylierungs-Assay zeigt bei allen ART2-CD25-kotransfizierten HEK-T Zellen analog zur Abb. 25 eine Zunahme der Bande im 52 kDa-Bereich (Abb. 26 C, GZL). Eine entsprechende Bande findet sich ferner in allen Immupräzipitaten, mit Ausnahme der nur mit ART2 transfizierten Zellen (mock) (Abb. 26 C, IP). Allenfalls in drei Spuren zeigt sich ein leichter Abfall der Bandenintensität im Vergleich zu der Wildtypvariante (IP, R32, 35, 36K, R35, 36K, R163K). Bei der Doppel und Dreifachmutante fällt ferner eine leichte Abschwächung der niedermolekularen Banden im Gesamtzelllysat auf.

Da in den beiden Experimenten sämtliche Arginin-Mutanten des CD25 noch ADP-ribosyliert wurden, liegt die Vermutung nahe, dass mehr als ein Argininrest Ziel der ADP-Ribosylierung ist. Aufgrund der leichten Abschwächung in der Bandenintensität gegenüber dem Wildtyp kämen dafür am ehesten R35, R36 und R163 in Frage.



Abb. 26 Analyse der ADP-Ribosylierung von Wildtyp mCD25 und mCD25 Varianten mit Einzelsubstitutionen der nicht konservierten Arginine und Mehrfachsubstitutionen der ersten drei konservierten Arginine. HEK-T Zellen wurden mit ART2.2 alleine (mock), oder mit ART2.2 und den o.g. Mutanten kotransfiziert und wie in Abb. 25 auf Zelloberflächenexpression von ART2.2 und CD25 (A) sowie auf radioaktive Markierung von Proteinen im Gesamtzelllysat und in CD25-Immunpräzipitaten (C) analysiert. B) Silberfärbung der geladenen Gesamtzelllysatproteine D) Schematisches Diagramm der untersuchten Arginine (rot: konservierte Arginine blau: nicht konservierte Arginine).

# 6.3.6 ADP-Ribosylierung der konservierten Arginine in humanem CD25

Die Frage der ADP-Ribosylierungsstelle wurde ebenfalls im humanen System analysiert. Dazu wurden HEK-T Zellen mit humaner ART1 alleine oder zusammen mit humanem CD25-Konstrukten kotransfiziert. Die erstellten CD25 Arginin zu Lysin Mutanten waren in dieser Versuchsreihe alle konservierten Arginine, zusammen mit dem Doppelarginin R35, 36 und einer Mutante des nicht konservierten Arginins R185. Es folgte die ADP-Ribosylierung mittels <sup>32</sup>P-NAD und die Auftrennung der ADP-ribosylierten Proteine mittels Westernblot mit anschließender Autoradiographie. Die Analyse der Expression der Zelloberflächenexpression von ART1 und der CD25-Konstrukte erfolgte wie bisher mittels FACS-Assay (Abb. 27 A). Die Ergebnisse zeigen, dass alle transfizierten Zellgruppen eine vergleichbare ART1-Expression aufweisen. Die Expression der CD25-Mutanten ist ebenfalls fast identisch mit der des Wildtyps. Die Silberfärbung zeigt eine ähnliche Beladung mit Protein (Abb. 27 B). In der Autoradiographie der Gesamtproteine (C, GZL) erscheint eine prominente Bande bei 52 kDa, welche durch die Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen humanes CD25 als CD25 bestätigt wird (C, IP). Alle Mutanten zeigen eine deutliche Inkorporation von Radioaktivität. Allenfalls in zwei Spuren zeigt sich eine deutliche (R117K) bzw. leichte (R35, 36K) Abschwächung des Signals (C, GZL).

Darüber hinaus finden sich, wie bei den mit murinen CD25 transfizierten Zellen, in den Gesamtzelllysaten zusätzliche Banden im Bereich von 20 bis 31 kDa. Diese Banden werden durch die Immunpräzipitation nicht erfasst und könnten Degradationsprodukte des CD25 sein, die von dem zur Präzipitation eingesetzten Antikörper nicht erkannt werden. Bei dem Vergleich der Gesamtzelllysate aus nur mit ART2 transfizierten Zellen (mock) und ART2-CD25 kotransfizierten Zellen (Abb. 27 C, GZL) fällt ferner auf, dass die Inkorporation der CD25-Moleküle wesentlich markanter ist als die der restlichen Proteine auf der Zelllinie. Dieser Effekt ist mit dem der Transfektanten in Abb. 22 vergleichbar, in dem humanes CD25 ebenfalls sehr stark (durch die ART2.2) ADP-ribosyliert wurde.



Abb. 27 Analyse der ADP-Ribosylierung von Wildtyp hCD25 und hCD25 Varianten mit Einzelsubstitutionen der konservierten Arginine. HEK-T Zellen wurden mit ART1 alleine (mock), oder mit ART1 und den o.g. Mutanten kotransfiziert und wie in Abb. 25 auf Zelloberflächenexpression von ART1 und CD25 anhand monoklonaler Antikörper (A) sowie auf radioaktive Markierung von Proteinen im Gesamtzelllysat und in CD25-Immunpräzipitaten (C) analysiert. B) Silberfärbung der geladenen Gesamtzelllysatproteine. D) Schematisches Diagramm der untersuchten Arginine (rot: konservierte Arginine blau: nicht konservierte Arginine).
## 7. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit lenken und erweitern den Blick auf CD25 als Ziel von Zelloberflächen mono-ADP-Ribosyltransferasen. Die Diskussion der Ergebnisse folgt im Aufbau dem Ergebnisteil. Im ersten Teil werden die mit Hilfe massenspektrometrischer Verfahren identifizierten ART2-Zielproteine auf YAC-1 Lymphomzellen näher dargestellt. Es wird auf die Verwandtschaft dieser neuen Zielproteine mit bereits bekannten eingegangen. Des Weiteren werden Perspektiven für die Untersuchung der ADP-Ribosylierung von CD25 *ex vivo* besprochen. Der zweite Teil beschäftigt sich mit möglichen funktionellen Konsequenzen der CD25-ADP-Ribosylierung auf IL-2-vermittelte Effekte auf T-Zellen und Lymphomzellen. Im letzten Teil werden Erfolge und Probleme bei der Identifikation der ADP-Ribosylierungsstelle von CD25 dargestellt und Lösungsvorschläge besprochen. Zum Schluss werden Perspektiven für weiterführende Arbeiten gegeben, die zusätzliche Einblicke in die Interaktion zwischen ART und CD25 erlauben könnten.

### 7.1 Nachweis von ART2-Zielproteinen auf der murinen T-Lymphomzelllinie YAC-1

Zielproteine von ADP-Ribosyltransferasen wurden bereits auf verschiedenen Zelltypen identifiziert (siehe Tab. 10 im Anhang). So konnten Okamoto et al. 1998 zeigen, dass reife T-Lymphozyten der Maus ART-Aktivität auf ihrer Oberfläche besitzen und nach ADP-Ribosylierung veränderte Proliferation, Zytotoxizität und Migrationsverhalten aufweisen. Die Arbeitsgruppe zeigte per radioaktiver Nachweismethode (<sup>32</sup>P-NAD), dass T-Zellen, nicht aber B-Zellen oder Makrophagen aus C57BL/6J Mäusen multiple Zielproteine ADP-ribosylieren. Mittels Immunpräzipitation untersuchten die Autoren ferner eine Reihe von Membranproteinen auf Inkorporation von Radioaktivität. Die Mehrzahl der untersuchten Proteine zeigte keine Markierung. Darunter befanden sich CD2, CD28, CD48, CD62L, die Komponenten des T-Zellrezeptors (CD3) sowie die alpha und beta Ketten der α4 Integrine. Sieben weitere Proteine zeigten unterschiedlich starke Inkorporation von Radioaktivität (CD8, CD11a, CD18, CD43, CD27, CD45 und CD44 in Folge abnehmender Bandenintensität (Okamoto, Azhipa et al. 1998). Aufgrund eines fehlenden Vergleichs von markierten Proteinen in Lysaten vor und nach Präzipitation blieb jedoch unklar, ob und welche der identifizierten Proteine Hauptziele darstellen.

Einen anderen Ansatz ART-Zielproteine zu identifizieren, verfolgten frühere Doktoranden unserer Arbeitsgruppe in ihren Dissertationsarbeiten (Bannas 2007; Koestner 2007). Dabei entwickelten sie. das auch in dieser Arbeit Verfahren verwendete der massenspektrometrischen Analyse affinitätsgereinigter etheno-ADP-ribosylierter Proteine. Als Modell verwendeten Bannas und Koestner dabei eine stabil mit ART2.2 transfizierte Tdie Zell Hydridomalinie (DC27.10 ART2.2). Anschließend folgte radioaktive Nachweismethode der ADP-Ribosylierung der so identifizierten Proteine. Mit dieser Methodik wurden mehrere der von Dennert et al. gefundenen Proteine bestätigt (CD11a, CD18, CD43, CD44, CD45), sowie weitere bisher unbekannte ART-Zielproteine identifiziert (CD30, CD31, CD98, CD100, CD205, CD229). Offensichtlich können ADP-Ribosyltransferasen bei Überexpression auf Lymphomzellen, ähnlich wie auf primären T-Zellen multiple Zelloberflächenproteine modifizieren.

Ziel der Versuche im ersten Teil dieser Arbeit war die Charakterisierung des Musters an ADP-ribosylierten Proteinen auf einer Lymphomzelllinie mit endogener ART2-Expression mit Hilfe des von Koestner und Bannas entwickelten Verfahrens (Bannas 2007; Koestner 2007). Darüber hinaus sollte versucht werden, die prominentesten Zielproteine auf dieser Zelllinie mittels selektiver Immunpräzipitation nach radioaktiver Markierung zu identifizieren.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen der affinitätsgereinigten putativen Zielproteine lieferte Peptidfragmente von 17 unterschiedlichen Proteinen (Tab. 7, Tab. 8). Literaturrecherchen zur Folge werden jedoch nur sieben dieser Proteine auf der Zelloberfläche exprimiert (Tab. 9). Somit liegt der Schluss nahe, dass die anderen Proteine entweder mit einem etheno-ADP-ribosylierten Zielprotein kopräzipitiert wurden, oder unspezifisch an die anti-etheno-Adenosin-Matrix gebunden hatten. Allerdings waren verschiedene Methoden aufgewendet worden, um etheno-ADP-ribosylierte Poteine spezifisch zu eluieren, einschließlich des intensiven Waschens der Matrix mit Detergens-haltigen Puffer sowie der milden kompetitiven Elution mittels etheno-Adenosin in physiologischem Puffer.

Eine effiziente Methode, die in der Massenspektrometrie identifizierten potenziellen ART2-Zielproteine auf ihre ADP-Ribosylierung zu überprüfen, ist die Inkubation der Zellen mit radioaktivem <sup>32</sup>P-NAD mit anschließender spezifischer Immunpräzipitation. Unter den, in dieser Arbeit auf YAC-1-Zellen so identifizierten Zelloberflächenproteinen befanden sich zwei bereits in den Arbeiten von Bannas und Koestner identifizierte Zielproteine: CD205 und CD229. CD205 ist ein Transmembranprotein vom Typ I. Dieses ist involviert in die Antigen-Endozvtose auf dendritischen Zellen (Kato, Neil et al. 1998). CD229 ist Mitglied der CD105-Unterfamilie der Immunglobulin Superfamilie. Es ist ebenfalls ein Typ Ι Transmembranprotein und wird auf B und T-Lymphozyten exprimiert. Dabei scheint es in den Adhäsionsprozess von T-Zellen untereinander beteiligt zu sein und segregiert bei T-Zell Aktivierung in die immunologische Synapse (Romero, Zapater et al. 2005).

Das dritte mittels Radioaktiv-Assay bestätigte Zielprotein ist CD25. CD25 wurde in beiden Massenspektrometrischen Analysen detektiert (Tab. 7, Tab. 8). Durch den Vergleich von Gesamtzelllysaten vor und nach Immunpräzipitation konnte nachgewiesen werden, dass CD25 und CD229 die beiden Hauptzielproteine auf YAC-1 Lymphomzellen sind. Der hochaffine Interleukin-2-Rezeptor ist aus drei Untereinheiten zusammengesetzt (Abb. 3). Die  $\alpha$ -Untereinheit (CD25) ermöglicht es dem Rezeptorkomplex, eine hohe Affinität für IL-2 zu erreichen. Diese kann durch die anderen beiden Bestandteile, CD122 und CD132, alleine nicht gewährleistet werden (Johnson, Choi et al. 1994). CD25 spielt eine wichtige Funktion bei der IL-2-induzierten Proliferation von aktivierten T-Lymphozyten (Smith 1988), sowie für die Homöostase von regulatorischen T-Zellen (Tregs) (Sakaguchi 2005).

Fünf weitere Proteine wurden bisher nicht als ART-Zielproteine beschrieben und konnten mangels verfügbarer Antikörper auch (noch) nicht als tatsächliche ART-Ziele bestätigt werden. Dazu zählen die Tyrosinphosphatase LAR, das Hitzeschock Protein 8, die Beta Untereinheit des mitochondralen F1 Komplexes, der ATP-Synthase (ATP5B) und Nucleolin.

Die Tyrosinphosphatase LAR wurde 1995 kloniert (Schaapveld, van den Maagdenberg et al. 1995). Sie gehört zu der Familie der Protein-Tyrosinphosphatasen (PTPasen). LAR wird als ca. 200 kDa schweres Protein synthetisiert und an der Zelloberfläche exprimiert. Dort wird es proteolytisch in zwei Untereinheiten von jeweils 150 kDa und 85 kDa geteilt. Dabei ist die 150 kDa schwere extrazelluläre Untereinheit nicht kovalent an einem extrazellulär ragenden Rest der 85 kDa schweren, transmembran verlaufenden, intrazellulären Untereinheit gebunden (Streuli, Krueger et al. 1992). Die extrazelluläre Untereinheit zeigt Homologien zu CD56, einem Zelladhäsionsmolekül. Zwei Fragmente aus dieser Untereinheit wurden in dieser Arbeit per Massenspektrometrie identifiziert. Die transmembran / intrazelluläre Untereinheit zeigt in ihren zwei Phosphatasedomänen Ähnlichkeit mit CD45, das ein bekanntes ART-Zielprotein ist (Okamoto, Azhipa et al. 1998).

Das Hitzeschockprotein 8 (Hspa8/Hsc71/LAP-1) gehört zu der Familie der 70 kDa Hitzeschockproteine / ATPasen. Dieses Chaperon ist für die Faltung von anderen Proteinen wichtig, spielt aber auch eine Rolle in dem Abbauprozess von Clathrin-bedeckten Vesikeln (Tavaria, Gabriele et al. 1995). Darüber hinaus wurde postuliert, dass es an der Erkennung von bakteriellem LPS beteiligt ist. In dem Zusammenhang gibt es verschiedene Hinweise darauf, dass Mitglieder dieser Hitzschockproteine auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Triantafilou, Triantafilou et al. 2001; Osterloh and Breloer 2008). In einer unabhängigen Massenspektrometrischen Analyse wurde Hsc71 (sowie zwei weitere heat shock Proteine Hsp70 und Hsp90) als Proteine identifiziert, die mit dem P2X7 Purinorezeptor kopräzipitieren (Kim, Jiang et al. 2001). P2X7 wird auf den in dieser Arbeit untersuchten Zellen exprimiert und ADP-ribosyliert (Abb. 13). Interessanterweise identifizierte Koestner et al. in seiner Arbeit über ART-Zielproteine in der ART2-transfizierten Lymphomzelllinie DC27.10 mittels Massenspektrometrie ebenfalls dieses sowie ein weiteres Hitzeschockprotein (heat shock protein 90-beta/Hsp 84) (Koestner 2007). Das im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Mitglied der hsp70-Familie Bip/Grp78/Hspa5 wurde zudem als Zielprotein der ADP-Ribosylierung im endoplasmatischen Retikulum identifiziert (Carlsson and Lazarides 1983; Ledford and Leno 1994). Weiter Untersuchungen sind notwendig, um zu klären, ob die hier identifizierten Heat shock Proteine tatsächlich selbst Ziele der ADP-Ribosylierung sind oder durch Bindung an ein ADP-ribosyliertes Protein wie P2X7 kopräzipitiert wurden. Hinweise ob die in dieser Arbeit identifizierten Hitzeschockproteine selbst an der Zelloberfläche exprimiert werden und somit potentielle ART-Ziele sind könnten z.B. FACS-Analysen mit geeigneten Antikörpern ergeben.

Die Beta-Untereinheit des mitochondralen F1-Komplexes (ATP5B) ist eine Untereinheit der ATP-Synthase. Sie wird normalerweise in Mitochondrien exprimiert. Im Jahr 2003 wurde die ATP5B jedoch als ein hochaffiner HDL-Rezeptor für Apolipoprotein A1 auf der Zelloberfläche von Hepatozyten beschrieben (Martinez, Jacquet et al. 2003). Darüber hinaus

wurde seine Zelloberflächenexpression auf verschiedenen Zelllinien postuliert, u.a. der Chronisch Myeloischen Leukämie Zelllinie K562 (Das, Mondragon et al. 1994).

Nucleolin ist ein Phosphoprotein, welches hautsächlich in den Nucleoli rasch wachsender Zellen zu finden ist. Es wurde darüber hinaus auch auf der Zelloberfläche von Leukozyten detektiert, wo es als Ligand von CD62L/L-Selectin dienen kann (Harms, Kraft et al. 2001). Auf Makrophagen wird es ebenfalls exprimiert und soll dort als Rezeptor für apoptotische Zellen dienen (Hirano, Miki et al. 2005).

Zwei weitere Proteine, Ezrin und Moesin liegen zwar membranassoziiert vor, wurden bisher jedoch nicht an der Zelloberfläche beschrieben. Ezrin, Radixin und Moesin bilden zusammen die so genannten ERM-Proteine. Sie stellen eine Verbindung zwischen Aktinfilamenten und der Plasmamembran dar. Eine der T-Lymphozyten assoziierten Funktionen dieser Proteine ist dabei die Beteiligung an der Immunologischen Synapsenformation zwischen T-Zelle und APC (Delon, Kaibuchi et al. 2001; Roumier, Olivo-Marin et al. 2001). Beide Proteine sind häufig mit den ART-Zielproteinen CD43 oder CD44 assoziiert. Eine Kopräzipitation mit einem der beiden Oberflächenproteine ist somit denkbar.

Zwei weitere Proteine, Tubulin alpha-1A und Tubulin beta-4 sind Teil des Zytoskelett, das nach der Triton-X-100 Zellyse häufig mit rafts assoziiert bleibt (Bannas, Adriouch et al. 2005). Es ließe sich bei diesen Proteinen ebenfalls ein Kopräzipitation mit etheno-ADP-ribosylierten Raft-assoziierten Proteinen vorstellen. Weitere Proteine, wie der nukleäre Transkriptionsfaktor TIF1beta sowie das in der mitochondrialen Matrix lokalisierten Enzym Citrat Synthase, sind am ehesten durch unspezifische Bindung bzw. mangelnde Klärung zu begründen.

Protein	Zellulare Lokalisation
Tyrosinphosphatase LAR	Plasmamembran gebunden (Tm Type1)
CD25	Plasmamembran gebunden (Tm Type1)
CD205	Plasmamembran gebunden (Tm Type1)
CD229	Plasmamembran gebunden (Tm Type1)
Nucleolin	Nukleus / Nucleolus / Zelloberfläche
heat shock protein 8 (Hspa8, HSC71)	Zytoplasma / Zelloberfläche
ATP synthase, H+ transporting	Mitochondrium / Zelloberfläche
mitochondrial F1 complex, beta	
subunit (ATP5B)	
Villin 2 (Ezrin)	Membranassoziiert
Moesin	Membranassoziiert
Tubulin alpha-1A chain	Zytoskelett
Tubulin beta-4 chain	Zytoskelett
Threonyl-tRNA synthetase	Zytoplasma
Elongation factor 2	Zytoplasma
eukaryotic translation elongation factor 1	Zytoplasma

Tab. 9Zusammenfassung der massenspektrometrisch identifizierten ART2-Zielproteine.Hervorgehoben sind die Proteine mit nachgewiesener Expression auf der Zelloberfläche





Abb. 28 ART2.2 und seine potentiellen Zielproteine auf YAC-1 Lymphomzellen. Schematische Darstellung von bestätigten und potentiellen Zielproteinen der ART2.2 auf YAC-1 Lymphomzellen. Bekannte Proteindomänen sind schematisch dargestellt. CD229 und CD25 wurden in dieser Arbeit als prominente Zielproteine der ART2 bestätigt. LAR steht stellvertretend für potentielle Ziele, die massenspektrometrisch unter den aufgereinigten etheno-ADP-ribosylierten Proteinen identifiziert wurden, für die der Nachweis einer tatsächliche ADP-Ribosylierung noch aussteht. Die posttranslationale Modifikation mit ADP-Ribose ist schematisch durch rote Dreiecke angezeigt, die Lage der ADP-Ribosylierungsstellen ist hypothetisch. NAD im aktiven Zentrum ist durch ein Sternchen markiert.

Unter den potentiellen ART2-Zielproteinen die auf YAC-1 Zellen hier mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden, befinden sich somit auch neue interessante Kadidaten (Abb. 28).

CD25, das prominenteste Zielprotein der ADP-Ribosylierung auf der YAC-1 Lymphomzelllinie, wurde für die nähere Charakterisierung ausgewählt. Fast alle von Okamoto et al. auf primären Zellen beschriebenen Zielproteine (Okamoto, Azhipa et al. 1998) konnten als solche ebenfalls auf Zelllinien bestätigt werden (Bannas 2007; Koestner 2007). Somit lag der Umkehrschluss nahe, dass die ADP-Ribosylierung von CD25 auch auf primären Zellen geschieht. An aufgereinigten primären CD4<sup>+</sup> Zellen aus sekundär lymphatischen Organen der P2X7 KO C57BL/6J Maus konnte per radioaktiver Nachweismethode der Nachweis erbracht werden, dass CD25 auch in diesen Zellen ADPribosyliert wird, obgleich es bei diesen Untersuchungen nicht das Hauptziel darstellte (Abb. 14). Das könnte u.a. daran liegen, dass nur 6 - 10 % der peripheren CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in der Maus konstitutiv CD25 exprimieren (Hori, Nomura et al. 2003), während fast alle CD4<sup>+</sup> Zellen ART2 exprimieren (Koch-Nolte, Duffy et al. 1999; Krebs, Adriouch et al. 2005).

Der CD25 konstitutiv exprimierenden Subpopulation der CD4<sup>+</sup> Zellen wurde eine wichtige Rolle in der Immunregulation nachgewiesen. Bei dem Transfer von CD25 depletierten CD4<sup>+</sup> Lymphozyten in athyme Mäuse entwickelten sich histologisch und serologisch gesicherte Autoimmunkrankheiten wie Thyroiditis, Gastritis, Glomerulonephritis oder Polyarthritis. Die nachträgliche Ergänzung der CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Zellgruppe war in der Lage diese inflammatorischen Prozesse zu verhindern (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Es konnte später gezeigt werden, dass diese immunmodulatorischen Zellen sich von den anderen CD4<sup>+</sup> Zellen dadurch unterscheiden, dass sie den Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimieren. Dieser Unterschied besteht ebenfalls beim Vergleich mit aktivierten CD4<sup>+</sup> Zellen, welche nach entsprechender Interaktion mit B-Lymphozyten, oder APC ebenfalls CD25 exprimieren (Hori, Nomura et al. 2003). Sie wurden aufgrund ihrer immunsupprimierenden Eigenschaften regulatorische T-Zellen (Tregs) genannt. Die Experimente in dieser Arbeit zeigen die Möglichkeit der ADP-Ribosylierung von CD25 auf Tregs. Es wurden dabei P2X7 KO Mäuse gewählt, um den in vorherigen Studien gezeigten zytotoxischen Effekt von NAD auf CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Tregs, welcher über den Purinorezeptor P2X7 mediiert wird, zu verhindern (Aswad, Kawamura et al. 2005). Dabei konnte gewährleistet werden, dass freigesetztes NAD durch die Präparation der sekundär lymphatischen Organe nicht zu dem NAD induced cell death (NICD) der Tregs führt.

Bei dem Vergleich der ADP-Ribosylierungsmuster zwischen Zelllinien und primären Zellen fällt ein Unterschied in der Verteilung der Bandenintensitäten auf. So haben alle in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien einige wenige intensive Banden gezeigt. Vergleiche dazu YAC-1 in Abb. 13, CTLL-2, Kit 225 in Abb. 16 und HEK-T Zellen (mock) in Abb. 26. Die primären CD4<sup>+</sup> Zellen in Abb. 14 zeigen hingegen eine ausgewogenere Verteilung der ADP-Ribosylierung auf multiplen, ähnlich intensiven Banden. Dieses Phänomen mag den Rückschluss ziehen lassen, dass auf diesen Zellen eine größere Vielfalt an Zelloberflächenproteinen ADP-ribosyliert wird. Es mag ebenfalls dadurch erklärt werden, dass Zelllinien bestimmte Proteine, die ihnen einen Proliferationsvorteil verschaffen, vermehrt exprimieren. Ob die ADP-Ribosylierung dieser prominenten Zielproteine auf den jeweiligen Zelllinien einen funktionellen Einfluss hat, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

### 7.2 CD25 als Zielprotein der ART1 und ART2.2 auf IL-2abhängigen Zelllinien

Die Frage nach der ADP-Ribosylierung in weiteren konstitutiv CD25 exprimieren Zellen wurde im zweiten Teil der Arbeit beantwortet. Dabei wurde sich Zelllinien bedient, die ein IL-2 abhängiges Wachstum aufzeigen. Diese Zellen zeigen jedoch nur geringe, beziehungsweise keine ART-Aktivität auf (Abb. 15). Die murine, zytotoxische T- Lymphozyten Zelllinie CTLL-2 wurde daher jeweils mit muriner ART2.2 und humaner ART1 stabil transfiziert. Die Untersuchung der ADP-Ribosylierung auf der humanen, chronisch lymphatischen Leukämiezelllinie Kit 225 wurde durch die stabile Transfektion von humaner ART1 möglich gemacht. Die Analysen der ADP-Ribosylierung auf diesen Zellen zeigen, dass CD25 in allen drei Transfektanten ein ART-Zielprotein darstellt. Sowohl murine ART2.2 als auch humane ART1 führten nach Inkubation der CTLL-2 Zelllinie mit <sup>32</sup>P-NAD, zu einer ähnlich starken ADP-Ribosylierung der CD25-Bande (Abb. 16). Dies entspricht der Beobachtung in DC27.10 Zellen, wo die humane ART1 und die ART2.2 bei Überexpression jeweils beide Ketten des LFA-1 Integrins ADP-ribosylierten (Krebs, Koestner et al. 2003). CD25 stellt in den CTLL-2 Zellen eines der drei wichtigsten ART-Zielproteine dar. Dies ist vergleichbar mit seiner Rolle in der YAC-1 Lymphomzelllinie. Die ADP-Ribosylierung des CD25 in der humanen Zelllinie Kit 225 zeigt eine etwas schwächere, aber prominente Bande. Sie gehört zu den fünf intensivsten Banden der Zelllinie.

Es stellte sich dann die Frage nach den Konsequenzen dieser Modifikation. Hierzu wurde der Einfluss der ADP-Ribosylierung auf den IL-2 Stimulus untersucht. Dafür wurden die mit ART2.2 stabil transfizierten CTLL-2 Zellen genommen, die ein IL-2 -abhängiges Wachstum aufzeigen. Das Interleukin-abhängige Wachstum setzt eine intakte Signaltransduktionskaskade des Rezeptors voraus. Diese Kaskade involviert bei Tregs, wie auch bei CD25<sup>+</sup>, aktivierten T-Helferzellen, unter anderem die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor STAT5 (Liu, Gaffen et al. 1998; Bensinger, Walsh et al. 2004). Es konnte in (Abb. 17) gezeigt werden, dass diese Phosphorylierung von STAT5 durch vorherige ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen vermindert wird. Ebenfalls gezeigt wurde, dass dies ein ART2.2 vermittelter Effekt ist, d.h. in ART2-negativen Zellen nicht zu beobachten war, und in ART2-exprimierenden Zellen durch einen die ART2.2-Aktivität blockierenden Lama Einzeldomänen-Antikörpers VHH s+16a blockiert wurde (Koch-Nolte, Reyelt et al. 2007).

Die Konsequenzen dieser Minderaktivierung des IL-2-Rezeptors durch Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung muss in weiteren Experimenten genauer untersucht werden. Die Funktion der STAT5-Aktivierung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es werden dem Transkriptionsfaktor in verschiedenen Modellen sowohl proliferative als auch apoptotische Effekte zugesprochen (Gaffen 2001). In CTLL-2 Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Minderphosphorylierung von STAT5 mit einer erniedrigten Proliferationsrate einhergeht (Zhang, Conrad et al. 2004). In dieser Arbeit wurde die Minderphosphorylierung durch extrazelluläres Adenosin induziert, das anscheinend über den Adenosin-Rezeptor A2 intrazelluläre Phosphatasen aktivierte. Im Prinzip kann NAD von extrazellulären Enzymen zu Adenosin metabolisiert werden (Deterre, Gelman et al. 1996). Es ist unwahrscheinlich, dass dies bei CTLL-2 Zellen in unserem Experiment vorkam, da NAD alleine keinen Einfluss auf die IL-2 induzierte STAT5-Phosphorylierung in ART2-negativen CTLL-2 Zellen hatte (Abb. 17, Panel 3). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die ADP-Ribosylierung von weiteren Zelloberflächenmolekülen (z.B. von Phosphatasen) indirekt die STAT-5-Phosphorylierung hemmt, statt direkt über die ADP-Ribosylierung von CD25. Es ist deshalb von Interesse zu untersuchen, ob die ADP-Ribosylierung von CD25 die Bindung von IL-2 hemmt. Dies könnte

sowohl an den hier etablierten ART2-transfizierten CTLL-2 Zellen als auch an transient transfizierten HEK-T Zellen, z.B. mit Hilfe von <sup>125</sup>Iod-markierten oder Fluorochrommarkierten IL-2 analysiert werden (Robb, Rusk et al. 1988; Mikhail, Raska et al. 1993).

Die extrazelluläre Konzentration des NAD bewegt sich im Plasma im Bereich von  $0,1 \mu$ M. Es konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass im Inflammationsgewebe diese Konzentration auf über 10  $\mu$ M ansteigen kann (Adriouch, Bannas et al. 2007). Ein dafür verantwortlicher Mechanismus mag die Lyse von Zellen sein, die ihr intrazelluläres NAD, welches bei 1 mM liegt (Jacobson and Jacobson 1997), entlassen. Die Möglichkeit, dass der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Effekt der ADP-Ribosylierung auch durch in vivo vorkommende NAD–Konzentrationen auftritt, ist somit denkbar.

### 7.3 Lokalisation der ADP-Ribosylierungsstelle am CD25

Durch die Identifikation der ADP-Ribosylierungsstelle eines Proteins ist es möglich die Funktion dieser posttranslationalen Modifikation besser zu verstehen. So konnten Adriouch et al. zeigen, dass die beiden ADP-Ribosylierungsstellen (R125 und R133) des P2X7-Rezeptors in einem prominenten Zystein-reichen "Finger" liegen, nahe der postulierten Liganden-Bindung zwischen zwei Untereinheiten des homotrimeren Rezeptor-Komplexes. Die ADP-Ribosylierung an R125 nicht aber an R133 aktiviert P2X7 (Adriouch, Bannas et al. 2007).

In dem letzten Teil der Arbeit wurde versucht, die ADP-Ribosylierungsstelle des CD25 näher zu charakterisieren. Da ART1 und ART2.2 argininspezifische mono-ADP-Ribosyltransferasen sind (Glowacki, Braren et al. 2002), wurden die Arginine im humanen und murinen CD25 durch zielgerichtete Mutagenese mit Lysin ausgetauscht. Der konservative Austausch versprach die geringste Änderung an der sterischen Zusammensetzung des Moleküls nach transienter Kotransfektion mit ART in HEK-T Zellen.

Da die 3D-Kristallstruktur des humanen CD25 bereits z.T. aufgeklärt ist (Stauber, Debler et al. 2006), konnte die Lokalisation einiger Arginine (Abb. 29) visualisiert werden. Ein Modell für die 3D-Struktur vom murinem CD25 wurde mit Hilfe eines Alignments der zwei Speziessequenzen und des Computerprogramms SWISS-MODEL (Automated Protein Modelling Server) erstellt (Schwede, Kopp et al. 2003). Das Modell wird hier für eine bessere Visualisierung um 270° von A nach B, beziehungsweise von C nach D gedreht. Die konservierten Arginine sind rot markiert dargestellt. Für die Vergleichbarkeit beider Strukturmodelle wurden die Nummern der murinen Arginine neben denen der Humanen in Klammern angegeben. Das Alignment in (Abb. 23) zeigt, dass in beiden Spezies jeweils elf Arginine vorhanden sind. Davon sind jeweils sechs bei Maus, Mensch und Ratte konserviert. Fünf weitere Arginine sind nicht konserviert. Alle konservierten Arginine sind in der 3D-Kristallstruktur des humanen CD25 identifizierbar und befinden sich an der Moleküloberfläche. Dies macht einen Zugang der ART zwecks ADP-Ribosylierung für diese Stellen im Prinzip möglich.



Abb. 29 3D Modell von humanem und murinem CD25. Abgebildet sind die Moleküloberflächen der 3D-Kristallstrukturen von CD25 im Menschen (A, B) (Stauber, Debler et al. 2006, PDB ID code 2ERJ) und in der Maus (C, D) (Modelliert anhand eines Alignments der humanen CD25-Kristallstruktur mittels SWISS-MODEL). Das Molekül wurde um 180 ° in einer senkrechten Achse gedreht um von der linken zur rechten Abbildung zu kommen. Die Interaktionsfläche von CD25 mit IL-2 ist in türkis dargestellt (A, B). Die Arginine sind mit rot für konservierte und blau für nicht konservierte Reste eingefärbt und nummeriert. Dabei wurden bei dem humanen CD25 die entsprechenden konservierten Maus-Arginine in Klammern zugefügt. Siehe dazu auch Abb. 23.

Für Maus CD25 konnten alle in der extrazellulären Domäne vorhandenen Arginine erfolgreich mutiert werden. Die Tatsache, dass jede dieser Mutanten nach Kotransfektion mit ART2 in HEK-T Zellen ADP-ribosyliert werden konnte, deutet an, dass CD25 an mehr als einem Argininrest modifiziert wird. Aufgrund der relativ schwachen Markierung von Maus CD25 in HEK-T Zellen, sowie aufgrund von leichten Unterschieden in der Zelloberflächenexpression einzelner Mutanten ist eine definitive Aussage über eine partielle Verminderung der Markierung nur schwierig zu treffen. Bei zwei ADP-Ribosylierungsstellen, wäre eine Halbierung der Bandenintensität in den jeweiligen Einzelmutanten zu erwarten, bei drei ADP-Ribosylierungsstellen jedoch nur eine ca. 30% Reduktion. In den Analysen der Maus-Mutanten konnten allenfalls ca. 30% Reduktionen erzielt werden, bei Substitution des

nichtkonservierten R163, sowie bei Substitution der beiden benachbarten Arginine R35 und R36 (Abb. 26).

Für Human CD25 wurden in dieser Arbeit alle sechs konservierten Arginine, jedoch nur eine von fünf nichtkonservierten Arginine erfolgreich mutiert. Die Ergebnisse des Radioaktiv-Assay zeigen eine deutlich verminderte Markierung nach Substitution des konservierten R117, sowie eine leicht verminderte Markierung nach Doppelsubstitution der benachbarten Arginine R35 und R36 (Abb. 27). Somit sind auch für das humane CD25 mehrere ADP-Ribosylierungsstellen zu postulieren.

Viele, aber nicht alle der bisher in anderen Proteinen identifizierten Zielarginine kommen als Doppelarginine vor. So konnte Adriouch et. al zeigen, dass der murine Purinorezeptor P2X7 jeweils an einem der zwei Doppelarginine 124, 125 und 133, 134 ADP-ribosyliert wird (Adriouch, Bannas et al. 2007). Zusätzlich zeigte Panole et al., dass HNP-1 (human neutrophil peptide) durch die ART1 an zwei Stellen ADP-ribosyliert wird. Eine dieser Stellen befindet sich in dem Doppelarginin 14, 15 (Paone, Wada et al. 2002; Paone, Stevens et al. 2006). Im letzteren Fall sind beide ADP-Ribosylierungsstellen anhand der 3D-Kristallstruktur von HNP-1 an der Moleküloberfläche zu identifizieren (Zou, de Leeuw et al. 2007). Die extrazelluläre Domäne von CD25 enthält ebenfalls ein Doppelarginin, das interessanterweise an der Interleuking-2 Bindungsstelle lokalisiert ist (Abb. 29, hellgrüne Fläche).

Ein weiteres Beispiel für die multiple ADP-Ribosylierung ist das im Skelettmuskel exprimierte α7 Integrin. Es wird an mindestens zwei verschiedenen noch nicht genau identifizierten Stellen in Abhängigkeit der zugesetzten NAD-Konzentration ADP-ribosyliert (Zhao, Gruszczynska-Biegala et al. 2005; Zolkiewska 2005)

In diesem Zusammenhang ist noch der deutliche Unterschied der CD25-Bandeninstensität beim Vergleich der humanem mit der murinen CD25-Form in HEK-T Zellen zu bemerken (Abb. 22). Es fällt auf, dass humanes CD25 wesentlich mehr Radioaktivität inkorporiert, trotz adäquater Zelloberflächenexpression beider Proteine. Eine mögliche Ursache für die geringe ADP-Ribosylierung des murinen CD25 in HEK-T Zellen könnte eine andere Lokalisation von murinem CD25 in der Membran von HEK-T sein. Bannas et al. konnte zeigen, dass ART2.2 durch einen GPI-Anker mit den so genannten "membrane rafts" assoziiert ist. Diese Assoziation fokussiert die Spezifität der ART auf raft-assozierte Zelloberflächenmoleküle (Bannas, Adriouch et al. 2005). Für CD25 wurde ebenfalls eine bevorzugte Lokalisation in "membrane rafts" bei humanen T-Zelllinie Jurkat sowie bei den in dieser Arbeit verwendeten Kit 225 Zellen beschrieben (Matko, Bodnar et al. 2002; Li, Ma et al. 2005). Es wäre denkbar, dass die Expression der murinen Form von CD25 in einer humanen Zelllinie wie die HEK-T, diese Lokalisation in den "membrane rafts" nicht, oder weniger effizient statthaben lässt. Als Resultat könnte die sterische Erreichbarkeit von CD25 durch die "membrane rafts"-assoziierte ART2.2 abnehmen. Diese Hypothese könnte durch den Einsatz von chimären Proteinen aus Maus und Human CD25, z.B. nach Austausch der C-terminalen Transmembran und zytosolischen Domänen, näher untersucht werden. Darüber hinaus könnte ein Vergleich von GPI-verankerter mit transmembran-verankerter ART2.2 weitere Aufschlüsse geben (Bannas, Adriouch et al. 2005).

### 7.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse bilden die Basis für weiterführende Untersuchungen zur Funktion der posttranslationalen Modifikation des IL-2-Rezeptors durch ADP-Ribose.

Die Methode der Identifizierung von ART-Zielproteinen mittels massenspektrometrischer Techniken hat sich als eine ergiebige Quelle erwiesen. Mit diesem Verfahren und dem anschließendem Radioaktiv-Assay war es möglich, zwei der prominentesten Banden auf der endogenen ART2-exprimierenden Zelllinie YAC-1 zu identifizieren. Die ADP-Ribosylierung der anderen identifizierten putativen Zielproteine Tyrosinphosphatase LAR, Nucleolin, ATP5B und Hspa8 sollte durch Radio-ADP-Ribosylierungs-Assays bestätigt werden.

Von Interesse wäre es, CD25 als ART-Zielprotein auf regulatorischen T-Zellen näher zu untersuchen. Dazu könnten neue transgene Mäuse, die endogen GFP (green fluorescent protein) oder mRFP (monomeric red fluorescent protein) exprimieren Tregs aufweisen, helfen (Fontenot, Rasmussen et al. 2005; Wan and Flavell 2005; Lahl, Loddenkemper et al. 2007), da sie die Aufreinigung der Tregs erleichtern. So gewonnene Tregs könnten in Proliferationsund Apoptose-Assays auf die Wirkungen der ADP-Ribosylierung ihrer Oberflächenmoleküle hin untersucht werden. Von großem Interesse ist ferner die Frage, ob die ADP-Ribosylierung von CD25 die anschließende Bindung von IL-2 hemmt. Dies könnte durch Bindungsstudien mittels radioaktiv markiertem IL-2 auf ART-exprimierenden Zellen untersucht werden. Darüber hinaus könnte untersucht werden, inwiefern die ADP-Ribosylierung von CD25 die weiteren Komponenten der IL-2 Rezeptorsignaltransduktionskaskade in diesen Zellen beeinflusst (Bensinger, Walsh et al. 2004).

Die Identifikation der ADP-Ribosylierungsstellen in murinen und humanem CD25 könnte ggf. durch Ko-Mutation von mehreren Argininen gelingen. Bei dem murinen Typ wäre z.B. die gleichzeitige Mutation von R35, 36 in Kombination mit R163, bei dem humanen Typ die Ko-Mutation des Doppelarginins (R35, 36) in Kombination mit R117 ein viel versprechender Ansatz.

Eine weitere Methode zur Identifikation der ADP-Ribosylierungsstelle des CD25 wäre u.a. die Detektion des Massenunterschiede von ADP-ribosylierten Peptiden nach tryptischen Verdau von ADP-ribosyliertem CD25 mittels Massenspektrometrie (Paone, Wada et al. 2002; Margarit, Davidson et al. 2006; Paone, Stevens et al. 2006).

## 8. Literatur

- Adriouch, S., P. Bannas, et al. (2007). "ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site." <u>Faseb J</u>.
- Adriouch, S., S. Hubert, et al. (2007). "NAD+ released during inflammation participates in T cell homeostasis by inducing ART2-mediated death of naive T cells in vivo." J <u>Immunol</u> 179(1): 186-94.
- Aktories, K. (1991). ADP-ribosylating toxins. Berlin, Springer Verlag.
- Aktories, K. and I. Just (2000). Bacterial Protein Toxins. Berlin, Springer Verlag.
- Aswad, F., H. Kawamura, et al. (2005). "High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors." J Immunol **175**(5): 3075-83.
- Bannas, P. (2007). "Die murine T-Zell Ecto-ADP-Ribosyltransferase ART2.2: Nachweis ihrer Lokalisation in Lipid Rafts und Identifizierung ihrer Zielproteine."
- Bannas, P., S. Adriouch, et al. (2005). "Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 depends on its association with lipid rafts." <u>Blood</u> 105(9): 3663-70.
- Bensinger, S. J., P. T. Walsh, et al. (2004). "Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **172**(9): 5287-96.
- Bromley, S. K., W. R. Burack, et al. (2001). "The immunological synapse." <u>Annu Rev</u> <u>Immunol</u> **19**: 375-96.
- Carlsson, L. and E. Lazarides (1983). "ADP-ribosylation of the Mr 83,000 stress-inducible and glucose-regulated protein in avian and mammalian cells: modulation by heat shock and glucose starvation." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **80**(15): 4664-8.
- Collier, R. J. (2001). "Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century." <u>Toxicon</u> **39**(11): 1793-803.
- Corda, D. and M. Di Girolamo (2003). "Functional aspects of protein mono-ADPribosylation." <u>Embo J</u> 22(9): 1953-8.
- Das, B., M. O. Mondragon, et al. (1994). "A novel ligand in lymphocyte-mediated cytotoxicity: expression of the beta subunit of H+ transporting ATP synthase on the surface of tumor cell lines." J Exp Med 180(1): 273-81.
- Delon, J., K. Kaibuchi, et al. (2001). "Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin." <u>Immunity</u> 15(5): 691-701.
- Depper, J. M., W. J. Leonard, et al. (1983). "Blockade of the interleukin-2 receptor by anti-Tac antibody: inhibition of human lymphocyte activation." J Immunol **131**(2): 690-6.
- Deterre, P., L. Gelman, et al. (1996). "Coordinated regulation in human T cells of nucleotidehydrolyzing ecto-enzymatic activities, including CD38 and PC-1. Possible role in the recycling of nicotinamide adenine dinucleotide metabolites." J Immunol 157(4): 1381-8.
- Fieldhouse, R. J. and A. R. Merrill (2008). "Needle in the haystack: structure-based toxin discovery." <u>Trends Biochem Sci</u>.
- Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, et al. (2005). "A function for interleukin 2 in Foxp3expressing regulatory T cells." <u>Nat Immunol</u> **6**(11): 1142-51.
- Gaffen, S. L. (2001). "Signaling domains of the interleukin 2 receptor." <u>Cytokine</u> 14(2): 63-77.
- Ganz, T. (1999). "Defensins and host defense." Science 286(5439): 420-1.
- Giri, J. G., M. Ahdieh, et al. (1994). "Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15." Embo J **13**(12): 2822-30.

Glowacki, G., R. Braren, et al. (2002). "The family of toxin-related ecto-ADPribosyltransferases in humans and the mouse." <u>Protein Sci</u> **11**(7): 1657-70.

- Grabstein, K. H., J. Eisenman, et al. (1994). "Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor." <u>Science</u> **264**(5161): 965-8.
- Haag, F. and F. Koch-Nolte (1997). <u>ADP-Ribosylation in Animal Tissues: Structure, Function</u> <u>and Biology of Mono(ADP-Ribosyl)transferases and Related Enzymes</u>. New York, Plenum Press.
- Haag, F., F. Koch-Nolte, et al. (1994). "Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species." J Mol Biol **243**(3): 537-46.
- Hara, N., M. Badruzzaman, et al. (1999). "Mouse Rt6.1 is a thiol-dependent arginine-specific ADP-ribosyltransferase." <u>Eur J Biochem</u> **259**(1-2): 289-94.
- Harms, G., R. Kraft, et al. (2001). "Identification of nucleolin as a new L-selectin ligand." <u>Biochem J 360(Pt 3)</u>: 531-8.
- Hassa, P. O. and M. O. Hottiger (2008). "The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases." <u>Front Biosci</u> **13**: 3046-82.
- Hatakeyama, M., S. Minamoto, et al. (1986). "Intracytoplasmic phosphorylation sites of Tac antigen (p55) are not essential for the conformation, function, and regulation of the human interleukin 2 receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(24): 9650-4.
- Hirano, K., Y. Miki, et al. (2005). "A multifunctional shuttling protein nucleolin is a macrophage receptor for apoptotic cells." J Biol Chem **280**(47): 39284-93.
- Hollmann, C., F. Haag, et al. (1996). "Molecular characterization of mouse T-cell ecto-ADPribosyltransferase Rt6: cloning of a second functional gene and identification of the Rt6 gene products." <u>Mol Immunol</u> 33(9): 807-17.
- Honjo, T., Y. Nishizuka, et al. (1968). "Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis." J Biol <u>Chem</u> 243(12): 3553-5.
- Horak, I., J. Lohler, et al. (1995). "Interleukin-2 deficient mice: a new model to study autoimmunity and self-tolerance." Immunol Rev 148: 35-44.
- Horejsi, V. (2003). "The roles of membrane microdomains (rafts) in T cell activation." <u>Immunol Rev</u> 191: 148-64.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." <u>Science</u> **299**(5609): 1057-61.
- Jacobson, E. L. and M. K. Jacobson (1997). "Tissue NAD as a biochemical measure of niacin status in humans." <u>Methods Enzymol</u> **280**: 221-30.
- Jacobson, M. K. and E. L. Jacobson (1989). <u>ADP-ribose Transfer Reactions: Mechanisms and</u> <u>Biological Significance</u>. New York, Springer Verlag.
- Johnson, K., Y. Choi, et al. (1994). "Soluble IL-2 receptor beta and gamma subunits: ligand binding and cooperativity." <u>Eur Cytokine Netw</u> 5(1): 23-34.
- Kahl, S., M. Nissen, et al. (2000). "Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation." <u>J Immunol</u> 165(8): 4463-9.
- Kato, M., T. K. Neil, et al. (1998). "cDNA cloning of human DEC-205, a putative antigenuptake receptor on dendritic cells." <u>Immunogenetics</u> **47**(6): 442-50.
- Kim, M., L. H. Jiang, et al. (2001). "Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex." <u>Embo J.</u> 20(22): 6347-6358.
- Kimura, Y., T. Takeshita, et al. (1995). "Sharing of the IL-2 receptor gamma chain with the functional IL-9 receptor complex." Int Immunol 7(1): 115-20.
- Koch-Nolte, F., T. Duffy, et al. (1999). "A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto-ADP-ribosyltransferase on T cells: subset

distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation." J Immunol **163**(11): 6014-22.

- Koch-Nolte, F., F. Haag, et al. (1993). "Assignment of the human RT6 gene to 11q13 by PCR screening of somatic cell hybrids and in situ hybridization." <u>Genomics</u> **18**(2): 404-6.
- Koch-Nolte, F., S. Kernstock, et al. (2008). "Mammalian ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolases." <u>Front Biosci</u> 13: 6716-29.
- Koch-Nolte, F., D. Petersen, et al. (1996). "Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADPribosyl)transferases and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins." J Biol Chem **271**(13): 7686-93.
- Koch-Nolte, F., J. Reyelt, et al. (2007). "Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo." <u>Faseb J</u> 21(13): 3490-8.
- Koestner, W. (2007). "Identifizierung und molekulare Charakterisierung von Zielproteinen von Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs)."
- Kondo, M., Y. Ohashi, et al. (1994). "Expression of the mouse interleukin-2 receptor gamma chain in various cell populations of the thymus and spleen." <u>Eur J Immunol</u> 24(9): 2026-30.
- Kondo, M., T. Takeshita, et al. (1993). "Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4." <u>Science</u> **262**(5141): 1874-7.
- Krebs, C., S. Adriouch, et al. (2005). "CD38 controls ADP-ribosyltransferase-2-catalyzed ADP-ribosylation of T cell surface proteins." J Immunol **174**(6): 3298-305.
- Krebs, C., W. Koestner, et al. (2003). "Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine." <u>Anal Biochem</u> 314(1): 108-15.
- Krutzik, P. O. and G. P. Nolan (2003). "Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events." <u>Cytometry A</u> **55**(2): 61-70.
- Labasi, J. M., N. Petrushova, et al. (2002). "Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response." J Immunol 168(12): 6436-45.
- Lahl, K., C. Loddenkemper, et al. (2007). "Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease." J Exp Med **204**(1): 57-63.
- Ledford, B. E. and G. H. Leno (1994). "ADP-ribosylation of the molecular chaperone GRP78/BiP." <u>Mol Cell Biochem</u> **138**(1-2): 141-8.
- Letwin, B. W. and F. W. Quimby (1987). "Effects of concanavalin A, phytohemagglutinin, pokeweed mitogen, and lipopolysaccharide on the replication and immunoglobulin synthesis by canine peripheral blood lymphocytes in vitro." <u>Immunol Lett</u> **14**(2): 79-85.
- Li, Q. R., J. Ma, et al. (2005). "Interleukin-2alpha receptor in membrane lipid rafts." <u>Transplant Proc</u> **37**(5): 2395-7.
- Liu, K. D., S. L. Gaffen, et al. (1998). "JAK/STAT signaling by cytokine receptors." <u>Curr</u> <u>Opin Immunol</u> 10(3): 271-8.
- Liu, K. D., S. L. Gaffen, et al. (1997). "Janus kinases in interleukin-2-mediated signaling: JAK1 and JAK3 are differentially regulated by tyrosine phosphorylation." <u>Curr Biol</u> 7(11): 817-26.
- Liu, Z. X., O. Azhipa, et al. (2001). "Extracellular nicotinamide adenine dinucleotide induces T cell apoptosis in vivo and in vitro." J. Immunol. 167(9): 4942-7.
- MacMillan-Crow, L. A. and J. A. Thompson (1999). "Immunoprecipitation of nitrotyrosinecontaining proteins." <u>Methods Enzymol</u> 301: 135-45.
- Margarit, S. M., W. Davidson, et al. (2006). "A steric antagonism of actin polymerization by a salmonella virulence protein." <u>Structure</u> 14(8): 1219-29.

- Martinez, L. O., S. Jacquet, et al. (2003). "Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis." <u>Nature</u> **421**(6918): 75-9.
- Matko, J., A. Bodnar, et al. (2002). "GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines." <u>Eur J</u> <u>Biochem</u> 269(4): 1199-208.
- Mikhail, N., K. Raska, Jr., et al. (1993). "Effect of verapamil on the IL-2 binding to its active receptor and on the release of IL-2 receptor by activated PBMC." <u>Immunopharmacology</u> 25(1): 29-36.
- Mueller-Dieckmann, C., H. Ritter, et al. (2002). "Structure of the ecto-ADP-ribosyl transferase ART2.2 from rat." J Mol Biol **322**(4): 687-96.
- Mueller-Dieckmann, C., T. Scheuermann, et al. (2002). "Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of rat ecto-ADP-ribosyltransferase 2 (ART2.2)." <u>Acta Crystallogr D Biol Crystallogr</u> **58**(Pt 7): 1211-3.
- Nakamura, Y., S. M. Russell, et al. (1994). "Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling." <u>Nature</u> **369**(6478): 330-3.
- Nashan, B. (2005). "Antibody induction therapy in renal transplant patients receiving calcineurin-inhibitor immunosuppressive regimens: a comparative review." <u>BioDrugs</u> **19**(1): 39-46.
- Nemoto, E., Y. Yu, et al. (1996). "Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function-associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells." J Immunol **157**(8): 3341-9.
- Noguchi, M., Y. Nakamura, et al. (1993). "Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor." <u>Science</u> **262**(5141): 1877-80.
- Nomura, T. and S. Sakaguchi (2005). "Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in tumor immunity." <u>Curr Top Microbiol Immunol</u> **293**: 287-302.
- Notredame, C., D. G. Higgins, et al. (2000). "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment." J Mol Biol **302**(1): 205-17.
- Ohlrogge, W., F. Haag, et al. (2002). "Generation and characterization of ecto-ADPribosyltransferase ART2.1/ART2.2-deficient mice." <u>Mol Cell Biol</u> 22(21): 7535-42.
- Okamoto, S., O. Azhipa, et al. (1998). "Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function." J <u>Immunol</u> **160**(9): 4190-8.
- Okazaki, I. J., H. J. Kim, et al. (1996). "Molecular characterization of a glycosylphosphatidylinositol-linked ADP-ribosyltransferase from lymphocytes." <u>Blood</u> **88**(3): 915-21.
- Osago, H., M. Terashima, et al. (2008). "A new detection method for arginine-specific ADPribosylation of protein -- a combinational use of anti-ADP-ribosylarginine antibody and ADP-ribosylarginine hydrolase." J Biochem Biophys Methods **70**(6): 1014-9.
- Osterloh, A. and M. Breloer (2008). "Heat shock proteins: linking danger and pathogen recognition." <u>Med Microbiol Immunol</u> **197**(1): 1-8.
- Otto, H., P. A. Reche, et al. (2005). "In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs)." <u>BMC Genomics</u> 6: 139.
- Paone, G., L. A. Stevens, et al. (2006). "ADP-ribosyltransferase-specific modification of human neutrophil peptide-1." J Biol Chem **281**(25): 17054-60.
- Paone, G., A. Wada, et al. (2002). "ADP ribosylation of human neutrophil peptide-1 regulates its biological properties." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **99**(12): 8231-5.
- Rickert, M., X. Wang, et al. (2005). "The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor." <u>Science</u> **308**(5727): 1477-80.

- Robb, R. J., C. M. Rusk, et al. (1988). "Structure-function relationships for the interleukin 2 receptor: location of ligand and antibody binding sites on the Tac receptor chain by mutational analysis." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 85(15): 5654-8.
- Romero, X., N. Zapater, et al. (2005). "CD229 (Ly9) lymphocyte cell surface receptor interacts homophilically through its N-terminal domain and relocalizes to the immunological synapse." J Immunol **174**(11): 7033-42.
- Roumier, A., J. C. Olivo-Marin, et al. (2001). "The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation." <u>Immunity</u> 15(5): 715-28.
- Russell, S. M., A. D. Keegan, et al. (1993). "Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor." <u>Science</u> **262**(5141): 1880-3.
- Sadlack, B., H. Merz, et al. (1993). "Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene." <u>Cell</u> **75**(2): 253-61.
- Sakaguchi, S. (2005). "Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self." <u>Nat Immunol</u> **6**(4): 345-52.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (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." <u>J Immunol</u> 155(3): 1151-64.
- Schaapveld, R. Q., A. M. van den Maagdenberg, et al. (1995). "The mouse gene Ptprf encoding the leukocyte common antigen-related molecule LAR: cloning, characterization, and chromosomal localization." <u>Genomics</u> 27(1): 124-30.
- Schwede, T., J. Kopp, et al. (2003). "SWISS-MODEL: An automated protein homologymodeling server." <u>Nucleic Acids Res</u> **31**(13): 3381-5.
- Seman, M., S. Adriouch, et al. (2003). "NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor." <u>Immunity</u> 19(4): 571-82.
- Sharfe, N., H. K. Dadi, et al. (1997). "Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 94(7): 3168-71.
- Smith, K. A. (1988). "Interleukin-2: inception, impact, and implications." <u>Science</u> **240**(4856): 1169-76.
- Stauber, D. J., E. W. Debler, et al. (2006). "Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 103(8): 2788-93.
- Streuli, M., N. X. Krueger, et al. (1992). "Expression of the receptor-linked protein tyrosine phosphatase LAR: proteolytic cleavage and shedding of the CAM-like extracellular region." <u>Embo J</u> 11(3): 897-907.
- Tavaria, M., T. Gabriele, et al. (1995). "Localization of the gene encoding the human heat shock cognate protein, HSP73, to chromosome 11." <u>Genomics</u> **29**(1): 266-8.
- Tigges, M. A., L. S. Casey, et al. (1989). "Mechanism of interleukin-2 signaling: mediation of different outcomes by a single receptor and transduction pathway." <u>Science</u> 243(4892): 781-6.
- Triantafilou, K., M. Triantafilou, et al. (2001). "A CD14-independent LPS receptor cluster." <u>Nat Immunol</u> **2**(4): 338-45.
- Waldmann, T. A. and J. O'Shea (1998). "The use of antibodies against the IL-2 receptor in transplantation." <u>Curr Opin Immunol</u> **10**(5): 507-12.
- Wan, Y. Y. and R. A. Flavell (2005). "Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **102**(14): 5126-31.
- Wang, H. M. and K. A. Smith (1987). "The interleukin 2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure." J Exp Med 166(4): 1055-69.

- Wang, X., M. Rickert, et al. (2005). "Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gammac receptors." Science **310**(5751): 1159-63.
- Wilkins, M. R., I. Lindskog, et al. (1997). "Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS--a World-Wide-Web-accessible tool." <u>Electrophoresis</u> 18(3-4): 403-8.
- Willerford, D. M., J. Chen, et al. (1995). "Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment." <u>Immunity</u> **3**(4): 521-30.
- Winau, F. and R. Winau (2002). "Emil von Behring and serum therapy." <u>Microbes Infect</u> 4(2): 185-8.
- Young, T. L. and R. M. Santella (1988). "Development of techniques to monitor for exposure to vinyl chloride: monoclonal antibodies to ethenoadenosine and ethenocytidine." <u>Carcinogenesis</u> 9(4): 589-92.
- Zhang, H., D. M. Conrad, et al. (2004). "Adenosine acts through A2 receptors to inhibit IL-2induced tyrosine phosphorylation of STAT5 in T lymphocytes: role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and phosphatases." J Immunol **173**(2): 932-44.
- Zhao, Z., J. Gruszczynska-Biegala, et al. (2005). "ADP-ribosylation of integrin alpha7 modulates the binding of integrin alpha7beta1 to laminin." <u>Biochem J</u> 385(Pt 1): 309-17.
- Zhu, M. H., J. A. Berry, et al. (1998). "Delineation of the regions of interleukin-2 (IL-2) receptor beta chain important for association of Jak1 and Jak3. Jak1-independent functional recruitment of Jak3 to II-2Rbeta." J Biol Chem 273(17): 10719-25.
- Zolkiewska, A. (2005). "Ecto-ADP-ribose transferases: cell-surface response to local tissue injury." <u>Physiology (Bethesda)</u> **20**: 374-81.
- Zou, G., E. de Leeuw, et al. (2007). "Toward understanding the cationicity of defensins. Arg and Lys versus their noncoded analogs." <u>J Biol Chem</u> **282**(27): 19653-65.

## 9. Anhang

### 9.1 Aminosäuresequenz der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine

Darstellung der per Massenspektrometrie identifizierten Peptide von putativen ART-Zielproteinen. Blau und fett, in dieser Arbeit beschrieben, Gelb hinterlegt, von P. Bannas beschrieben (Bannas 2007), Türkis unterlegt, von W. Koestner beschrieben (Koestner 2007).

#### **Thyrosine Phosphatase LAR**

1 MAPEPAPGRRMVPLVPALVMLGLMAGAHGDSKPVFVKVPEDQTGLSEGVASFVCQATGEP 61 KPRITWMKKGKKVSSORFEVIEFDDGAGSVLRIOPLRVORDEAIYECTATNSLGEINTSA 121 KLSVLEEDQLPSGFPTIDMGPQLKVVEKGRTATMLCAAGGNPDPEISWFKDFLPVDPAAS 181 NGRIKQLRSGALQIESSEESDQGKYECVATNSAGTRYSAPANLYVRVRVAPRFSIPPSS 241 QEVMPGGSVNLTCVAVGAPMPYVKWMMGAEELTKEDEMPVGRNVLELSNVMRSANYTCVA 301 ISSLGMIEATAQVTVKALPKPPIDLVVTETTATSVTLTWDSGNTEPVSFYGIQYRAAGTD 361 GPFQEVDGVASTRYSIGGLSPFSEYAFRVLAVNSIGRGPPSEAVRARTGEQAPSSPPRRV 421 QARMLSASTMLVQWEPPEEPNGLVRGYRVYYTPDSRRPLSAWHKHNTDAGLLTTVGSLLP 481 GVTYSLRVLAFTAVGDGPPSPTIQVKTQQGVPARSADFQANAESDTR**IQLSWLLPPQER**I 541 VKYELVYWAAEDEGQQHKVTFDPTSSYTLEDLKPDTLYRFQLAARSDLGVGVFTPTVEAX 601 TAQSTPSAPPQKVTCVSTGSTTVRVSWVPPPADSRNGIITQYSVAYEAVDGEDRKRHVVD 661 GISREHSSWDLLGLEKWTEYRVWVRAHTDVGPGPESSPVLVRTDEDVPSGPPRKVEVEPL 721 NSTAVHVSWKLPVPNKQHGQIRGYQVTYVRLENGEPRGQPIIQDVMLAEAQETTISGLTP 781 ETTYSITVAAYTTKGDGARSKPKVVTTTGAVPGRPTMMVSTTAMHTALLQWHPPKELPGE 841 LLGYRLQYRRADEARPNTIDFGKDDQHFTVTGLHKGATYVFRLAAKNRAGPGEEFEKEIT 901 TPEDVPSGFPONLRVTGLTTSTTELTWDPPVLAERNGXITNYTVVYRDINSOLELONVTN 961 DTHLTLLGLKPDTTYDIKVRAHTSKGAGPLSPSIQSRTMPVEQVFTKNFRVAAAMKTSVL 1021 LSWEVPDSYKSAVPFKILYNGOSVEVDGHSMRKLIADLOPNTEYSFVLMNRGSSAGGLOH 1081 LVSIRTAPDLLPQKPLPASAFIEDGRFSLSMPQVQDPSLVRWFYIVVVPIDRVGGNLLAP 1141 RWNTPEELELDELLEAIEQGEEKQRRRRRQAERLKPYVAAQVDVLPDTFTLGDKKSYRGF 1201 YNRPLSPDLSYQCFVLASLKEPMDQKRYASSPYSDEIVVQVTPAQQQEEPEMLWVTGPVL 1261 AVILIILIVIAILLFKRKRTHSPSSKDEQSIGLKDSLLAHSSDPVEMRRLNYQTPGMRDH 1321 PPIPITDLADNIERLKANDGLKFSQEYESIDPGQQFTWENSNSEVNKPKNRYADVIAYDH 1381 SRVLLTSIDGVPGSDYINANYIDGYRKQNAYIATQGPLPETMGDFWRMVWEQRTATVVMM 1441 TRLEEKSRVKCDQYWPVRGTETYGLIQVTLVDTVELATYTMRTFALHKSGSSEKRELROF 1501 OFMAWPDHGVPEYPTPILAFLRRVKACNPLDAGPMVVHCSAGVGRTGCFIVIDAMLERMK 1561 HEKTVDIYGHVTCMRSQRNYMVQTEDQYVFIHEALLEAAMCGHTEVLARNLYAHIQKLGQ 1621 VPPGESVTAMELEFKLLANSKAHTSRFVSANLPCNKFKNRLVNIMPYELTRVCLQPIRGV 1681 EGSDYINASFLDGYRQQKAYIATQGPLAESTEDFWRMLWEHNSTIIVMLTKLREMGREKC 1741 HQYWPAERSARYQYFVVDPMAEYNMPQYILREFKVTDARDGQSRTIRQFQFTDWPEQGVP 1801 KTGEGFIDXIGQVHKTKEQFGQDGPITVHCSAGVGRTGVFITLSIVLERMRYEGVVDMFQ 1861 TVKTLRTQRPAMVQTEDQYQLCYRAALEYLGSFDHYAT

#### **CD25**

1	MEPRLLMLGFLSLTIVPSCRAELCLYDPPEVPNATFKALSYKNGTILNCECKRGFRRLKE
61	$\label{eq:linear} \textbf{LVYMR} \texttt{CLGNSWSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTTTDMQKPTQSMHQENLTGH}$
121	${\tt CREPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQPQLTC}$
181	VDEREHHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTETTAMTETFVLTMEYKVAVA
241	SCLFLLISILLLSGLTWQHRWRKSRRTI

#### **CD229**

1MADLKRYWCGWALSPLSENPRMSQQQIFSPILWIPLLFLLMGLGASGKETPPTVISGMLG61GSVTFSLNISKDAEIEHITWNCPPKALALVSYKKDITILDKGYNGRLKVSEDGYSLYMSN121LTKSDSGSYYAQINQKNVTLTTNKEFTLHIYEKLQKPQIIVESVTPSDTDSCTFTLICTV181KGTKDSVQYSWTREDTHLNTYDGSHTLRVSQSVCDPDLPYTCKAWNPVSQNSSQPVRIWQ241FCTGASRKTAAGKTVVGILGEPVTLPLEFRATRATKNVVWFNTSVISQERRGAATADS301RRKPKGSEERRVRTSDQDQSLKISQLKMEDAGPYHAYVCSEASRDPSVRHFTLLVYKRLE361KSSVTNSPVHMMNGICKVVLTCSVDGGGNNVTYTWMPLQNKAVMSQGKSHLNVSWESGEH421LPNFTCTAHNPVSNSSSQFSSGTICSGPERNKRFWLLLLLVLLLMLIGGYFILRKKKQC481SSLATRYRQAEVPAEIPETPTGHGQFSVLSQRYEKLDMSAKTTRHQPTPTSDTSSESSAT541TEEDDEKTRIHSTANSRNQVYDLVTHQDIAHALAYEGQVEYEAITPYDKVDESMDEEDMA601YIQVSLNVQGETPLPQKKEDSNTIYCSVQKPKKTAQTPQQDAESPETPTYENFT

#### **DEC205**

1 MRTGRVTPGLAAGLLLLLRSFGLVEPSESSGNDPFTIVHENTGKCIOPLSDWVVAODCS 61 GTNNMLWKWVSQHRLFHLESQKCLGLDITKATDNLRMFSCDSTVMLWWKCEHHSLYTAAQ 121 YRLALKDGYAVANTNTSDVWKKGGSEENLCAQPYHEIYTRDGNSYGRPCEFPFLIGETWY 181 HDCIHDEDHSGPWCATTLSYEYDQKWGICLLPESGCEGNWEKNEQIGSCYQFNNQEILSW 241 KEAYVSCONOGADLLSIHSAAELAYITGKEDIARLVWLGLNOLYSARGWEWSDFRPLKFL 301 NWDPGTPVAPVIGGSSCARMDTESGLWQSVSCESQQPYVCKKPLNNTLELPDVWTYTDTH 361 CHVGWLPNNGFCYLLANESSSWDAAHLKCKAFGADLISMHSLADVEVVVTKLHNGDVKKE 421 IWTGLKNTNSPALFOWSDGTEVTLTYWNENEPSVPFNKTPNCVSYLGKLGOWKVOSCEKK 481 LRYVCKKKGEITKDAESDKLCPPDEGWKRHGETCYKIYEKEAPFGTNCNLTITSRFEQEF 541 LNYMMKNYDKSLRKYFWTGLRDPDSRGEYSWAVAQGVKQAVTFSNWNFLEPASPGGCVAM 601 STGKTLGKWEVKNCRSFRALSICKKVSEPQEPEEAAPKPDDPCPEGWHTFPSSLSCYKVF 661 HIERIVRKRNWEEAERFCQALGAHLPSFSRREEIKDFVHLLKDQFSGQRWLWIGLNKRSP 721 DLQGSWQWSDRTPVSAVMMEPEFQQDFDIRDCAAIKVLDVPWRRVWHLYEDKDYAYWKPF 781 ACDAKLEWVCQIPKGSTPQMPDWYNPERTGIHGPPVIIEGSEYWFVADPHLNYEEAVLYC 841 ASNHSFLATITSFTGLKAIKNKLANISGEEQKWWVKTSENPIDRYFLGSRRRLWHHFPMT 901 FGDECLHMSAKTWLVDLSKRADCNAKLPFICERYNVSSLEKYSPDPAAKVQCTEKWIPFO 961 NKCFLKVNSGPVTFSQASGICHSYGGTLPSVLSRGEQDFIISLLPEMEASLWIGLRWTAY 1021 ERINRWTDNRELTYSNFHPLLVGRRLSIPTNFFDDESHFHCALILNLKKSPLTGTWNFTS 1081 CSERHSLSLCQKYSETEDGQPWENTSKTVKYLNNLYKIISKPLTWHGALKECMKEKMRLV 1141 SITDPYQQAFLAVQATLRNSSFWIGLSSQDDELNFGWSDGKRLQFSNWAGSNEQLDDCVI 1201 LDTDGFWKTADCDDNQPGAICYYPGNETEEEVRALDTAKCPSPVQSTPWIPFQNSCYNFM 1261 ITNNRHKTVTPEEVQSTCEKLHPKAHSLSIRNEEENTFVVEQLLYFNYIASWVMLGITYE 1321 NNSLMWFDKTALSYTHWRTGRPTVKNGKFLAGLSTDGFWDIQSFNVIEETLHFYQHSISA 1381 CKIEMVDYEDKHNGTLPQFIPYKDGVYSVIQKKVTWYEALNACSQSGGELASVHNPNGKL 1441 **FLEDIVNRDGFPLWVGLSSHDGSESSFEWSDGR**AFDYVPWOSLOSPGDCVVLYPKGIWRR 1501 EKCLSVKDGAICYKPTKDKKLIFHVKSSKCPVAKRDGPQWVQYGGHCYASDQVLHSFSEA 1561 KOVCOELDHSATVVTIADENENKFVSRLMRENYNITMRVWLGLSOHSLDOSWSWLDGLDV 1621 TFVKWENKTKDGDGKCSILIASNETWRKVHCSRGYARAVCKIPLSPDYTGIAILFAVLCL 1681 LGLISLAIWFLLQRSHIRWTGFSSVRYEHGTNEDEVMLPSFHD

#### Hspa8

1	MSK <mark>GPAVGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTE</mark> RLIGDAAK <mark>NQVA</mark>
61	MNPTNTVFDAK <mark>RLIGRR</mark> FDDAVVQSDMKHWPFMVVNDAGRPKVQVEYKGETK <mark>SFYPEEVS</mark>
121	SMVLTKMKEIAEAYLGK <mark>TVTNAVVTVPAYFNDSQR</mark> QATK <mark>DAGTIAGLNVLR</mark> IINEPTAAA
181	IAYGLDKKVGAERNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNH
241	FIAEFKRKHKKDISENKRAVRR <mark>LRTACER</mark> AKRTLSSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITRA
301	R <mark>FEELNADLFR</mark> GTLDPVEKALRDAKLDK <mark>SQIHDIVLVGGSTR</mark> IPKIQKLL <mark>QDFFNGKELN</mark>
361	K <mark>SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK</mark> SENVQDLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTTI
421	PTKQTQTFTTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGK <mark>FELTGIPPAPR</mark> GVPQIEVTFDI
481	DANGILNVSAVDKSTGKENKITITNDKGRLSKEDIERMVQEAEKYKAEDEKQRDKVSSKN
541	${\tt SlesyAfnmkatvedeklqgkindedkqkildkcneiiswldknqtaekeefehqqkele}$
601	KVCNPIITKLYQSAGGMPGGMPGGFPGGGAPPSGGASSGPTIEEVD

#### ATP5B

1 MLSLVGRVASASASGALRGLSPSAALPQAQLLLRAAPAGVHPARDYAAQASAAPKAGTAT

- 61 GRIVAVIGAVVDVQFDEGLPPILNALEVQGRDSRLVLEVAQHLGESTVRTIAMDGTEGLV
- 121 RGQKVLDSGAPIKIPVGPETLGRIMNVIGEPIDERGPIKTKQFAPIHAEAPEFIEMSVEQ
- 181 EILVTGIKVVDLLAPYAKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGERT
- 241 REGNDLYHEMIESGVINLKDATSKVALVYGQMNEPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEGQD
- 301 VLLFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRIPSAVGYQPTLATDMGTMQERITTTKKGSITSVQAI
- 361 YVPADDLTDPAPATTFAHLDATTVLSR**AIAELGIYPAVDPLDSTSR**IMDPNIVGNEHYDV 421 ARGVQKILQDYKSLQDIIAILGMDELSEEDKLTVSRARKIQRFLSQPFQVAEVFTGHMGK
- 421 ARGVORTHODIRSHODIIAIHGMDEHSEEDRHIVSRARRIGRFHSGFFG 481 LVPLKETIKGFQQILAGEYDHLPEQAFYMVGPIEEAVAKADKLAEEHGS

#### Nucleolin

### 9.2 Übersicht der per Massenspektrometrie identifizierten putativen ART2-Zielproteine

**Tab. 10** Übersicht der in drei Arbeiten identifizierten ART2-Zielproteine. Dargestellt sind die Proteinnamen (Protein), die Zellen auf welchen die ADP-Ribosylierung beschrieben wurde (Zellname, mit Angabe entsprechend exprimierter ART), das angewendete Identifikationsverfahren (Affinitätsaufreinigung etheno-ADP-ribosylierter Proteine mit anschließender massenspektrometrischer Identifikation = MS, etheno-ADP-Ribosylierung mit anschließendem Immunoblot = 1G4-Blot), die Bestätigung der ADP-Ribosylierung durch Radioaktiv-Assay mit <sup>32</sup>P-NAD und spezifischer Immunpräzipitation (<sup>32</sup>P-Blot, Zielprotein bestätigt = pos, keine Bestätigung möglich = neg) und die zitierte Arbeit (Quelle: S. Okamoto (Okamoto, Azhipa et al. 1998), W.Koestner (Koestner 2007), P. Bannas (Bannas 2007) und A. Hann (vorliegende Arbeit)). Hervorgehoben sind die Proteine mit mittels Radioaktiv-Assay nachgewiesener ADP-Ribosylierung.

Protein	Zellen	Verfahren	<sup>32</sup> P-Blot	Quelle
CD8 (a Kette)	Jurkat <sup>hART1</sup>	1G4-Blot		W. Koestner
	T-Zellen (C57BL/6)		pos	S. Okamoto
CD11a	DC27.10 ART2.1	1G4-Blot		W. Koestner
	DC27.10 ART2.2			
	DC27.10 <sup>mART1</sup>			
	DC27.10 hART1			
	DC27.10 ART2.2	MS		P. Bannas
	DC27.10 ART2.2		pos	P. Bannas
	YAC-1			
	T-Zellen (BALB/c)			
	T-Zellen (C57BL/6)			
	T-Zellen (C57BL/6)		pos	S. Okamoto
CD18	DC27.10 ART2.2	MS		P. Bannas,
				W. Koestner
	DC27.10 ART2.1	1G4-Blot		W. Koestner
	DC27.10 ART2.2		pos	P. Bannas
	YAC-1			
	T-Zellen (BALB/c)			
	T-Zellen (C57BL/6)			
CD25	YAC-1	MS	pos	A. Hann
	HEK-T ART2.2		pos	A. Hann
	HEK-T ART2.1			
	CTLL-2 ART2.2			
	CTLL-2 <sup>MARTI</sup>			
	Kit 225 <sup>nAK11</sup>			
<b>CD27</b>	T-Zellen (C57BL/6)		pos	S. Okamoto
CD30	DC27.10 AK12.2	MS		P. Bannas
	YAC-1		neg	P. Bannas
CD31	DC27.10 AR12.2	MS		P. Bannas
	YAC-1		pos	P. Bannas
<b>CD43</b>	DC27.10 AR12.2	MS		P. Bannas
	YAC-1		neg	P. Bannas
	T-Zellen (C57BL/6)		pos	S. Okamoto
CD44	DC27.10 ART2.2	1G4-Blot		W. Koestner
	DC27.10 <sup>mART1</sup>			
	DC27.10 hART1			

	DC27.10 ART2.2	MS		P. Bannas
	YAC-1		pos	P. Bannas
	T-Zellen (C57BL/6)		pos	S. Okamoto
CD45	DC27.10 mART1	1G4-Blot	•	W. Koestner
	DC27.10 ART2.2	MS		P. Bannas
	YAC-1		pos	P. Bannas
	T-Zellen (C57BL/6)		pos	S. Okamoto
CD45 – AP	DC27.10 ART2.2	MS		P. Bannas
CD49f	DC27.10 ART2.2	MS		P. Bannas
CD51	DC27.10 ART2.2	MS		P. Bannas
	YAC-1		neg	P. Bannas
CD61	DC27 10 ART2.2	MS	8	P Bannas
CD71	DC27 10 ART2.2	MS	neg	P Bannas
CD90	DC27 10 ART2.2	MS	neg	P Bannas
<u>CD98</u>	DC27.10 <sup>ART2.2</sup>	MS	neg	P Bannas
	YAC-1	1110	nos	P Bannas
CD100	DC27 10 ART2.2	MS	pos	P Bannas
CD100	YAC-1	1110	nos	P Bannas
P2X7	DC27 10 ART2.2		pos	P Bannas
1 2/11	YAC-1		p03	I. Dumus
	T-Zellen (BALB/c)			
CD205	$DC27 10^{ART2.2}$	MS		W Koestner
CD205	DC27.10 ART2.2	MS		P Bannas
	VAC-1	NIG	nos	P Bannas
	VAC-1	MS	p03	Δ Hann
CD229	DC27 10 ART2.2	MS		P Bannas
(122)	$VAC_{-1}$	MS		A Hann
	VAC-1	WID	nos	P Bannas
	1770-1		pos	A Hann
Thyrosin-phosphatase	VAC-1	MS		A Hann
LAR	1710 1	NIG		
Nucleolin	YAC-1	MS		A Hann
Neuropilin-1	DC27 10 ART2.2	MS		W Koestner
Hsna8	YAC-1	MS		A Hann
lispuo	DC27 10 ART2.2	MS		W Koestner
Hsn84	DC27.10 ART2.2	MS		W Koestner
gPr80 envelope	DC27.10 ART2.2	MS		W. Roestier
polyprotein	DC27.10	NIG		
ATP5B	YAC-1	MS		A Hann
Fzrin	YAC-1	MS		A Hann
Moesin	YAC-1	MS		A Hann
Myosin	DC27 10 ART2.2	MS		P Bannas
Galectin 9	DC27.10 ART2.2	MS		P Bannas
RS9	DC27.10 ART2.2	MS		P Bannas
hnRNP	DC27.10 ART2.2	MS		P Rannas
FWSRI	DC27.10 ART2.2	MS		P Bannas
DFAD	DC27.10 ART2.2	MS		P Bannas
fusl P	DC27.10 ART2.2	MS		P Bannas
LACTR	DC27.10 ART2.2	MS		P Bannas
	DC27.10	1410		r. Dannas

Trkfp	DC27.10 ART2.2	MS	P. Bannas
Threonyl-tRNA	YAC-1	MS	A. Hann
synthetase			
Citrate synthase	YAC-1	MS	A. Hann
p100 co-activator	YAC-1	MS	A. Hann
Elongation factor 2	YAC-1	MS	A. Hann
Transcription intermediary	YAC-1	MS	A. Hann
factor 1-beta			
eukaryotic translation	YAC-1	MS	A. Hann
elongation factor 1 alpha 1			
Aktin	DC27.10 ART2.2	MS	P. Bannas
Tubulin alpha-1A chain	YAC-1	MS	A. Hann
Tubulin beta-4 chain	YAC-1	MS	A. Hann

# 9.3 Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADPR	ADP-Ribose
APC	Antigen Präsentierende Zelle
ARH	ADP-Ribosyl-X Hydrolase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Mischung gleicher Stoffmengen der vier Desoxynukleosid- Triphosphaten für die PCR
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
$(Fab')_2$	Bivalentes antigenbindendes Antikörperfragment
eNAD	etheno-NAD
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
mAb	Monoklonaler Antikörper
mART	Mono-ADP-Ribosyltransferasen
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NAADP	Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid-2'-Phosphat
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-2'-Phosphat
NC	Nitrocellulosemembran
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektorphorese
PAR	Poly-ADP-Ribose
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TRIS	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)
U	Unit

# 10. Lebenslauf

### Persönliche

Daten	
Name:	Alexander Hann
Geburtsdatum:	24. November 1980
Geburtsort:	Jasi (Rumänien)
Nationalität:	deutsch
Adresse:	Eilbektal 10 D, 22089 Hamburg
Telefon	+49-(0)40-298 10 710
Email	a.hann@uke.uni-hamburg.de
Schulbildung	
1987 – 2001	Abschluss am Gymnasium Grootmoor in Hamburg mit der Allgemeinen Hochschulreife, Leistungsfächer Biologie und Chemie
Zivildienst	
2001 - 2002	Zivildienst im Berufsförderungswerk Hamburg
Studium	
2002	Immatrikulation für das Studienfach Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg – Eppendorf (UKE) im WS 2002
Aug. 2004	Erfolgreiches Absolvieren des vorklinischen Studiumsabschnittes mit dem Physikum
Nov. 2008	Erfolgreiches Absolvieren des klinischen Studiumsabschnittes mit erfolgreichem Absolvieren des Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Famulaturen	
Juli – Sept. 2003	Pflegedienstpraktikum im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
Juli 2005	Innere Medizin Abteilung mit angeschlossener Endoskopie, Krankenhaus Elim, Diakonie-Klinikum Hamburg
Aug. 2005	Abteilung für Allgemeinchirurgie und Endoprothetik, endogap Klinik für Gelenkersatz, Klinikum Garmisch-Partenkirchen
Aug. 2006	Innere Medizin, Hausarztpraxis Dr. med. Klaus Buchholz, Hamburg
Dez. 2006	Notaufnahme der Abteilung für Allgemeine Innere Medizin, Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg
Praktisches Jahr	6, 6
Aug. – Sept. 2007	Acht Wochen medical rotation in der Innere Medizin Abteilung des California Pacific Medical Center, San Francisco
Okt. – Dez. 2007	Acht Wochen medical rotation in der Gastroenterologie Abteilung des VA Greater Los Angeles Healthcare System und der Hepatologie Abteilung, University of California, Los Angeles Medical Center
Dez. 2007 – März 2008	Vier Monate, Chirurgische Klinik, Israelitisches Krankenhaus, Hamburg einschließlich Aufenthalten in der Anästhesiologie und der Radiologie
Apr. – Aug. 2008	Vier Monate, Neurologie Abteilung, Asklepios Klinik Wandsbek, Hamburg

Zusätzliche	
Qualifikationen	
2003 – 2004	<ul> <li>Zusatzqualifikation in den Grundlagen der Molekularen Medizin, UKE</li> <li>Zweiwöchiger Kurs: Molekularbiologie, Institut für Biochemie und Molekularbiologie I - Zelluläre Signaltransduktion</li> <li>Zweiwöchiger Kurs: Molekulare Zellbiochemie und Zelluläre Signaltransduktion, Institut für Biochemie und Molekularbiologie I - Zelluläre Signaltransduktion</li> <li>Zweiwöchiger Kurs: Molekulare Physiologie, Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie</li> <li>Zweiwöchiger Kurs: Molekulare Anatomie, Institut für Anatomie II - Experimentelle Morphologie</li> </ul>
Okt. – Dez. 2004 Apr. – Juli 2005	Kurs Sektionsübungen für Mediziner, Institut für Rechtsmedizin, UKE Experimentelles Laborpraktikum, Arbeitsgruppe Telomer- und
	Stammzellbiologie, Medizinische Klinik II - Onkologie Hämatologie, UKE
24. Mai 2007	Erfolgreiches Absolvieren des Amerikanischen Medizin-Staatsexamens USMLE Step 1
Dissertation	
Seit Apr. 2006	Die posttranslationale Modifikation des IL-2-Rezeptors durch ADP- Ribose, Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie, Leiter: Prof. Dr. med. Friedrich Nolte, Institut für Immunologie, UKE
Sept. – Okt. 2006	Wissenschaftlicher Aufenthalt, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michel Seman, INSERM U905- Faculté de Médecine et Pharmacie, Université de Rouen, Frankreich
Zusatz-	
informationen	
Sport	Volleyball, Skifahren, Mountainbiken, Bergwandern
Computer-	MS Office (Word, Excel, PowerPoint), Photoshop, Canvas, DNA-Star,
kenntnisse	MySQL Datenbank, PHP Programmiersprache
Sprachen	Deutsch (Muttersprache)
	Kumanisch (Muttersprache)
	Französisch (erweiterte Kenntnisse)

# 11. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift