

**Die strukturelle und funktionelle
Charakterisierung der ADP-Ribosylierung von
humanem Tumor-Nekrose-Faktor durch
ADP-Ribosyltransferase-1**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Universität Hamburg
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie

vorgelegt von
Sabrina Laing
aus Friesoythe

Hamburg 2010

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Prof. Dr. F. HAAG
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Prof. Dr. G. ADAM
Tag der Disputation: 08. Oktober 2010

Hamburg, den 23. September 2010



A. Temming
Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Fachbereichs Biologie

Dank

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Friedrich Haag für die Überlassung des sehr interessanten Arbeitsthemas, die hervorragende Betreuung und die große Unterstützung in allen Phasen meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Günter Adam danke ich für seine Bereitschaft, das Zweitgutachten für diese Dissertation zu verfassen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Friedrich Nolte für die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Tipps bei praktischen Problemen.

Herrn Prof. Friedrich Buck und Herrn Dr. Christian Schulze möchte ich jeweils für die sehr fruchtbare und hilfsbereite Kooperation danken, ohne die einige der in dieser Arbeit dargestellten Daten nicht zustande gekommen wären.

Herrn Prof. Michel Seman und Herrn Dr. Sahil Adriouch danke ich für die nette Aufnahme und die konstruktive Zusammenarbeit während meines Aufenthaltes in der Arbeitsgruppe „Physiopathologie et biothérapies des maladies inflammatoires et autoimmunes“ an der Université de Rouen.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die finanzielle Unterstützung, die mir die Durchführung dieses Forschungsprojektes ermöglichte.

Allen Mitarbeitern am Institut für Immunologie möchte ich für die hilfreichen wissenschaftlichen Ratschläge und Diskussionen und für das wirklich tolle Arbeitsklima danken. Insbesondere danke ich Nicole Schwarz, Fabienne Seyfried, Janusz Wesolowski, Marion Nissen und Björn Rissiek für die sehr schöne und freundschaftliche Zeit am Institut für Immunologie. Bei Fenja Braasch möchte ich mich für die sehr gute Einarbeitung zu Beginn meiner Doktorarbeit bedanken.

Weiterhin möchte ich meiner Mutter, Rita Laing und meiner Schwester, Katharina Laing, Marion Bolten und Carina Figge für ihr Verständnis und die Ermutigung, die sie mir während des Studiums und der Promotionszeit zuteil werden ließen, sehr danken. Nikolaus Reichl danke ich für die großartige und wertvolle Unterstützung während der Endphase meiner Promotion.

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	- 1 -
1.1	Abstract	- 2 -
2.	Einleitung	- 3 -
2.1	Tumor-Nekrose-Faktor und seine Rezeptoren	- 3 -
2.1.1	Die Rolle von TNF im Immunsystem	- 3 -
2.1.2	Strukturelle Eigenschaften von TNF	- 5 -
2.1.3	Die TNF-Rezeptoren	- 6 -
2.1.4	TNFR1-Signaltransduktionswege	- 7 -
2.1.5	TNFR2-Signaltransduktionswege	- 10 -
2.2	ADP-Ribosyltransferasen	- 12 -
2.2.1	Die ADP-Ribosylierungsreaktion	- 12 -
2.2.2	ADP-Ribosyltransferasen	- 13 -
2.2.3	humane ADP-Ribosyltransferase-1 (hART1)	- 15 -
3.	Materialien	- 16 -
3.1	Laborgeräte	- 16 -
3.2	Verbrauchsmaterialien	- 17 -
3.3	Chemikalien	- 18 -
3.4	Puffer, Lösungen, Medien	- 20 -
3.5	Reagenzsysteme (Kits)	- 22 -
3.6	Antikörper/Streptavidin-Konjugate	- 22 -
3.7	Primer/Vektoren	- 24 -
3.8	Enzyme	- 25 -
3.9	Zelllinien und Bakterienstämme	- 26 -
4.	Methoden	- 27 -
4.1	Proteinbiochemische und immunologische Methoden	- 27 -
4.1.1	Immunpräzipitation	- 27 -
4.1.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	- 27 -
4.1.3	Coomassie-Färbung	- 28 -
4.1.4	Western-Blot	- 28 -
4.1.5	Silberfärbung	- 29 -
4.1.6	Immunodetektion	- 29 -
4.1.7	Affinitätschromatographie	- 30 -
4.1.8	Dialyse mittels Slide-A-Lyzer®-Dialyse-Kassetten	- 30 -
4.1.9	ELISA	- 31 -
4.2	Molekularbiologische Methoden	- 31 -
4.2.1	Transformation von Bakterien	- 31 -
4.2.2	Zielgerichtete Mutagenese	- 32 -
4.2.3	DNA-Gelelektrophorese	- 33 -
4.2.4	Präparation von Plasmid-DNA	- 34 -
4.2.5	DNA-Sequenzierung	- 34 -

4.3	Methoden der Zellkultur	- 34 -
4.3.1	Allgemeine Bedingungen der Zellkultur	- 34 -
4.3.2	Auftauen und Einfrieren eukaryotischer Zellen	- 35 -
4.3.3	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	- 35 -
4.3.4	Herstellung von Zelllysaten	- 36 -
4.3.5	“Fluorescence Activated Cell Sorting” (FACS) -Analysen	- 37 -
4.3.6	Proteinproduktion löslicher TNF-Mutanten	- 39 -
4.3.7	Proteinproduktion von löslicher ART1	- 39 -
4.4	ADP-Ribosylierungen	- 40 -
4.4.1	1G4-Assay zum Nachweis ethenoADP-ribosylierter Proteine im Western-Blot	- 40 -
4.4.2	TNF-Mutationsanalysen mit radioaktiv markiertem NAD	- 41 -
4.4.3	Herstellung „prä-ADP-ribosylierter“ TNF-Proben	- 42 -
4.5	Bindungs- und Funktions-Untersuchungen	- 43 -
4.5.1	Blockade der TNF-Rezeptoren	- 43 -
4.5.2	TNF-Zelloberflächenbindungsassay	- 43 -
4.5.3	TNFR-Fc-Zelloberflächenbindungsassay	- 44 -
4.5.4	Zytotoxizitätsassay	- 45 -
4.5.5	Aktivierungsassay peripherer Granulozyten	- 46 -
4.5.6	NF- κ B-Aktivierungsassay	- 47 -
4.6	Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie	- 48 -
4.7	Massenspektrometrie	- 49 -
5.	Ergebnisse	- 51 -
5.1	Funktionelle Konsequenzen der ADP-Ribosylierung von TNF durch ADP-Ribosyltransferase-1	- 51 -
5.1.1	ADP-Ribosylierung von TNF durch ADP-Ribosyltransferase-1	- 51 -
5.1.2	Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die Bindung an beide TNF-Rezeptoren	- 53 -
5.1.3	Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf den TNF-vermittelten Zelltod	- 58 -
5.1.4	Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die Aktivierung humaner peripherer Blutleukozyten (PBLs)	- 61 -
5.1.5	Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade	- 67 -
5.1.6	Welcher TNF-Rezeptor wird durch die ADP-Ribosylierung von TNF beeinflusst?	- 69 -
5.1.7	Einfluss der ADP-Ribosylierung auf Zelloberflächen von Zielzellen auf TNF-induzierte Effekte	- 78 -
5.2	Bestimmung der ADP-Ribosylierungsstelle(n) im TNF-Molekül	- 83 -
5.2.1	Massenspektrometrie	- 84 -
5.2.2	Identifikation der Ziel-Arginine im TNF durch Mutationsanalysen	- 89 -
5.2.3	Bindung und biologische Wirkung der TNF-Mutanten	- 91 -
5.2.4	Hinweise auf eine weitere ADP-Ribosylierungsstelle im TNF-Molekül	- 96 -

6.	Diskussion	- 99 -
6.1	Der Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die TNFR-Bindung	- 99 -
6.1.1	Interaktion von TNF mit rekombinanten TNFR-Fc-Fusionsproteinen	- 100 -
6.1.2	TNF-Oberflächenbindung an KIT225-Zellen	- 101 -
6.1.3	TNF-Oberflächenbindung an TNFR-transfizierte HEK293-Zellen	- 102 -
6.1.4	Zusammenfassung der Bindungsstudien	- 103 -
6.2	Die funktionellen Konsequenzen der ADP-Ribosylierung von TNF	- 104 -
6.2.1	Auswirkung der ADP-Ribosylierung auf TNF Effektorfunktionen	- 105 -
6.2.2	Charakterisierung der Effektorfunktionen mit Hilfe TNFR-spezifischer Antikörper	- 107 -
6.2.3	Zusammenfassung des Abschnitts 6.2	- 109 -
6.3	Strukturelle Konsequenzen der ADP-Ribosylierung von TNF durch ART1	- 111 -
6.3.1	Identifikation der Ziel-Arginine im TNF	- 111 -
6.3.2	Die an der TNFR-Bindung beteiligten Aminosäure-Reste im TNF	- 113 -
6.3.3	Zusammenfassung des Abschnitts 6.3	- 116 -
6.4	Struktur-Funktions-Untersuchungen durch Mutationen der Ziel-Arginine	- 116 -
6.4.1	Die Mutation von R6	- 117 -
6.4.2	Die Mutation von R32	- 117 -
6.4.3	Zusammenfassung des Abschnitts 6.4	- 118 -
6.5	Topologische Aspekte der ADP-Ribosylierung von TNF durch ART1	- 119 -
6.5.1	Zusammenfassung des Abschnitts 6.5	- 120 -
6.6	Zusammenfassung und Ausblick	- 120 -
7.	Literatur	- 123 -
8.	Anhang	- 135 -
8.1	Massenspektrometrische Daten	- 135 -
8.2	Abkürzungen und Anglizismen	- 138 -
8.3	Einbuchstaben-Bezeichnungen der Aminosäuren	- 144 -

1. Zusammenfassung

ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) können die Funktion von Proteinen modulieren, indem sie ADP-Ribose von Nikotinamid-Adenindinukleotid (NAD) auf einen spezifischen Aminosäure-Rest ihres Zielproteins übertragen. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass das humane Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) ein Zielprotein der humanen ART1 ist, und dass die ADP-Ribosylierung von TNF dosisabhängig sowohl die Bindung an seine Rezeptoren als auch seine biologischen Funktionen beeinflusst.

Die Modifikation hemmte die Bindung von TNF an beide TNF-Rezeptoren (TNFRs) in verschiedenen experimentellen Systemen. Dabei waren Stärke und Rezeptorselektivität des Effekts in den einzelnen untersuchten Systemen stark vom Kontext der Rezeptor/Liganden-Interaktion abhängig. Ebenso hemmte die ADP-Ribosylierung die biologischen Wirkungen von TNF auf Zielzellen, wie den Zelltod, die Aktivierung primärer humaner Granulozyten, und, als molekulares Korrelat seiner Aktivität, die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges.

In Bezug auf zwei der untersuchten TNF-Effektorfunktionen, den TNF-induzierten Zelltod einer humanen T-Lymphom-Zelllinie, sowie die Induktion des CD62L-*Sheddings* auf Granulozyten, zeigte die ADP-Ribosylierung unterschiedliche Auswirkungen: niedrige NAD-Konzentrationen (4 μ M) hemmten den Zelltod, ließen aber das CD62L-*Shedding* unbeeinflusst. Diese beiden Effektorfunktionen zeigten auch beim Einsatz von anti-TNF-Rezeptor-Antikörpern unterschiedliche Reaktionsmuster. Sowohl TNFR1- als auch TNFR2-spezifische Antikörper hatten eine vorwiegend antagonistische (TNF-blockierende) Wirkung auf den Zelltod, jedoch eine starke agonistische Wirkung auf das CD62L-*Shedding*. Diese Beobachtungen zeigen, dass beide TNF-Rezeptoren an der Vermittlung beider Effektorfunktionen beteiligt sind, und deuten darauf hin, dass die Wirkung der ADP-Ribosylierung von TNF nicht receptorspezifisch ist, sondern vom zellulären Kontext, in dem die Interaktion von TNF mit seinen Rezeptoren stattfindet, abhängt.

Durch massenspektrometrische Untersuchungen wurden zwei Arginine, R6 und R32, als ADP-Ribosylierungsstellen im TNF identifiziert. Mutationsanalysen bestätigten die Identität dieser beiden Zielarginine, zeigten jedoch die Existenz mindestens einer weiteren ADP-Ribosylierungsstelle auf. Untersuchungen mit TNF-Mutanten zeigten, dass die Mutation von R32 zu Lysin die Bindung an TNFR2 sowie die Funktionen von TNF beeinflusste, und dass die ADP-Ribosylierung an der Position 32 für die Wirkung auf das TNF-induzierte CD62L-*Shedding* funktionell relevant ist.

Die ADP-Ribosylierung stellt einen bisher unbekannten, vielschichtigen Mechanismus zur Regulation des TNF/TNFR-Systems dar. Die vorgelegte Arbeit legt den Grundstein für weitere Untersuchungen, in denen es darauf ankommen wird, die biologischen Situationen zu definieren, in denen dieser Regulationsmechanismus wirksam wird.

1.1 Abstract

ADP-ribosyltransferases (ARTs) modulate the function of proteins by transferring an ADP-ribose moiety from nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) to a specific amino acid residue of a target protein. This thesis shows that the human cytokine tumor necrosis factor (TNF) is a target protein for ADP-ribosylation by human ART1, and that this modification affects the binding of TNF to its receptors and its biological functions in a dose-dependent manner.

The modification blocked the binding of TNF to both TNF-receptors (TNFRs) in different experimental systems. The intensity of the effects and their receptor selectivity differed in the experimental systems investigated, and were highly dependent on the context of the receptor/ligand interaction. In addition, ADP-ribosylation blocked the biological effects of TNF on target cells, such as cell death, the activation of primary human granulocytes, and, as a molecular correlate of its activity, the activation of the NF- κ B signalling.

ADP-ribosylation showed different effects on two functions of TNF, the induction of cell death in a human T-lymphoma cell line and the induction of CD62L-shedding on granulocytes, in that low concentrations of NAD (4 μ M) blocked cell death, but left CD62L-shedding unaffected. These two functions were affected differently by anti-TNF-receptor-specific antibodies. Both TNFR1- and TNFR2-specific antibodies had predominantly antagonistic effects on cell death, but highly agonistic effects on CD62L-shedding. These observations show that both TNF-receptors are involved in mediating both effector functions, and suggest that the effects of ADP-ribosylation of TNF are not receptor-specific, but depend on the cellular context in which the interaction of TNF with its receptors takes place.

Two arginines, R6 and R32, were identified as ADP-ribosylation sites in TNF by mass spectrometry. Mutational analysis confirmed the identity of these two target arginines, but showed the existence of at least one more ADP-ribosylation site.

The conservative mutation of R32 to lysin affected both the binding of TNF to TNFR2 and its functions. In addition, it was shown that ADP-ribosylation of R32 is necessary and sufficient for the effect of the modification on TNF-induced CD62L-shedding.

ADP-ribosylation constitutes a so far unknown, complex mechanism for the regulation of the TNF/TNFR system. This dissertation lays the foundation for further investigations to define the biological situations, in which this regulatory mechanism may be effective.

2. Einleitung

2.1 Tumor-Nekrose-Faktor und seine Rezeptoren

2.1.1 Die Rolle von TNF im Immunsystem

Das Immunsystem ist das körpereigene Abwehrsystem von Organismen gegen eingedrungene Pathogene. In Vertebraten wird zwischen dem angeborenen Immunsystem, das eine erste, schnelle Verteidigungslinie darstellt und dem erworbenen Immunsystem, das langsamer, aber spezifischer reagiert und dessen besondere Rolle in der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses liegt, unterschieden. Das erworbene Immunsystem besitzt aufgrund von DNA-Neuanordnungen (somatische Rekombination) ein großes Repertoire an T- und B-Zellrezeptoren, die eine Vielzahl verschiedener Antigene hochspezifisch erkennen. Wird eine T- oder B-Zelle über ihren spezifischen Antigen-Rezeptor durch ein passendes Pathogen, unter Anwesenheit von ko-stimulatorischen Molekülen aktiviert, proliferiert die Zelle und übt, abhängig von der Zellart (T-Helferzelle, zytotoxische T-Zelle, B-Plasmazelle) verschiedene Effektorfunktionen aus, die schließlich zur Eliminierung des Pathogens führen. Das angeborene Immunsystem dagegen erkennt konservierte, invariante Merkmale von Mikroorganismen über Keimbahn-codierte Rezeptoren, die als PRRs (*pattern recognition receptors*) zusammengefasst werden. Die Aktivierung über die PRRs kann direkt zur Lyse oder Phagozytose der Pathogene führen. Außerdem werden lösliche Faktoren ausgeschüttet, die u.a. weitere Zellen sowohl des angeborenen, als auch des erworbenen Immunsystems rekrutieren und aktivieren. Eine wesentliche Rolle spielt hierbei die Klasse der Zytokine, zu denen neben Interferonen (IFN), Interleukinen (IL), koloniestimulierenden Faktoren (CSF) und Chemokinen, die Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Familie gehört [1].

Das TNF selbst wurde im Jahr 1975 aufgrund seiner Fähigkeit, die Nekrose von Tumorzellen auszulösen, identifiziert und charakterisiert [2]. Später zeigte sich, dass die Hauptfunktion des TNF nicht zytotoxischer, sondern pro-inflammatorischer Natur ist. TNF ist ein pleiotropes Molekül, das abhängig vom Zell-Typ, der jeweiligen Umgebung und der Dauer des Signals eine Vielzahl unterschiedlicher, teils gegensätzlicher Wirkungen vermittelt [3, 4]. TNF wird vor allem von aktivierten Makrophagen aber auch von vielen anderen Zellen hematopoetischen und nicht-hematopoetischen Ursprungs, wie Monozyten, T- und B-Zellen, NK-Zellen, Neutrophilen, Astrozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen, als Antwort auf Entzündungen, Infektionen, Verletzungen und andere Stressfaktoren exprimiert [5]. TNF besitzt wiederum Effekte auf fast alle Zellarten, in denen es die Zellaktivierung, den Zelltod oder die Expression pro-inflammatorischer Gene induzieren kann (Abb. 2. 1).

Viele der pro-inflammatorischen Wirkungen von TNF können durch die Effekte, die TNF auf das Gefäßendothel und die Wechselwirkung von Endothelzellen und Leukozyten besitzt, erklärt werden [6]. Als Antwort auf TNF setzen Endothelzellen

Chemokine frei und ändern das Expressionsmuster ihrer Adhäsionsmoleküle, was zur Rekrutierung bzw. verstärkten Bindung verschiedener Leukozytenpopulationen an die Gefäßwände führt und die Extravasation ins Gewebe erleichtert [7, 8]. Außerdem sensitiviert TNF Endothelzellen für VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und induziert die Expression von Cyclo-Oxygenase 2 (Cox-2), die die Produktion von Prostaglandinen anregt, was wiederum zu einer Permeabilisierung und Erweiterung der Blutgefäße führt [9, 10]. Somit trägt TNF durch den erhöhten Blutfluss und das erleichterte Einwandern von Leukozyten in das entzündete Gewebe lokal zu den typischen Merkmalen einer Entzündung (Rötung, Wärme, Schwellung, Schmerz) bei [6].

TNF besitzt eine wichtige Rolle in der Verteidigung gegen unterschiedliche Pathogene, wie *M. tuberculosis*, *S. aureus* und *L. monocytogenes* [11-13]. Studien in Mausinfektionsmodellen mit unterschiedlichen Mykobakterien haben gezeigt, dass in TNF-defizienten Mäusen die Granulombildung wesentlich beeinträchtigt ist [14]. Granulome, hauptsächlich bestehend aus aktivierten T-Zellen und Makrophagen, stellen eine Mikroumgebung dar, die essentiell für die Beschränkung des mykobakteriellen Wachstums ist. Es wurde gezeigt, dass TNF die Chemokin- und Adhäsionsmolekül-Produktion stimuliert, was zur Rekrutierung von inflammatorischen Zellen und zur festen Granulombildung führt [15]. TNF erhöht außerdem die Fähigkeit von Makrophagen, die Mykobakterien zu phagozytieren und zu töten [16], und regt die Differenzierung spezifischer T-Zellen an, die wiederum die geeigneten T-Helferzellen1 (T_H1)-Zytokine sekretieren [17].

TNF ist auch an der Herunterregulation des Immunsystems nach einer erfolgreichen Antwort beteiligt [18] und kann unter bestimmten Bedingungen Immunantworten eher supprimieren als stimulieren [19]. Außerdem spielt TNF eine Rolle in der Entwicklung und Organisierung der sekundären lymphatischen Organe, in denen die erworbene Immunantwort initiiert wird [20].

Die pleiotrope Wirkung von TNF zeigt sich nicht nur anhand der Reihe nützlicher Effekte für den Organismus, sondern auch in den zahlreichen akuten, chronischen und Autoimmun-Erkrankungen, die mit einer Dysregulation von TNF assoziiert sind. So ist TNF, systemisch verabreicht, an der Auslösung des septischen Schocks und, bei andauernden, niedrigen Konzentrationen, an der Ausbildung der Kachexie beteiligt [21]. Während bei Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, Morbus Crohn und Psoriasis die Behandlung mit TNF-neutralisierenden Molekülen zu therapeutischen Erfolgen führt [22-25], geht bei der multiplen Sklerose und beim systemischen Lupus Erythematosus die Neutralisierung von TNF mit einer Verschlechterung des Krankheitsbildes einher [26]. TNF ist an Gewebeerstörungen, wie beispielsweise in der Leber beteiligt, obwohl TNF gleichzeitig wichtig für die Proliferation von Hepatozyten in der Leber-Regeneration ist [27]. TNF vermittelt nicht nur den Zelltod von Tumorzellen, sondern fördert auch Tumorentwicklung, durch eine direkte Wachstumsstimulation bestimmter Tumorzellen und vor allem durch seine starken pro-inflammatorischen Aktionen [28, 29].

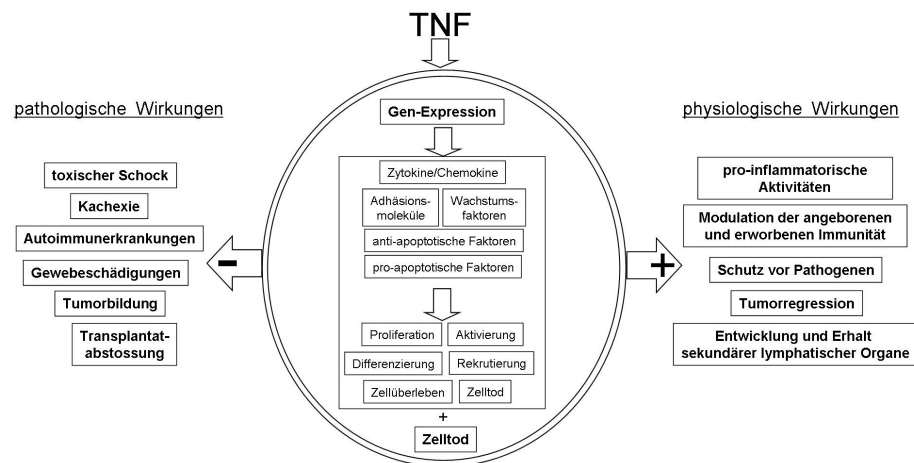


Abb. 2. 1 Übersicht der biologischen Wirkungen von TNF

2.1.2 Strukturelle Eigenschaften von TNF

TNF wurde im Jahr 1984 kloniert und zeigte 30 % Sequenzhomologie zu Lymphotoxin (LT) [30, 31]. Die spätere Klonierung anderer Zytokine hatte gezeigt, dass TNF und LT zu einer großen Familie mit 19 Mitgliedern gehört, deren Namensgeber das TNF wurde (TNF-Ligandenfamilie) [32]. Die charakteristische Gemeinsamkeit der Familienmitglieder ist die konservierte extrazelluläre TNF-Homologie-Domäne (THD), die den Aufbau in homotrimere Moleküle und die Rezeptor-Bindung vermittelt. Das TNF-Monomer besteht aus zwei antiparallelen beta-Faltblättern mit antiparallelen beta-Strängen, die eine so genannte „jelly-roll“ beta-Struktur formen, die typisch für die TNF-Ligandenfamilie ist, aber auch in viralen Hüllproteinen vorkommt [33, 34]. Das Einzelkopien-Gen von TNF, das sich beim Menschen auf dem Chromosom 6 innerhalb des MHC-Lokus (*Major-Histocompatibility-Complex*) befindet, ist ungefähr 3 kb groß und enthält 4 Exons, die durch drei Introns getrennt sind. Mehr als 80 % der reifen TNF-Sequenz liegt im Exon 4, wobei Exon 1 und Exon 2 hauptsächlich die *Leader-Peptid*-Sequenzen enthalten [35].

TNF wird zunächst als Typ-II Transmembranprotein produziert, welches stabil als Homotrimer vorliegt (mTNF, Monomer: 233 Aminosäuren, 26 kDa) und bioaktiv ist. [36-38]. Die Transmembran-Domäne (TM) des Pro-TNF wird von den Aminosäuren -44 bis -26 und der kurze zytoplasmatische Teil von den Aminosäuren -76 bis -50 der TNF-Presequenz gebildet [39]. Lösliches TNF (sTNF; 157 Aminosäuren), wird durch die Metalloprotease TACE (*TNF- α converting enzyme*; auch als ADAM17 bezeichnet: *a disintegrin and metalloproteinase*) proteolytisch von der Zelloberfläche freigesetzt [40, 41] (s. Abb. 2. 2). ADAM17 stellt die Haupt-„*Sheddase*“ dar, aber auch andere Mitglieder der ADAM-Familie können TNF von der Zelloberfläche spalten (ADAM10, 9, 8) [42]. sTNF, dessen Kristallstruktur 1989 aufgeklärt wurde [43, 44], liegt unter physiologischen Bedingungen stabil als nicht-kovalent verknüpftes Trimer,

mit einer molaren Masse von ca. 52 kDa vor und stellt die Rezeptor-bindende und biologisch aktive Form des TNF dar. Erst unterhalb des nanomolaren Bereichs dissoziiert TNF in seine 17 kDa großen Monomere und verliert dabei seine Bioaktivität [45, 46]. Das mTNF wird an einem spezifischen Cystein-Rest in der intrazellulären Domäne von TNF palmitoyliert [47]. Zusätzlich wird ein Serin-Rest in der intrazellulären Domäne von mTNF phosphoryliert [48]. Diese posttranslationalen Modifikationen (PTMs) könnten für die Regulation der mTNF-Funktion wichtig sein [49]. PTMs von löslichem TNF sind bisher nicht bekannt.

Lösliches und membranständiges TNF vermittelt seine zahlreichen Wirkungen über die Wechselwirkung mit zwei Rezeptoren: den p55 TNF-Rezeptor (TNFR1; CD120a) und den p75 TNF-Rezeptor (TNFR2; CD120b) [50, 51]. Während der TNFR1 den „*High-Affinity*-Rezeptor“ für lösliches TNF (sTNF) darstellt und zahlreiche Funktionen durch die Bindung von sTNF ausgelöst werden [52], wird der TNFR2 effektiver durch membran-gebundenes TNF (mTNF) aktiviert [53] (s. Abb. 2. 2). Dabei besitzen sTNF und mTNF wahrscheinlich unterschiedliche Wirkungen [49].

2.1.3 Die TNF-Rezeptoren

TNFR1 und TNFR2 gehören zu der 29 Mitglieder starken Familie der TNF-Rezeptoren, die die Wirkungen der einzelnen Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie vermitteln [3]. Bei dieser Rezeptorfamilie handelt es sich um Typ-1-Transmembranproteine, die als charakteristisches Merkmal eine bis sechs Cystein-reiche Domänen (CRD; ca. 40 Aminosäure-Reste), die typischerweise jeweils drei Disulfidbrücken ausbilden, in ihrer Liganden-bindenden, extrazellulären Domäne besitzen. [54, 55].

TNFR1 und TNFR2 zeigen ca. 28 % Sequenzhomologie vor allem in ihrer extrazellulären Domäne [56]. Der humane TNFR1 besteht aus 434 Aminosäure-Resten, der TNFR2 aus 439 Resten. TNFR1 und TNFR2 liegen beide N-glycosyliert vor, aber nur der TNFR2 ist O-glycosyliert [57]. Beide Rezeptoren besitzen jeweils vier CRDs in ihrer extrazellulären Domäne und haben eine längliche Gestalt. Durch eine Sequenz (PLAD; *pre-ligand binding assembly domain*) in der distalen CRD im TNFR1 und TNFR2 liegen die Rezeptoren auch in Abwesenheit eines Liganden als Homotrimere vor [58]. Die Bindung ans TNF erfolgt an den lateralen Vertiefungen des trimeren TNF, die an der Grenze zwischen zwei der drei TNF-Monomere entstehen [55, 59, 60] (s. Abb. 2. 2). Die Aktivierung der Rezeptoren wird wahrscheinlich durch Liganden-induzierte Konformationsänderungen innerhalb des Rezeptor-Trimers hervorgerufen [21].

Beide TNF-Rezeptoren können, wie das TNF, durch die Aktivität von TACE (ADAM17) von der Zelloberfläche freigesetzt werden, wobei der TNFR1 zusätzlich durch ADAM8 und der TNFR2 durch ADAM9 gespalten werden kann [42, 61, 62]. Die löslichen TNFR haben neutralisierende bzw. modulierende Wirkungen auf TNF [63] und sind die bisher einzig bekannten natürlichen Moleküle, die die Aktivität von TNF beeinflussen.

Während der TNFR1 ubiquitär auf beinahe allen Zellen (außer Erythrozyten und unstimulierten Lymphozyten) exprimiert wird, ist die Expression des TNFR2 auf hämatopoetische Zellen und Endothelzellen begrenzt [21].

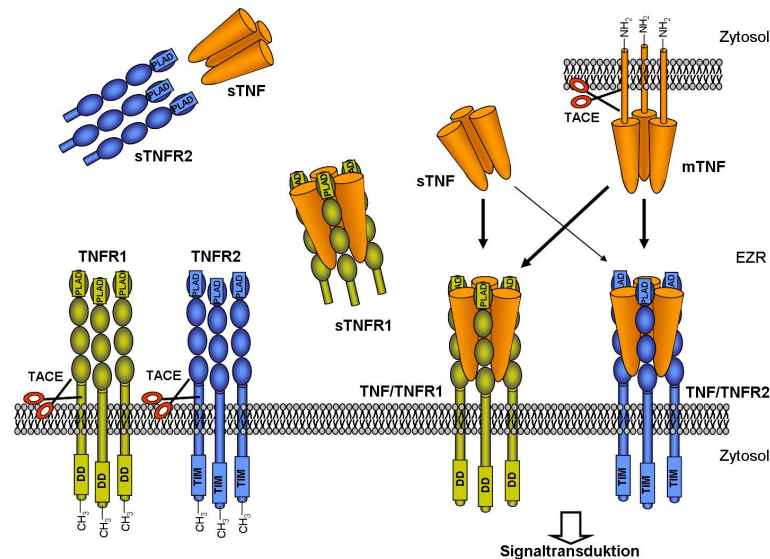


Abb. 2. 2 schematische Darstellung von TNF und seinen Rezeptoren: Das homotrimere TNF wird zunächst als Typ2-Transmembranprotein exprimiert und durch die Aktivität von Metalloproteinasen, wie das *TNF-alpha converting enzyme* (TACE), von der Zelloberfläche freigesetzt. Sowohl lösliches als auch membranständiges TNF aktiviert seine beiden TNF-Rezeptoren (TNFR1 und TNFR2), wobei die Aktivierbarkeit des TNFR2 über lösliches TNF schwächer ist (gekennzeichnet durch den dünneren Pfeil). Die Bindung von TNF an die TNFR erfolgt über die lateralen Vertiefungen, die an den Interaktionsflächen von je zwei TNF-Monomeren entstehen. Durch ihre *pre-ligand assembly domain* (PLAD) liegen beide TNFR bereits vor TNF-Bindung prä-assoziert vor. In ihrem extrazellulären Teil besitzen die TNFR vier Cystein-reiche Domänen (als Kugeln dargestellt), über die der Kontakt zum TNF hergestellt wird. Die TNFR besitzen in ihrem intrazellulären Teil unterschiedliche, für die Signalweiterleitung verantwortliche Domänen. Der TNFR1 hat eine *death domain* (DD) und der TNFR2 ein *TRAF-interacting motif* (TIM). Beide TNFR werden als Typ1-Membranproteine exprimiert, können aber auch durch die Aktivität von Metalloproteinasen von der Zelloberfläche freigesetzt werden und lösliches TNF neutralisieren.

2.1.4 TNFR1-Signaltransduktionswege

Der gut charakterisierte TNFR1 spielt in den meisten bekannten TNF-vermittelten Wirkungen, wie der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose von Zellen eine Schlüsselrolle. Die durch den TNFR1 vermittelten Signalwege wurden ausgiebig untersucht. Nach Bindung von TNF wird das Adapterprotein TRADD (*TNFR-associated death domain protein*) durch die homotypische Bindung der DD beider Proteine an den Rezeptor rekrutiert [64, 65]. TRADD dient als Plattform, um unterschiedliche Downstream-Adapterproteine zu rekrutieren, die dann zu verschiedenen Signalkaskaden führen. Zu diesen Adapterproteinen gehören TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*), RIP1 (*receptor interacting protein 1*) und FADD (*Fas-associated death domain protein*), die weitere Schlüsselmoleküle rekrutieren, die für die

Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), von MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) oder Caspasen verantwortlich sind (s. Abb. 2. 3).

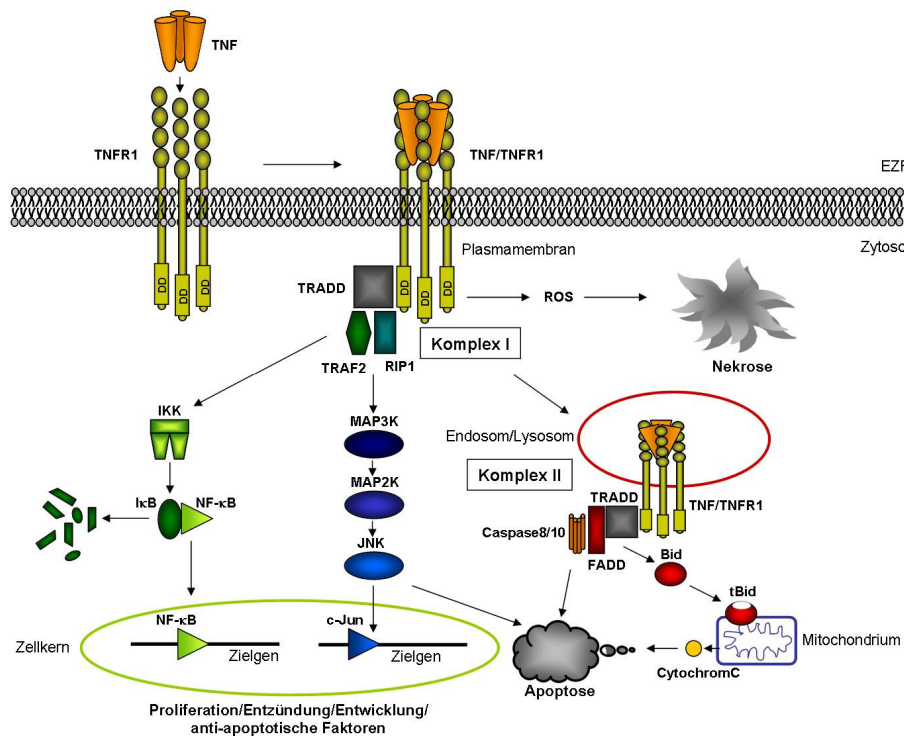


Abb. 2. 3 schematische Darstellung der TNFR1-Signaltransduktionswege: s. unten stehenden Text

TNFR1-vermittelte NF- κ B-Aktivierung

Die pro-inflammatorische Wirkung von TNF ist hauptsächlich auf die Aktivierung von NF- κ B zurückzuführen. Bei NF- κ B handelt es sich um eine Gruppe von homo- und hetero-dimeren Transkriptionsfaktoren, die in Säugetieren fünf Mitglieder umfasst (NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), c-Rel, RelA (p65) und RelB). Die Mitglieder der NF- κ B Familie besitzen als strukturelle Gemeinsamkeit die RHD (*Rel homology domain*), die die Dimerisierung, die DNA-Bindung, die nukleäre Lokalisierung und die Wechselwirkung mit den inhibitorischen I κ B-Proteinen (*inhibitor of κ Bs*) vermittelt [66]. NF- κ B Proteine sind für die Transkriptionsaktivierung einer Vielzahl unterschiedlicher, an inflammatorischen und Entwicklungs-Prozessen beteiligten Genen verantwortlich, außerdem wird die Transkription verschiedener anti-apoptotischer Faktoren ausgelöst [67].

Im unstimulierten Zustand wird NF- κ B durch die Bindung an I κ B inaktiv im Zytoplasma zurückgehalten. Die TNF-induzierte Aktivierung von NF- κ B über den TNFR1 wird durch die Rekrutierung des so genannten Komplex 1, bestehend aus TRADD, TRAF2 und RIP1, an den TNFR1 initiiert [68]. Für die NF- κ B-Aktivierung ist

eine Translokation von TNFR1 in *lipid rafts* nach Liganden-Bindung nötig [69]. *Lipid rafts* sind cholesterinreiche Mikrodomänen in Zellmembranen, in denen sich eine Vielzahl von signalweiterleitenden Molekülen treffen [70]. Nach Bildung des Komplex I kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung des IKK (I κ B *kinase*)-Komplexes, die zur Phosphorylierung von I κ B (P-I κ B) an zwei Serin-Resten (S32/S36) führt [71]. Durch die Phosphorylierung wird die Ubiquitinylierung des I κ B eingeleitet, was schließlich zu seinem Abbau führt [72]. Das freigesetzte NF- κ B gelangt dann aufgrund seiner Kernlokalisations-Sequenz in den Zellkern und aktiviert die Transkription seiner Zielgene.

TNFR1-vermittelte MAPK-Aktivierung

MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) sind Serin/Threonin-Kinasen, die intrazelluläre Signalübertragungen vermitteln, die an Zellproliferation, Differenzierung, Überleben und Zelltod beteiligt sind. Die Säugetier-MAPK-Familie besteht aus den Mitgliedern p38MAPK, ERK (*extracellular regulated kinase*) und JNK (*c-Jun NH2-terminal kinase*) [73, 74]. Jeder Signalweg beinhaltet mindestens drei Komponenten, eine MAPK Kinase Kinase (MAP3K), eine MAPK Kinase (MAP2K) und eine MAPK. MAP3Ks phosphorylieren und aktivieren MAP2Ks, welche wiederum MAPKs phosphorylieren und aktivieren [75]. MAPK-Signalwege werden als Antwort auf unterschiedliche Stimuli, wie pro-inflammatorische Zytokine oder zellulärem Stress aktiviert [73, 74].

Der an den TNFR1 rekrutierte Komplex 1, der die Aktivierung von NF- κ B auslöst, kann auch zur Aktivierung aller drei MAPK-Kaskaden (p38, ERK und JNK) führen. In den meisten Zellarten ist JNK jedoch die überwiegend durch TNF aktivierte MAPK [21]. Die TNF induzierte Aktivierung von JNK kann sowohl zu Signalen, die das Überleben, als auch zu solchen, die den Tod von Zellen begünstigen, führen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die transiente JNK-Aktivierung mit Zellüberleben assoziiert ist, während die andauernde JNK-Aktivierung zur TNF-induzierten Apoptose oder Nekrose führen kann [76-80].

TNFR1-vermittelter Zelltod

TNF kann sowohl den apoptotischen als auch den nekrotischen Zelltod auslösen. Die Apoptose ist ein geordneter Mechanismus zur Elimination von Zellen, bei dem die Integrität der Plasmamembran erhalten bleibt. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Nekrose zu einem Platzen der Plasmamembran mit unkontrollierter Freisetzung des zytoplasmatischen Inhalts [81]. Eine Schlüsselrolle bei der Apoptose spielt die Proteasefamilie der Caspasen (*cysteiny-l-aspartate-specific proteinases*), die als inaktive Pro-Enzyme (Zymogene) produziert werden. Am Anfang einer Caspase-Kaskade stehen Initiator-Caspasen (z.B. Caspase8/9/10), die nach einem entsprechenden Todessignal autokatalytisch aktiviert werden, woraufhin sie Effektor-Caspasen (z.B. Caspase3/7) spalten und aktivieren. Die Effektor-Caspasen spalten viele intrazelluläre Substrate, die zu den charakteristischen morphologischen Merkmalen der Apoptose, wie der

Chromatin-Kondensation, DNA-Fragmentierung, Externalisierung von Phosphatidylserin, Membran-Austülpungen und der Bildung von apoptotischen Vesikeln führen [82], die von Phagozyten ohne Freisetzung des zytosolischen Inhalts internalisiert werden.

Die TNF-induzierte Apoptose wird über den Komplex II, bestehend aus TRADD, FADD und Caspase8 initiiert [68]. TRADD und FADD (*Fas-associated death domain protein*) interagieren über ihre DD Domänen [83], FADD wiederum rekrutiert die Initiator-Caspase Pro-Caspase8 über die homotypische Wechselwirkung ihrer DEDs (*death effector domain*) [84]. Die Pro-Caspase8 wird autoproteolytisch gespalten, wodurch die Caspase-Kaskade gestartet wird [85].

Neben diesem extrinsischen Apoptoseweg wird durch TNF auch der intrinsische Apoptoseweg induziert, der über die aktivierte Caspase8 zur Spaltung und Aktivierung von Bid (einem pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglied) führt [86].

Im Vergleich zu den TNF-vermittelten inflammatorischen Prozessen spielt der TNF-induzierte Zelltod eine eher untergeordnete Rolle. Der Grund hierfür ist, dass die Aktivierung von NF- κ B die Apoptose überlagert und hemmt. Diese Überlagerung ist durch die Bildung zweier zeitlich und räumlich verschiedener TNFR1-Signal-Komplexe zu erklären, bei denen zunächst NF- κ B (Komplex I) und dann Caspasen (Komplex II) sequentiell aktiviert werden [68, 87]. Durch die initiale Aktivierung von NF- κ B (durch Komplex I) wird die Transkription von Genen, die für anti-apoptotische Proteine kodieren, stimuliert. TNF bewirkt die Apoptose daher nur, wenn die Proteinsynthese oder der NF- κ B-Signalweg gehemmt ist.

TNF kann durch die Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS, *reactive oxygen species*) über den TNFR1 auch zu einem Caspase-unabhängigen, programmierten Zelltod führen. Dieser wird aufgrund seiner Morphologie als nekrotischer Zelltod bezeichnet, obwohl unter der klassischen Nekrose ursprünglich ein passiver, nicht-programmierter Zelltod, der durch schwere Gewebsschädigung hervorgerufen wird, verstanden wird [88]. Zusätzlich vermag TNF durch die Produktion des *second messengers* Ceramid via Aktivierung von neutraler und saurer Sphingomyelinase (SMase) den Zelltod auszulösen [89].

2.1.5 TNFR2-Signaltransduktionswege

Die meisten bekannten TNF-induzierten Effekte wurden vor allem dem TNFR1 zugeschrieben und die Rolle des TNFR2 wurde lange unterschätzt. Die Gründe liegen vor allem in der weniger starken Verbreitung des TNFR2, in der stärkeren Regulation der TNFR2-Expression und darin, dass der TNFR2 effektiver durch membranständiges TNF aktiviert wird und viele Laborversuche mit löslichem TNF durchgeführt werden [90]. Außerdem wird angenommen, dass beide TNFR in der Signalweiterleitung kooperieren, wie in TNFR1- oder TNFR2-defizienten Mäusen für die NF- κ B- und JNK-Aktivierung gezeigt wurde [91] und es weiter unten für den TNFR2-vermittelten Zelltod beschrieben wird.

Mittlerweile gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass der TNFR2 unabhängig vom TNFR1 eine wichtige Rolle in immunologischen und entzündlichen Reaktionen spielt. Dabei wurden die Aktivitäten des TNFR2 hauptsächlich auf T-Zellen und Thymozyten beschrieben [92-95].

Die Bedeutung des TNFR2 wird weiter unterstrichen durch die Beobachtung, dass Polymorphismen im TNFR2-Gen mit einem erhöhten Risiko für die rheumatoide Arthritis, den systemischen Lupus erythematosus und Morbus Crohn assoziiert sind [96-98].

Die Signaltransduktionswege des TNFR2 sind weniger gut charakterisiert als die des TNFR1 (Abb. 2. 4). Grundsätzlich aktiviert der TNFR2 dieselben oder ähnliche Signaltransduktionswege wie der TNFR1: Aktivierung von NF- κ B und MAP-Kinasen, sowie Auslösung des Zelltods. Die exakte Funktion von Signalproteinen, die für die TNFR2-vermittelten Signalkaskaden verantwortlich sind, ist oft schwer zu ermitteln, da viele dieser Signalproteine auch in die TNFR1-vermittelten Signalwege involviert sind.

TNFR2-vermittelte NF- κ B- und JNK-Aktivierung

Der TNFR2 kann nach Liganden-Bindung unabhängig vom TNFR1 die NF- κ B- und JNK-Signalwege aktivieren, wobei die Aktivierung auch hier über die Rekrutierung von TRAF2 initiiert wird [99]. Anders als beim TNFR1, bei dem die Rekrutierung von TRAF2 über das Adapterprotein TRADD abläuft, rekrutiert der TNFR2 TRAF2 direkt über das zytoplasmatische TRAF-interagierende Motiv (TIM). Direkte Vergleiche zwischen der TNFR1- und TNFR2-induzierten NF- κ B- bzw. JNK-Aktivierung haben gezeigt, dass der TNFR1 beide Signalwege stärker aktiviert als der TNFR2, was vermutlich auf eine höhere Bindungsaffinität zwischen TRADD und TRAF2 als zwischen TNFR2 und TRAF2 zurückzuführen ist [90, 100].

TNFR2-vermittelter Zelltod

Die Rolle, die der TNFR2 in der Auslösung der Apoptose spielt, wird kontrovers diskutiert. Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass der TNFR2, der keine DD besitzt, nur über den TNFR1-Signalweg die Apoptose auszulösen vermag. Es wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, bei denen die beiden TNFR kooperieren und der TNFR2 den TNFR1-vermittelten apoptotischen Signalweg verstärkt. i) Durch die Aktivierung von TNFR2 wird die Produktion von endogenem TNF induziert, welches wiederum autokrin oder parakrin den TNFR1 aktiviert [101]. ii) Der höher exprimierte TNFR2 bindet TNF und übergibt das TNF an den weniger stark exprimierten TNFR1, der dann für die Signalweiterleitung verantwortlich ist (*Ligand-Passing-Mechanismus*) [102]. iii) Die Stimulation des TNFR2 führt zur Rekrutierung und anschließender Degradierung von TRAF2 [103], was die NF- κ B-Aktivierung durch den TNFR1 verhindern und zur verstärkten Bildung des Komplex 2 (TRADD, RIP1, FADD) am TNFR1 führen würde [104].

Verschiedene Untersuchungen mit agonistischen anti-TNFR-Antikörpern, Rezeptorspezifischen TNF-Mutanten oder TNFR-k.o.-Mäusen haben jedoch gezeigt, dass der

TNFR2 auch unabhängig vom TNFR1 den Zelltod auszulösen vermag [105, 106] (Abb. 2. 4).

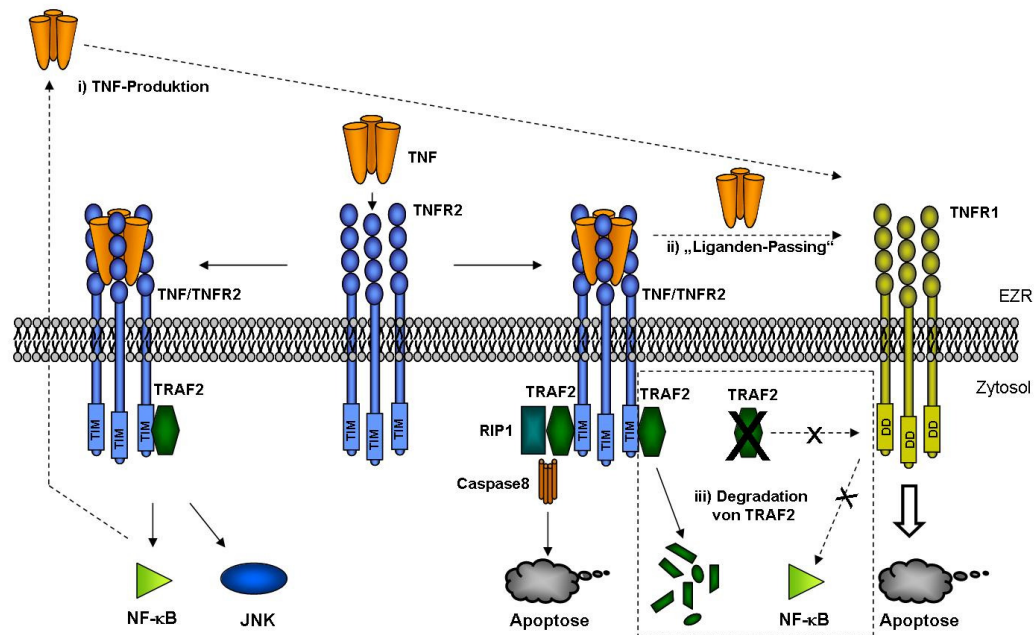


Abb. 2. 4 schematische Darstellung der TNFR2-Signaltransduktion und der apoptotische Crosstalk zwischen beiden TNFR: s. oben stehenden Text

2.2 ADP-Ribosyltransferasen

2.2.1 Die ADP-Ribosylierungsreaktion

Die ADP-Ribosylierung von Proteinen ist ähnlich der Phosphorylierung eine reversible posttranslationale Modifikation (PTM) mit regulatorischer Funktion. Hierbei wird die ADP-Ribosegruppe von Nikotinamid-Adenindinukleotid (NAD) unter Freisetzung von Nikotinamid auf Akzeptormoleküle übertragen. Die Reaktion wird durch eine Klasse von Enzymen, den sogenannten ADP-Ribosyltransferasen katalysiert. Das Substrat NAD wird von den ADP-Ribosyltransferasen in einer bestimmten Orientierung gebunden, so dass ein nukleophiler Angriff des Akzeptormoleküls auf die β -N-glykosidische Bindung zwischen Nikotinamid und dem C1'-Atom der Ribosegruppe ermöglicht wird [107-109]. Die Bildung der neuen glykosidischen Bindung führt zu einer Konformations-Inversion am C1'-Atom der Ribosegruppe von der β - zur α -Konformation. Abhängig von der Spezifität der ADP-Ribosyltransferasen können Arginin, Cystein, Asparagin, Glutaminsäure oder Diphthamid (ein modifiziertes Histidin) als Akzeptoraminosäuren fungieren, wobei die meisten Vertebraten-ARTs Arginin-spezifisch sind [110].

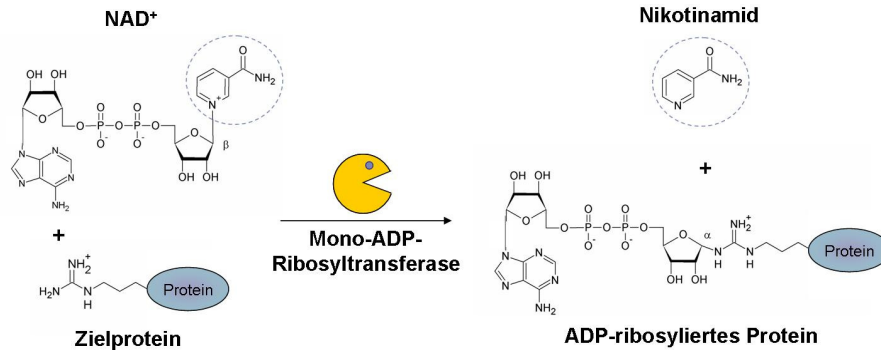


Abb. 2.5 Schematische Darstellung einer Arginin-spezifischen ADP-Ribosylierungsreaktion. ADP-Ribosyltransferasen binden das Substrat NAD in einer Konformation, die den nucleophilen Angriff eines der beiden terminalen N-Atome der Guanidino-Gruppe von Arginin auf die β -N-glykosidische Bindung zwischen Nikotinamid und dem C1'-Atom der Ribosegruppe ermöglicht. Unter Freisetzung von Nikotinamid entsteht eine α -N-glykosidische Bindung zwischen dem C1'-Atom der Ribosegruppe und der Guanidino-Gruppe des Proteins. Abgeleitet von der 3D-Struktur von Ratten-ART2 (pdb: 1OG3) werden ARTs oft mit einem Pacman-Cartoon dargestellt.

Durch die enzymatische Reaktion von ADP-Ribosylhydrolasen (ARHs) ist die ADP-Ribosylierungsreaktion prinzipiell vollständig reversibel, das native Protein wird unter Freisetzung von ADP-Ribose zurückerhalten [111, 112]. Eine teilweise Entfernung der ADP-Ribosegruppe kann durch Phosphodiesterasen, die die Phosphodiesterbindung zwischen Adeninmononukleotid (AMP) und Phosphoribose des ADP-ribosylierten Proteins hydrolysieren, erreicht werden. Der Phosphoribose-Rest verbleibt am Protein, während AMP freigesetzt wird. Dieser Mechanismus der De-ADP-Ribosylierung wurde für die reversible ADP-Ribosylierung von Integrin $\alpha 7$ auf Skelettmuskelzellen gezeigt [113]. Für einen vollständigen ADP-Ribosylierungszyklus müsste der am Protein verbleibende Phosphoriboserest durch ein bisher unbekanntes Enzym abgespalten werden.

2.2.2 ADP-Ribosyltransferasen

Die ADP-ribosylierenden Enzyme lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) übertragen jeweils nur eine einzige ADP-Ribose-Einheit auf ihre Zielproteine, während Poly-ADP-Ribosyltransferasen (alternativer Name: Poly-ADP-Ribosylpolymerasen (PARPs)) verzweigte Ketten von ADP-Ribosegruppen an einem Zielprotein erzeugen [112].

Die bekanntesten Vertreter der Mono-ADP-Ribosyltransferasen sind bakterielle Toxine. Erstmals wurde die mono-ADP-Ribosylierung als Wirkmechanismus für das Diphtherie-Toxin (DT) 1968 von Honjo *et al.* beschrieben [114]. Das Diphtherie-Toxin, wie auch das Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* ADP-ribosylieren einen Diphthamidrest im Elongationsfaktor 2 (EF2), was zur Blockade der Proteinbiosynthese und zum Tod der eukaryotischen Wirtszelle führt. Andere bakterielle Toxine wie

Cholera-Toxin (*Vibrio cholera*), das hitzelabile Enterotoxin (*E.coli*), Pertussistoxin (*Bordetella pertussis*), Exotoxin S (*Pseudomonas aeruginosa*) und C3 Exotoxin (*Clostridium botulinum*) ADP-ribosylieren heterotrimere G-Proteine oder kleine G-Proteine wie Ras und Rho, was die Signaltransduktion in der Zielzelle hemmt. SpvB (*Salmonella enterica*) und das C2 Toxin (*Clostridium botulinum*) ADP-ribosylieren wiederum das Strukturprotein Aktin, was die Organisation des Zytoskeletts beeinflusst [115, 116].

Eukaryotische Mono-ADP-Ribosyltransferasen

Die erste in Vertebraten identifizierte Mono-ADP-Ribosyltransferase wurde im Skelettmuskel von Kaninchen nachgewiesen (RABNAART, später: ART1) [117]. Seitdem wurde eine ganze Familie verwandter ARTs kloniert. Bei der Maus sind 6 funktionale Mitglieder bekannt (ART1, ART2.1, ART2.2, ART3, ART4, ART5), wobei die zwei ART2-Gene wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden sind (85 % Sequenzhomologie) [118, 119]. Der Mensch verfügt hingegen nur über vier funktionale ART-Gene (ART1, ART3, ART4, ART5), bei dem ART2-Gen handelt es sich um ein Pseudogen, das durch drei vorzeitige Stop-Codons inaktiviert ist [118, 119]. Die ART-Orthologe von Maus und Mensch zeigen eine Sequenzhomologie von 75-83 %, während die ART-Paraloge (innerhalb einer Spezies) eine Sequenzhomologie zwischen 28 und 40 % aufweisen [118, 120].

Bis auf die ART5, die konstitutiv sezerniert wird, werden alle Säugetier-ARTs als Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Ekto-Enzyme auf der Zelloberfläche exprimiert [121, 122]. Für mART2 wurde gezeigt, dass ARTs durch Proteasen von der Zelloberfläche als lösliche, aktive Enzyme freigesetzt werden können [123].

ART1, ART2 und ART5 übertragen die ADP-Ribosegruppe spezifisch auf Argininreste ihrer Zielproteine, für ART3 und ART4 konnte bisher keine ART-Aktivität festgestellt werden. Einige ARTs, wie die Ratten-ART2 und Maus ART5 können die ADP-Ribose-Einheit aus NAD auf Wassermoleküle übertragen und besitzen somit neben der Transferase-Aktivität eine NAD-Glykohydrolase (NADase)-Aktivität [124]. Im Gegensatz zu prokaryotischen ARTs, die meist eine hohe Substratspezifität aufweisen, modifizieren die eukaryotischen ARTs wie ART1 und ART2 eine Reihe unterschiedliche Zelloberflächenproteine.

murine ADP-Ribosyltransferase 2 (mART2)

Die am besten untersuchte Vertebraten-ART ist die Maus ART2 (mART2). mART2 wird hauptsächlich auf naiven T-Zellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle im murinen Immunsystem. Ein wichtiges Zielprotein der mART2 ist der P2X7 Purinorezeptor. Dieser ist ein Liganden-gesteuerter Kationenkanal, der nach Stimulation für K^+ , Na^+ und Ca^{2+} selektiv permeabel ist und besonders stark in Zellen des Immunsystems exprimiert wird [125]. Durch dauerhafte Stimulation wird die Bildung einer nicht-selektiven Pore induziert, die schließlich den Zelltod bewirkt [126, 127]. Die ADP-Ribosylierung von P2X7 auf murinen T-Zellen führt zu seiner Aktivierung und

kann bei Anwesenheit von extrazellulärem NAD eine schnelle Apoptose der T-Zellen induzieren [128]. Dieser NAD-induzierte Zelltod (NICD) könnte eine wichtige Rolle in der Modulation der Immunantwort und beim Schutz des Organismus vor Autoimmunreaktionen spielen [128, 129]. Andere identifizierte Zielproteine von mART2 sind CD11a, CD27, CD43, CD44 und CD45, deren Modifikation die Adhäsion, Proliferation, Zytokinsekretion und die Zytotoxizität von T-Zellen einschränkt [130, 131].

Da ART2 beim Menschen ein Pseudogen ist [118, 119], ist es denkbar, dass einige immunmodulatorische Funktionen von ART2 beim Menschen von ART1 übernommen sein könnten.

2.2.3 humane ADP-Ribosyltransferase-1 (hART1)

Das humane ART1-Gen wurde erstmals 1994 aus Muskelgewebe kloniert [132]. Bei dem hART1-Gen handelt es sich um ein Einzelkopiegen, welches auf Chromosom 11p15 lokalisiert wurde [133].

ART1 wird hauptsächlich im Herz- und Skelettmuskel exprimiert [118]. Außerdem wird hART1 auf der Oberfläche von Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten exprimiert [134, 135]. Die Expression von ART1 auf PMNs ist sehr schwach, sie wird aber durch Stimulation mit verschiedenen Chemoattraktoren schnell gesteigert. Dies lässt vermuten, dass ART1 in intrazellulären Kompartimenten gespeichert werden könnte.

Das erste Zielprotein von ARTs, das *in vivo* nachgewiesen werden konnte, ist das humane Defensin HNP-1 (*human neutrophil peptide-1*) [136]. Defensine, die von aktivierten Neutrophilen freigesetzt werden, sind kleine Arginin-reiche kationische Peptide mit breiter antimikrobieller und zytotoxischer Wirkung und spielen eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem des Menschen. Es wurde gezeigt, dass durch die ART1-katalysierte ADP-Ribosylierung bei HNP-1 die antimikrobielle und zytotoxische Aktivität herabgesetzt wird, die Fähigkeit zur Chemoattraktion von T-Zellen aber erhalten bleibt [136]. Weitere, *in vitro* identifizierte Zielproteine von ART1 sind die Wachstumsfaktoren FGF-2 (*fibroblast-growth factor-2*) und PDGF-BB (*platelet-derived growth factor-BB*) [137, 138]. Aufgereinigtes ADP-ribosyliertes PDGF-BB zeigte eine verminderte Signalübertragungsfähigkeit in humanen glatten Muskelzellen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die ADP-Ribosylierung von löslichen Faktoren und Botenstoffen ein neuartiges und wichtiges Prinzip in der Regulation physiologischer Prozesse sein könnte. Die vorliegende Arbeit untersucht dieses Prinzip am Beispiel der Modifikation des TNF, und zeigt die Komplexität dieses Regulationsmechanismus auf.

3. Materialien

3.1 Laborgeräte

Analysewaage	Analytical Plus	Ohaus
Autoklav	Modell 2540 EK, Varioklav	Tuttnauer
Bakterienbrutschrank	B6060	H+P Labortechnik
Brutschrank/CO ₂ -Inkubator	Thermicon T	Heraeus
Cooler	Stratacooler	Stratagene
Durchflusszytometer	FACS CantoII	BDBiosciences
ELISA-Reader	Victor ³	PerkinElmer
Erlenmeyerkolben	versch. Größen	Schott, Simax
Feinwaage	Typ 1412	Sartorius
Filmentwicklungsmaschine	Curix60	AGFA
Folienschweißgerät	vacufix electronic	Petra electric
Geldokumentation	Edas290 + Kamera DC290	Kodak
Glasflaschen	versch. Größen	Schott
Heizblock	Thermomixer kompakt	Eppendorf
Kontaminationsmonitor	Contamat FHT 111 M	Eberline
<i>Laminar air flow</i> im PCR-Labor	Gelaire Class 100	Gelman
Laufkammern für die Agarose-Gelelektrophorese	Modell 40-0708	PEQLAB Biotechnologie
Laufkammern für die SDS-PAGE und den Elektrophoretogram	Xcell II- MiniCell	Invitrogen
Magnetrührer	RCT S 26	Omnilab/IKA- Labortechnik
Massenspektrometer	QTOF Premier Tandem Mass Spectrometer	Micromass
Mikro-Pipetten	Typ „Research“	Eppendorf
Mikroskop		Zeiss
Mikrowellenofen	M 637 EC	Miele
Neubauer-Zählkammer		Labor Optik
Pipettierhilfe	„Express“	Falcon/BD Biosciences
Photometer	Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech
Röntgenfilmkassetten	Suprema	Dr. Goos
Schüttelinkubator	Ecotron/Unitron	Infors
Sicherheitswerkbank	BSB4	GELAIR
Stickstofftank	K series	Taylor-Wharton
Strahlenschutz aus Plexiglas		Stratagene

Spannungsgerät für die Agarose-Gelelektrophorese	Modell BI0105 LVD	Biometra
Spannungsgerät für die SDS-PAGE und den Elektoblot SPR-System	Power Pac 200 Biacore 3000	BioRAD Biacore
Thermocycler	TGradient	Biometra
Thermocycler	Progene	Techne
Tischzentrifuge	5415D	Eppendorf
UPLC-Säule	C18, 180mm x 200mm; C18, 100µm x 100mm	Waters
UV-Transilluminator	Typ TI 1	Biometra
Vortex	„press to mix“	Neolab
Wasserbad	Typ 1007	Gesellschaft für Labortechnik
Zentrifuge	Rotanta 460 R	Hettich

3.2 Verbrauchsmaterialien

Aktivkohlebeutel	<i>Destaining Bags</i>	Amresco
Einwegpipetten, steril	versch. Größen	Falcon
Einwegspritzen	versch. Größen	Braun
FACS-Röhrchen	5mL <i>roundbottom</i>	Falcon/BD Biosciences
Filmentwicklungslösung		AGFA
Filmfixierungslösung		AGFA
Gel-Blotting-Papier	„GB 003“	Schleicher & Schuell
Hyperfilm ECL		Amersham Biosciences
Kanülen	versch. Größen	Braun
Kodak Biomax Röntgenfilm	MS	Kodak Company
Kryoröhrchen	1 ml	Nunc
Kulturflaschen	T25, T75	Greiner/Nunc
Kulturschalen	10 cm; 25 cm	Greiner/Nunc
Nitrozellulose-Hybond-C	Porengrösse 0,45 µm	Schleicher & Schuell
NuPage-Polyacrylamid-Gele	10 %ig; 12 %ig	Invitrogen
Polypropylenröhrchen, steril	15 ml, 50 ml	Greiner
Polyvinylidendifluorid- ImmobilonP (PVDF)	Porengrösse 0,45 µm	Millipore
Pipettenspitzen	versch. Größen	Sarstedt
Pipettierhilfe	„Express“	Falcon/BD Biosciences
Reaktionsgefäße	Safelock, versch. Größen	Eppendorf

Slide-A-Lyzer® Dialyse-	Volumen: 0,5 – 3 mL;	
Kassetten	Porengröße: 3,5 kDa	Pierce
Sterilfiltrationsapparaturen	Steriflip, Stericup	Millipore
Untersuchungshandschuhe	„Safeskin“	Kimberly-Clark
96 well ELISA-Platte	“C8 Starwell Maxi”	Nunc
96 well Mikrotiterplatten	V bottom	Greiner
96 well Mikrotiterplatten, steril	flach	Nunc
Zentrifugenröhrchen, steril	15 mL, 50 mL	Falcon/BD
		Biosciences

3.3 Chemikalien

ADPR	Sigma
AEBSF	MP Biomedicals
Aqua ad iniectabilia	Braun
Beta-Mercaptoethanol (50 mM)	Gibco
BSA	PAA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DMEM-Medium	Gibco
DNA <i>Typing Grade Agarose</i>	Gibco
dNTPs (10 mM)	Invitrogen
ECL <i>Western blotting detection reagent</i>	Amersham Biosciences
Eisensulfat	Merck
Ethanol, reinst, getrocknet	Merck
Ethanol, vergällt	Walter CMP GmbH
ethenoNAD	Sigma
Ethidiumbromid (10 mg/mL)	Molecular Probes
Eisen(II)sulfat	Merck
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom
G418	Gibco
Gel-Dry™ <i>Drying Solution</i>	Invitrogen
GeneRuler™ 1 kb-DNA-Ladder	MBI Fermentas
GeneRuler™ 100 bp-DNA-Ladder	MBI Fermentas
HEPES (1 M)	Gibco
IL-2 (10.000 U/mL)	Roche
jetPEI™ Transfektionsreagenz	Polyplus-transfection
Kaleidoscope™ <i>Precision Plus Protein Standard</i>	BioRAD
Kaliumchlorid	Merck
L-Glutamin (200 mM)	Gibco

<i>Loading Dye 6x</i>	MBI Fermentas
Lysozym	Roche
M2-Sepharose (50 %ige Suspension)	Sigma
Magermilchpulver	Carl Roth
Methanol	Walter GmbH
MultiMark® <i>Multi-Colored Standard</i>	Invitrogen
NAD	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumpyruvat (100mM)	Gibco
NEB Puffer3	New England Biolabs
Nicht-essenzielle Aminosäuren, 100x	Gibco
NOVEX® <i>Colloidal Blue Staining Kit</i>	Invitrogen
NP-40	Sigma
NuPage Antioxidant	Invitrogen
NuPage <i>sample reducing agent</i> 10x (DTT)	Invitrogen
NuPage SDS <i>sample buffer</i> 4x	Invitrogen
Paraformaldehyd	Merck
PBS	Gibco
PMA	Sigma
Propidiumiodid	BD Biosciences
Protein G-Sepharose (50 %ige Suspension)	Amersham Biosciences
Rekombinantes TNF	R&D Systems
Rekombinantes TNFR1-Fc-	
Fusionsprotein	R&D Systems
Rekombinantes TNFR2-Fc-	
Fusionsprotein	R&D Systems
RPMI-Medium	Gibco
Schwefelsäure(0,5 M)	Merck
Silberniträt	Merck
TAE (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer) (50x)	Gibco
TMB-Substratlösung	Sweden Diagnostics
Triton X-100	Sigma
Tween20	ICI Americas
α - ³² P-NAD, 10 mCi/mL	PerkinElmer

3.4 Puffer, Lösungen, Medien

Medien für die Zellkultur

Die für die Medien verwendeten Zusätze wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm). Fötale Kälberserum (FCS) wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren vor der Verwendung für 30 min bei 56 °C erhitzt.

RPMI-Komplettmedium	1640 RPMI (Roswell Park Memorial Institute), 10 % FCS, 2mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat
RPMI(+IL-2)-Komplettmedium	1640 RPMI, 10 % FCS, 2mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 10 U/mL IL-2, 50 µM beta-Mercaptoethanol
DMEM-Komplettmedium	DMEM, 10 % FCS, 2mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1 x nicht-essenzielle Aminosäuren, 10 mM HEPES-Puffer
Trypsin-Lösung (1x)	0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA·4Na, 0,085 % NaCl in PBS (Gibco)
Einfrier-Medium für Suspensionszellen	RPMI, 20 % FCS, 10 % DMSO
Einfrier-Medium für Adhäsionszellen	DMEM, 20 % FCS, 10 % DMSO

Medien für die Bakterienkultur

LB-Agar (Formulierung nach Miller)	1,5 % Agar, 1 % Casein, 0,5 % Hefeextrakt, 0,05 % NaCl (BD Biosciences)
LB-Medium (Formulierung nach Miller)	1 % Pepton, 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt (Invitrogen)
SOC-Medium	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 8,6 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose (Gibco)
Antibiotikum	100 µg/ml Kanamycin (Stammlösung: 50 mg/ml; Roche)

Lösungen für die jetPEITM-Transfektion

Isotone Natriumchlorid-Lösung	154 mM NaCl (Braun)
-------------------------------	---------------------

Puffer zur Herstellung von Zelllysaten

Lysepuffer für den 1G4/

Radioaktiv-Assay 1% Triton X-100, 1mM AEBSF in PBS

Lysepuffer für

den NF-κB-Assay 1% NP-40, 1mM AEBSF in PBS

*Puffer für die SDS-PAGE*MOPS-Laufpuffer 50 mM MOPS, 50mM TrisBase, 3,5 mM SDS,
1 mM EDTA; pH 7,7 (NuPage/Invitrogen)MES-Laufpuffer 50 mM MES, 50 mM TrisBase, 3,5 mM SDS,
1 mM EDTA; pH 7,3 (NuPage/Invitrogen)SDS-Ladepuffer NuPage SDS *sample buffer* 1x, NuPage *sample reducing agent* 1x (1 mM DTT) in dH₂OMassenmarker 100 ng/μL BSA, 150 ng/μL monoklonaler Antikörper, 10
ng/μL Lysozym in PBS*Silberfärbungslösung*Silberfärbungslösung 9 mL dH₂O, 0,5 mL Natriumcitrat-Lösung (40%ig),
0,1 mL Silbernitrat-Lösung (20%ig),
0,8 g Eisensulfatheptahydrat*Puffer/Lösungen für Western-Blot und Immunodetektion*1xTransferpuffer 3,027 g TrisBase + 14,4 g Glycin + 20 % Methanol;
pH 8,3 (Nupage/Invitrogen)

1xBlotpuffer 5 % Transferpuffer, 10 % Methanol, 0,1 % Antioxidans

1xTBS 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3 g TrisBase, pH7,4

Blocklösung 1xTBS, 5 % Magermilchpulver (w/v)

Antikörperverdünnungs-

Lösung 1xTBS, 0,5 % Magermilchpulver, 0,1 % Tween 20

Waschlösung 1xTBS, 0,1 % Tween 20

Puffer für die Affinitätschromatographie

Elutionspuffer 100 mM Glycin-HCl, pH 3,5 in PBS

Neutralisationspuffer 1 M Tris-HCl, pH 8,0 in PBS

Puffer für den ELISA

Coating-Puffer 100 mM Carbonat/Bicarbonat Puffer, pH 9,6

Block-Puffer 1 % BSA in PBS

Waschpuffer 0,01 % Tween in PBS

Fixier-/Erythrozytenlyse-Puffer zur Isolierung peripherer Blutleukozyten

Fix/Lyse-Puffer 5 % Diethylenglykol, 1 % Formaldehyd in dH₂O
 („BD MultitestTM-IMK Kit“, BD Biosciences)

Lösungen für FACS-Messungen

Fixierlösung 2% PFA in PBS

Lösungen für die ADP-Ribosylierung von TNF

TNF-Stammlösung 50 µg/mL rekombinantes TNF, 0,1 % BSA in PBS

Lösung Negativkontrolle 0,1 % BSA in PBS

3.5 Reagenzsysteme (Kits)

Plasmid-Präparation	QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
	Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Sequenzierreaktionen	BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems

3.6 Antikörper/Streptavidin-Konjugate**Tabelle 3. 1 unkonjugierte Antikörper**

<i>Antikörper</i>	<i>Klon</i>	<i>Konz. (mg/mL)</i>	<i>Einsatz, Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
Kaninchen-α-Hum.TNFR2; Serum	---	---	FACS: 1:200 IP: 2µL	AG Haag/Nolte
Kaninchen-α-IkB	L35A5	---	WB: 1:1000	Cell Signaling
Maus-α-ethenoAdenosin IgG2a	1G4	1,2	WB: 1:1.000	AG Haag/Nolte
Maus-α-Hum.TNF IgG1		---	FACS: 1:100 ELISA: 1:XY	Immunotools
Maus-α-Hum.TNF IgG1k	MAb1	0,5	IP: 1µg	eBioscience
Maus-α-Hum.TNFR1 IgG2a	H398	0,5	FACS: 1:100	Alexis Biochemicals
* Maus-α-V5 IgG2a		---	FACS: 1:100	Invitrogen
Maus-α-P-IkB	5A5	---	WB: 1:1000	Cell Signaling
Ratte-α-Hum.ART1 IgG2bk	R19A3	1	FACS: Hybridomüberstand 1:1	AG Haag/Nolte
Ziege-αHumTNF; Serum	---	---	FACS: 1:100	R&D Systems

* als Isotypkontrolle eingesetzter Antikörper

Tabelle 3. 2 konjugierte Antikörper/Streptavidin

<i>Antikörper</i>	<i>Klon</i>	<i>Konz. (mg/mL)</i>	<i>Einsatz; Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
Esel- α - Hum.IgG(H+L)F(ab') ₂ ^{FITC}		1,5	FACS: 1: 200	Dianova
Esel- α - MausIgG(H+L)F(ab') ₂ ^{PE}		0,5	FACS: 1: 100	Dianova
Esel- α - Kan.IgG(H+L)F(ab') ₂ ^{PE}		0,5	FACS: 1: 100	Dianova
Esel- α - RattIgG(H+L)F(ab') ₂ ^{PE}		0,5	FACS: 1: 100	Dianova
Esel- α - Kan.IgG(H+L)F(ab') ₂ - HRP		---	WB: 1:2.500	GE-Healthcare
Esel- α - ZieglIgG(H+L)F(ab') ₂ ^{PE}		0,5	FACS 1:100	Dianova
Maus- α -Hum.CD11b IgG1 ^{PE}	ICRF44	---	FACS: 1:20	BD Pharmingen
Maus- α -Hum.D62L IgG1 ^{PE}	DREG-56	0,1	FACS: 1:5	BD Pharmingen
Maus- α -Hum.TNF IgG1 ^{Biotin}		0,5	FACS: 1:100 ELISA: 1:1000	Immunotools
Ratten- α -HA-Tag IgG1- HRP	3F10	---	WB: 1:500	Roche
Schaf- α -MausIgG F(ab') ₂ -HRP		---	WB: 1:2.500	GE-Healthcare
Streptavidin-HRP	---	---	ELISA: 1:1000	Amersham Biosciences
Streptavidin ^{PE}	---	0,5	FACS: 1:100	Dianova

3.7 Primer/Vektoren

Primer (MWG, Ebersberg) für die Mutagenese-PCR von TNF:

Tabelle 3. 3 Primer für die Mutagenese-PCR von TNF

Name	Primersequenz
TNF(R6K)-F:	5' -GCAGTCAGATCATCTTCTaaAACCCCGAGTGACAAGC-3'
TNF(R6K)-R:	5' -GCTTGTCACCTCGGGGTTttAGAAGATGATCTGACTGC-3'
TNF(R31K)-F:	5' -CTCCAGTGGCTGAACaagCGGGCCAATGCC-3'
TNF(R31K)-R:	5' -GGGCATTGGCCCGcttGTTTCAGCCACTGGAG-3'
TNF(R32K)-F:	5' -CAGTGGCTGAACCGCaaGGCCAATGCCCTCC-3'
TNF(R32K)-R:	5' -GGAGGGCATTGGCCttGCGGTTTCAGCCACTG-3'
TNF(R44K)-F:	5' -CAATGGCGTGGAGCTGAaAGATAACCAGCTGG-3'
TNF(R44K)-R:	5' -CCAGCTGGTTATCTtTCAGCTCCACGCCATTG-3'
TNF(R103K)-F:	5' -GAGCCCCTGCCAGaaGGAGACCCAGAGGG-3'
TNF(R103K)-R:	5' -CCCTCTGGGGTCTCctTCTGGCAGGGGCTC-3'
TNF(R131K)-F:	5' -GCTGGAGAAGGGTGACaaACTCAGCGCTGAGATC-3'
TNF(R131K)-R:	5' -GATCTCAGCGCTGAGTttGTCACCCTTCTCCAGC-3'
TNF(R138K)-F:	5' -CAGCGCTGAGATCAATaaGCCCCACTATCTCGAC-3'
TNF(R138K)-R:	5' -GTCGAGATAGTCGGGcttATTGATCTCAGCGCTG-3'

Primer (MWG, Ebersberg) für die Sequenzierungen der hergestellten TNF-Mutanten:

CMV-F: 5'-GGCGTGACGGTGGGAGG-3'
 K3: 5'-TTGTAACCATTATAAGCTGC-3'

Tabelle 3. 4 Vektoren

<i>Name</i>	<i>Bezug</i>
pME/hART1-Vektor: (1,5 µg/µL)	Die kodierende Sequenz des humanen ART1 wurde aus humaner Skelettmuskel-cDNA (Clontech) amplifiziert und in den pME-Expressionsvektor (DNAX <i>Research Institute, Palo Alto, USA</i>) kloniert. Der Vektor enthält einen N-terminalen FLAG- <i>Tag</i> . (AG Koch-Nolte)
pDisplay/TNFR1 ØcD: (1,5 µg/mL)	Die kodierende Sequenz der extrazellulären Domäne des TNFR1 (AS 24-205) wurde aus einem käuflich erworbenen Klon (Imagenes) aus dem pOTB7-Vektor in einen innerhalb der Arbeitsgruppe abgewandelten pDisplay-Vektor (Invitrogen) umklontiert. Das klonierte Konstrukt enthält N-terminal eine CD8-Leadersequenz und einen FLAG- <i>Tag</i> , C-terminal einen C-myc- <i>Tag</i> und die Transmembran- und eine trunkierte zytoplasmatische Domäne des PDGF-Rezeptors (AS 513-561). (AG Haag)
pDisplay/TNFR2 ØcD: (1,1 µg/mL)	Die kodierende Sequenz der extrazellulären Domäne des TNFR2 (AS 25-255) wurde aus einem käuflich erworbenen Klon (Imagenes) aus dem CMV.SPORT6-Vektor in einen innerhalb der Arbeitsgruppe abgewandelten pDisplay-Vektor (Invitrogen) umklontiert. Das klonierte Konstrukt enthält N-terminal eine CD8-Leadersequenz und einen FLAG- <i>Tag</i> , C-terminal einen C-myc- <i>Tag</i> und die Transmembran- und zytoplasmatische Domäne des PDGF-Rezeptors (AS 513-661) (AG Haag)
pCMV.SPORT6/TNFR2 FL: (2,3 µg/mL)	Imagenes
pEGFP/TNF (1,5 µg/mL)	Die kodierende Sequenz des im Vektor CMV.SPORT6 enthaltenen, käuflich erworbenen TNF (Imagenes) wurde in den pEGFP-Vektor mit N-terminalem HA- <i>Tag</i> kloniert. (AG Haag)
* CMV.SPORT6/hIL-15 (1,45 µg/mL)	Imagenes

* als Transfektionskontrollvektor eingesetzt

3.8 Enzyme

Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C

PI-PLC

Molecular Probes (100 U/mL)

Rekombinante murine ART2.2

rek. mART2.2

AG Haag/Nolte (0,34 mg/mL)

Restriktionsenzyme

<i>Bam</i> HI	New England Biolabs (20.000 U/mL)
<i>Dpn</i> I	New England Biolabs (20.000 U/mL)
<i>Xho</i>	New England Biolabs (20.000 U/mL)

DNA-Polymerase

PfuTurbo	Roche (2.500 U/mL)
----------	--------------------

Proteasen

Trypsin	Promega
V8-Protease	Roche

3.9 Zelllinien und Bakterienstämme

*Zelllinien***Tabelle 3. 5 untransfizierte Zelllinien**

<i>Name</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Bezug</i>
DC27.10	murine Lyphomzelllinie	Prof. Dr. B. Fleischer, BNI Hamburg
HEK293	Humane embryonale Nierenzelle	im Labor etabliert
KIT225	humane T-Lymphoblasten	ATCC

Tabelle 3. 6 stabil-transfizierte Zelllinien

<i>Name</i>	<i>Bezug</i>
DC27.10.hART1 KIT225.hART1	Die Zelllinien wurden in unserer Arbeitsgruppe durch Transfektion mit Expressionskonstrukten für ART1 im Expressionsvektor pME hergestellt. Die Konstrukte enthalten einen N-terminalen FLAG-Tag und ein C-terminales GPI-Verankerungssignal.

Bakterienstämme

Zur Transformation wurden ultrakompetente XL10-Gold oder XL2-Blue Bakterien von Stratagene benutzt.

4. Methoden

4.1 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

4.1.1 Immunpräzipitation

Mithilfe der Immunpräzipitation (IP) können Proteine bzw. Proteinkomplexe aus Proteingemischen aufkonzentriert und isoliert werden. In dieser Arbeit wurden an Protein G-Sepharose-gekoppelte spezifische Antikörper zur Immunpräzipitation von TNF bzw. dem TNFR2 für den Nachweis der ADP-Ribosylierung im 1G-Assay (Abschnitt 4.4.1) verwendet. Protein G, ein Zelloberflächenprotein der Gruppe G Streptokokken, ist ein Fc-Rezeptor des Typs III, der an die Fc-Regionen von IgGs bindet.

Die Protein G-Sepharose wurde zunächst zweimal mit PBS gewaschen (2 Minuten, 1.400 rpm), bevor jeweils 40 µl der Protein G-Sepharose Suspension mit 1 µg eines monoklonalen Maus-anti-TNF-Antikörpers (Klon: MAb1) bzw. 2 µL eines polyklonalen Kaninchen-anti-TNFR2-Antiserums durch einstündiges Rollern bei 4 °C gekoppelt wurden. Im Anschluss wurde die Sepharose zweimal mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Inkubation der Antikörper-gekoppelten Protein G-Sepharose mit den zu präzipitierenden Proteinlösungen erfolgte für 1 Stunde unter Rollern bei 4 °C. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Sepharose zweimal mit PBS gewaschen und in 15-25 µl 1x SDS-Ladepuffer (enthält 1mM DTT) aufgenommen.

4.1.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode, bei der Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Das zugesetzte SDS lagert sich gleichmäßig an Proteine an und denaturiert diese. Sie erhalten eine hohe negative Ladung, die die Proteine nur aufgrund ihrer molaren Masse und nicht aufgrund ihrer Eigenladung, mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das elektrische Feld wandern lässt. Weiterhin können intra- und intermolekulare Bindungen wie Disulfidbrücken durch Zugabe von reduzierenden Substanzen, wie z.B. Dithiothreitol (DTT) entfernt werden.

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt in einem Polyacrylamidgel. Hierbei erreicht die Verwendung eines diskontinuierlichen Systems (DISC-Gelelektrophorese), bestehend aus Sammel- und Trenngel, die sich in pH-Wert und Porengröße voneinander unterscheiden, eine verbesserte Auftrennung. Im oberen Sammelgel werden die Proteine zunächst in dünne Scheiben (*discs*) aufkonzentriert, um die Trennschärfe zu erhöhen und eigentliche Trennung erfolgt im unteren Trenngel.

In dieser Arbeit wurde das Xcell II-MiniCell System verwendet. Die Proteine wurden der diskontinuierlichen SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von SDS unterzogen [139]. Die Proteinproben wurden in 1x konzentriertem SDS-Ladepuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 70°C erhitzt. Die Proben wurden bei 13.000 rpm zentrifugiert, und 15-30 µl der Überstände in die Geltaschen aufgetragen. Weiterhin wurden zur Bestimmung der apparenten Molekulargewichte der Proteine 10 bzw. 4 µl Größenmarker (MultiMark® *Multi-Colored Standard*, Invitrogen bzw. Kaleidoscope™ *Precision Plus Protein Standard*, BioRAD) aufgetragen. Zur Konzentrationsabschätzung der aus PI-PLC-Überständen aufgereinigten ART1 (s. Abschnitte 4.3.7 und 4.1.7) wurde ein in der Arbeitsgruppe selbst gemischter Massenmarker, bestehend aus verschiedenen großen Proteine mit definierter Masse, aufgetragen (s. Abschnitt 3.4). Es wurden entsprechend der Größe der zu untersuchenden Proteine käuflich erworbene 10 %ige bzw. 12 %ige Bis-Tris-Gele (Invitrogen) mit 10 oder 12 Geltaschen verwendet (Laufpuffer: MOPS bzw. MES). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte bei 200 V bis die Front des im SDS-Ladepuffer enthaltenen Bromphenolblau das Ende des Gels erreichte (ca. 40 Minuten).

4.1.3 Coomassie-Färbung

Coomassie ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an basischen Seitenketten von Aminosäuren anlagert. Dieser Farbstoff kann eingesetzt werden, um aufgetrennte Proteine nach der SDS-PAGE im Polyacrylamidgel unspezifisch anzufärben.

In dieser Arbeit wurde die Coomassie-Färbung angewendet, um den Erfolg der Aufreinigung von ART1 aus PI-PLC-Überständen zu überprüfen und mithilfe eines Massenstandards die Konzentration der gewonnenen ART1 abzuschätzen. Es wurde das NOVEX® Colloidal Blue Stain Kit von Invitrogen eingesetzt. Das Polyacrylamidgel wurde mindestens zwei Stunden in der Färbelösung (55 ml H₂O, 20 ml Methanol, 20 ml Stain A, 5 ml Stain B) geschwenkt. Nach einer mehrstündigen Entfärbung in Wasser mithilfe eines Aktivkohlebeutels wurde das Gel für ca. zehn Minuten in der Trocknungslösung (Gel-Dry™ *Drying Solution*, Invitrogen) geschwenkt, zwischen zwei Blätter Zellophanfolie in einen Trockenrahmen eingespannt und über Nacht getrocknet.

4.1.4 Western-Blot

Um die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine für einen Nachweis mit spezifischen Antikörpern zugänglich zu machen, wurden die im Gel vorhandenen Proteine orthogonal zur Auftrennungsrichtung auf eine proteinbindende Membran übertragen. Dieses Verfahren wird als Western-Blot bezeichnet [140]. In dieser Arbeit wurden die Proteine mit Hilfe des Nass-Blot-Verfahrens ("X Cell II Blotting" System, Invitrogen) transferiert. Für einige Versuche wurde ein Zweirichtungsblot durchgeführt, bei dem die

Proteine nacheinander auf zwei unterschiedliche Membranen übertragen wurden. Für die Immunodetektion (s. Abschnitt 2.1.6) wurde eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) - Membran, für die Silberfärbung (s. Abschnitt 2.1.5) eine Nitrocellulosemembran verwendet.

Die Proteine aus den Polyacrylamidgelen wurden durch Elektroblothing bei 30 V für 90 Minuten auf PVDF-Membranen, die vor der Verwendung zur Aktivierung für ca. 1 Minute in Methanol getränkt wurden, übertragen. Für die Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran reicht das Auflegen der Membran auf das Gel aus.

4.1.5 Silberfärbung

Die Silberfärbung stellt einen hochempfindlichen Nachweis von Proteinen dar. Dabei werden Silber(I)-Ionen, welche mit Aspartat-, Cystein- und Glutamat-Resten von Proteinen komplexiert sind, zu Silberkeimen reduziert und die Proteinbanden somit sichtbar. Da aber Silberionen je nach Aminosäurekonstitution unterschiedlich gut gebunden werden, eignet sich diese Methode nur eingeschränkt zur Quantifizierung von Proteinen.

Zur Durchführung der Silberfärbung wurde die Nitrocellulosemembran in 10 mL einer frisch angesetzten Silberlösung (s. Abschnitt 3.4) schwenkend gefärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar wurden (1-5 Minuten). Im Anschluss wurde die Membran zweimal mit dH₂O gewaschen und luftgetrocknet.

4.1.6 Immunodetektion

Für die Immunodetektion der Proteine wurde die aus dem Western-Blot erhaltene PVDF-Membran mit den transferierten Proteinen zunächst 30 Minuten mit 5 %igem Magermilchpulver (w/v) in TBS bei RT rollernd inkubiert, um Protein-freie Bereiche der Membran abzusättigen. Im Anschluss wurde mit den unkonjugiertem Primärantikörpern (Verdünnung 1:1000 in Antikörperverdünnungslösung; s. Abschnitt 3.4) bzw. mit dem direkt HRP-konjugierten *Tag*-spezifischem Antikörper (hier: anti-HA, Verdünnung 1:500 in Antikörperverdünnungslösung) in einem Volumen von 5 mL für 1 Stunde bei RT rollernd inkubiert. Nach dreimaligem 3minütigem Waschen mit Waschpuffer (TBS-Tween) bei RT wurde die Membran mit dem HRP-markiertem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2.500 in Antikörperverdünnungslösung) in einem Volumen von 5 mL für 1 Stunde bei RT unter Rollern inkubiert. Nach erneutem dreifachem Waschen (je 3 Minuten) wurde die PVDF-Membran mit frisch angesetzter ECL (*enhanced chemoluminescence*)-Lösung für 5 Minuten inkubiert. Die ECL-Lösung enthält Luminol, welches mit H₂O₂ durch Katalyse der HRP unter Lichtemission umgesetzt wird. Die Lichtemission wurde mittels eines lichtempfindlichen Films (HyperfilmTMECLTM) detektiert. Die Belichtungszeit betrug 1-50 Minuten. Der Film wurde mittels des automatischen Film-Entwicklers Curix60 von AGFA entwickelt.

4.1.7 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie stellt eine hochspezifische Methode der Proteinaufreinigung dar, die auf den selektiven Wechselwirkungen zwischen Proteinen und ihren Liganden basiert. Bei diesen Liganden kann es sich z.B. um monoklonale Antikörper oder um Rezeptorproteine handeln, die über einen Linker an die Matrix der Chromatographiesäule gebunden sind.

In dieser Arbeit wurde M2-Sepharose (Sigma) zur Aufreinigung von ART1 verwendet. ART1 wurde aus stabil transfizierten DC27.10-Zellen durch Inkubation mit PI-PLC gewonnen (ca. 5 mL PI-PLC-Überstand). Der M2-Antikörper bindet den so genannten FLAG-Tag, der sich am N-Terminus von ART1 befindet. Da alle anderen Begleitproteine nicht gebunden werden und somit durch die Säule laufen, werden bei der anschließenden Elution der gebundenen Proteine sehr reine Fraktionen erhalten.

Zur Vorbereitung der M2-Sepharose-Säule wurde das Säulenmaterial (1/10 PI-PLC-Überstand-Volumen, 50 %ige M2-Sepharose) zunächst mit dem 20fachen Matrix-Volumen PBS gewaschen. Der PI-PLC Überstand wurde auf die Säule gegeben, der Durchfluss aufgefangen und nochmals auf die Säule gebracht. Die Säule wurde dreimal mit dem 10fachen Säulenvolumen PBS gewaschen. Eluiert wurde mit dem 5fachen Säulenvolumen 0,1 M Glycin-HCl (pH 3,5), und das Eluat wurde in mit 1/10 Säulenvolumen Neutralisationspuffer (1 M Tris-HCl, pH 8,0) versehenen Eppendorf-Gefäßen in 5 Fraktionen aufgefangen. Ein Aliquot (20 µL) jeder Fraktion wurde für die SDS-PAGE aufbereitet und die Proteine mittels Coomassie-Färbung im Gel sichtbar gemacht. Die ART1-enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt und die ART1-Proteinlösung wurde mittels Dialyse umgepuffert, um die hohen Salzkonzentrationen zu entfernen. Die reine ART1-Lösung wurde mit BSA (Endkonzentration 0,1 % (w/v)) versetzt und bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

4.1.8 Dialyse mittels Slide-A-Lyzer®-Dialyse-Kassetten

Durch das Prinzip der Dialyse lassen sich Proteinlösungen umpuffern. Dem Prinzip der Dialyse liegt der Durchtritt niedermolekularer Substanzen durch eine semipermeable Membran zugrunde. Die Triebkraft ist der Ausgleich des osmotischen Druckes, der aufgrund von Konzentrationsgefällen besteht. Aufgrund der Semipermeabilität der Membran werden größere Moleküle, wie Proteine zurückgehalten, kleinere Moleküle wie Salzionen können jedoch in Richtung ihres Konzentrationsgefälles durch die Membran diffundieren, bis das Konzentrationsgleichgewicht erreicht ist.

Das Dialyse-Verfahren wurde in dieser Arbeit zur Verringerung der Salzkonzentration, der für die ADP-Ribosylierung von TNF verwendeten ART1 aus den aufgereinigten PI-PLC-Überständen eingesetzt. Die verwendeten Dialyse-Kassetten (Slide-A-Lyzer, Pierce) hatten eine Molekulargewichts-Ausschlussgrenze (MWCO) von 3.5 kDa.

Die Eluate aus der M2-Affinitäts-Säule wurden mittels einer Spritze in die Slide-A-Lyzer-Dialyse-Kassette injiziert. Die Dialyse erfolgte unter Rühren über Nacht bei 4 °C

in 1 L PBS. Die umgepufferten Proteinlösungen wurden mit 0,1 % BSA versetzt und bei 4 °C aufbewahrt oder direkt für die ADP-Ribosylierungsreaktion (s. Abschnitt 4.4) eingesetzt.

4.1.9 ELISA

Der ELISA (*Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay*) ist ein immunologisches Nachweisverfahren [141], das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Mithilfe Enzym-gekoppelter spezifischer Antikörper werden biologische Substanzen in Lösungen nachgewiesen bzw. deren Konzentrationen bestimmt. In dieser Arbeit wurde das TNF-spezifische ELISA-Kit der Firma Immunotools eingesetzt, um die Konzentration der produzierten TNF-Mutanten aus HEK293-Zellkulturüberständen zu bestimmen (s. Abschnitt 4.3.6).

Der TNF-spezifische *Coating*-Antikörper wurde 1:1000 in *Coating*-Puffer verdünnt und je 100 µL der Antikörperlösung wurde in die Näpfe einer 96 well-ELISA-Platte gegeben. Nach über Nacht Inkubation bei 4 °C wurden die Platten 5x mit PBS gewaschen und mit 200 µl 1% (w/v) BSA in PBS (Blocklösung) pro Napf für 1 Stunde bei RT blockiert. Im Anschluss wurden die Platten 5x mit Waschpuffer (0,01 % Tween20 in PBS) gewaschen. 100 µl verdünnte Zellkulturüberstände oder verdünnte ADP-Ribosylierungsansätze (in DMEM-komplettmedium) wurden in die Näpfe gegeben und eine doppelte Standardreihe zur späteren Quantifizierung pipettiert. Die Platte wurde für 1 Stunde bei RT inkubiert und danach 5x mit Waschpuffer gewaschen. Der biotinylierte Detektionsantikörper wurde 1:1000 mit DMEM-Komplettmedium verdünnt und 100 µl Antikörperlösung in die jeweiligen Näpfe pipettiert. Nach 1 Stunde Inkubation bei RT wurden die Platten erneut 5x mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Zugabe von 100 µl verdünnter Streptavidin-Peroxidase-Lösung (1:1000, in DMEM-Komplettmedium) und eine 30minütige Inkubation bei RT. Die Platten wurden 5x mit Waschpuffer gewaschen. Für die Nachweisreaktion wurden pro Napf 100 µl TMB-Enzymsubstratlösung pipettiert und die Farbreaktion nach ca. 5-10 Minuten mit jeweils 50 µl 0,5 M Schwefelsäure gestoppt. Zur Auswertung wurde die Extinktion bei 450 nm gemessen und die Daten mit der (Microsoft) Software Excel bearbeitet.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Transformation von Bakterien

Die Transformationen in chemisch kompetente Bakterien (Stratagene) erfolgten nach Herstellerangaben durch einen Hitzeschock.

Es wurde 1 µL der Mutagenese-Ansätze in XL2-Blue oder XL10-Gold Bakterien transformiert. Für Retransformationen wurde ca. 1 ng Plasmid in kompetente XL2-Blue

Bakterien transformiert. Transformierte Bakterien wurden 1 h bei 37 °C und 240 rpm in SOC-Medium inkubiert und anschließend auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen.

4.2.2 Zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese ist eine molekularbiologische Methode [142], bei der mithilfe von Primern, die (mindestens) eine Mutation beinhalten, und einer zu mutierenden, rekombinanten DNA als Vorlage unter Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) eine zielgerichteten Veränderung von DNA *in vitro* erreicht werden kann.

Die zielgerichtete Mutagenese wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um spezifische Argininreste im TNF gezielt zu Lysinresten zu mutieren, um potentielle ADP-Ribosylierungsstellen im TNF auszuschalten mit der Absicht Informationen über die Ziel-Arginine von ART1 zu erhalten.

Ausgehend vom WT TNF, das innerhalb der Arbeitsgruppe in dem Kanamycin-Resistenzgen-tragenden pEGFP-Vektor kloniert und N-terminal mit einem HA-Tag versehen wurde (s. Tabelle 3. 4), wurde in Zusammenarbeit mit Mareike Pilz eine Reihe von TNF-Einzelmutanten (R6K, R31K, R32K, R44K, R103K, R131K, R138K) hergestellt. Eine Doppelmutante, das TNF(R6/32KK) wurde ausgehend von der TNF-Einzelmutante TNF(R6K) hergestellt. Die Mutagenese der TNF-Plasmide wurde nach dem Protokoll des *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Qiagen) durchgeführt. Die Tabelle 4. 1 zeigt die Zusammensetzung der PCR-Ansätze.

Tabelle 4. 1 Zusammensetzung der Mutagenese-Ansätze

Bestandteil	Volumen	Bemerkung
Vorwärtsprimer (10 µM)	1,25 µl	250 nM Endkonzentration
Rückwärtsprimer (10 µM)	1,25 µl	250 nM Endkonzentration
dNTP-Mix, je 10 mM	1 µl	je 200 µM Endkonzentration
PfuTurbo Reaktionspuffer (10x)	5 µl	
PfuTurbo	1 µl	2,5 U
Plasmid-DNA	x µl	Gesamtmasse: 25 ng
demineralisiertes Wasser	ad 50 µl	

Die eingesetzten Primer sind in Tabelle 3. 3 aufgelistet. Die Herstellung der Mutagenese-PCR wurde mit dem in folgender Tabelle angegebenen PCR-Programm durchgeführt.

Tabelle 4. 2 PCR-Programm für die Mutagenese von Plasmiden

<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Zykluszahl</i>
95 °C	30 s	1 x
95 °C	30 s	17 x
55 °C	1 min	
68 °C	7 min	
68 °C	10 min	1 x
4 °C	∞	1 x

Nach der PCR wurde dem Ansatz 1 µl *DpnI* (20 U) zugesetzt, um den Matrizenstrang zu verdauen. *DpnI*, eine TypII-Restriktionsendonuklease schneidet nur das methylierte Ursprungs-Plasmid, neu synthetisierte, unmethylierte DNA-Stränge bleiben unversehrt. Es wurde für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Es wurde 1 µl der Mutagenese-Ansätze in XL2-Blue oder in XL10-Gold ultrakompetente Zellen (Stratagene) transformiert und auf LB-Agarplatten mit Kanamycin ausgestrichen. Aus Einzelkolonien wurden 4 mL-Kulturen in LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Sequenzierung wurde der Erfolg der Mutagenese bestätigt.

4.2.3 DNA-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wird die DNA-Gelelektrophorese verwendet. DNA wandert aufgrund ihrer negativen Nettoladung im elektrischen Feld zur Anode. Aufgrund der Proportionalität von Ladung und Masse der DNA würde dies allein keine Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe ermöglichen. Erfolgt die Auftrennung allerdings in einer Matrix mit definierter Porengröße (meist Agarose), werden je nach Porengröße die längeren Fragmente stärker als die kürzeren behindert, je größer also die Fragmente desto langsamer wandern sie in Richtung Anode. Durch Änderung der Agarosekonzentrationen können unterschiedliche Porengrößen und damit Trennbereiche der Gelelektrophorese erzielt werden. Durch Zusatz des Farbstoffs Ethidiumbromid, der in (Desoxy)-Ribonukleinsäurehelices interkaliert und in diesem Komplex unter UV-Licht fluoresziert, kann die DNA sichtbar gemacht werden.

Die Agarose wurde durch Aufkochen in TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde 100 ng/mL Ethidiumbromid zugesetzt. Die Agaroselösung wurde in einen Gelträger mit Gelkamm gegossen und gelierte bei der Abkühlung. Das Gel wurde in eine mit TAE-Puffer gefüllte Laufkammer überführt. Die aufzutragende DNA-Probe wurde mit Ladepuffer (*Loading Dye* 6x; MBI Fermentas) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V. Anschließend wurde mit der Geldokumentationsanlage ein invertiertes Photo der Banden erstellt.

4.2.4 Präparation von Plasmid-DNA

Minipräparationen wurden mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kits* (Qiagen) aus 4 mL LB-Bakterienkultur durchgeführt. Die Elution erfolgte in 50 µL Elutionspuffer (10 mM TRIS, pH 8,5). Maxipräparationen wurden mit Hilfe des *Endofree Plasmid Maxi Kits* (Qiagen) aus 150 mL LB-Bakterienkultur durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 500 µL Elutionspuffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

4.2.5 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten nach der Sanger-Methode mit fluorochrommarkierten Didesoxynukleotiden [143]. Es wurde das *Dye-Terminator* Sequenzierungskit (*BigDye*, Applied Biosystems) eingesetzt. Die vorgefertigte *BigDye*-Reaktionslösung enthielt Enzym, Desoxynukleotide und die vier mit unterschiedlichen Fluorochromen markierten Terminatoren. Die Sequenzierungsansätze wurden aus 2 µL Plasmid-DNA (aus den Mini-Präparationen, ca. 500 ng DNA), 1,5 µL des *BigDye*-Reaktionsmixes, 6,5 µL *BigDye*-Puffer und 1 µM Sequenzierungsprimer in einem Gesamtvolumen von 20 µl zusammengesetzt. Die Sequenzierungsreaktion wurde in 28 Zyklen mit jeweils 40 Sekunden bei 96 °C, 15 Sekunden bei 50 °C und 4 Minuten bei 60 °C durchgeführt.

Im Anschluss wurde die DNA mit Ethanol gefällt. Dazu wurden 50 µL absolutes Ethanol und 2 µL 3M Natriumacetat in einem Eppendorfreaktionsgefäß vorgelegt, die Sequenzierungsprobe dazugegeben und gemischt. Es wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 13.000 rpm für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 170 µL 70 %igem Ethanol bei RT gewaschen. Es wurde bei 13.000 rpm 10 Minuten bei RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei RT getrocknet. Die Auswertung erfolgte auf dem *DNA-Sequencing System* Modell 370A (Applied Biosystems) des Servicelabors des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg.

4.3 Methoden der Zellkultur

4.3.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 3. 5 und Tabelle 3. 6 aufgeführt. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium im Brutschrank bei 37 °C und unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkultur-Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Alle Labormaterialien und Zellkulturmedien, die in der Zellkultur eingesetzt wurden, wurden zuvor für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert bzw. steril filtriert.

Die Suspensionszellen DC27.10 und KIT225 wurden üblicherweise in RPMI-Komplettmedium bzw. in RPMI(+IL-2)-Komplettmedium (KIT225) in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert. Zur Passagierung dieser Zellen wurde ein Aliquot der Zellsuspension in eine neue Kulturschale überführt und je nach Bedarf 1:2 bis 1:20 mit frischem Medium verdünnt. Zur Selektion von stabilen Transfektanten wurde 1 mg/mL Geneticin (G418) zugesetzt.

Die adhärent wachsenden HEK293-Zellen wurden in T25 Zellkulturflaschen in DMEM-Komplettmedium kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin und kurze Inkubation bei 37 °C abgelöst. Die Inaktivierung des Trypsin erfolgte durch Gabe von DMEM-Komplettmedium. Die Zellen wurden gewaschen und die Subkultivierung erfolgte je nach Bedarf im Verhältnis 1:2 bis 1:20.

Alle Zentrifugationen eukaryotischer Zellen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, für 5 Minuten bei 1.600 rpm und 4 °C. Die Zelldichte wurde mittels der Neubauer Zählkammer bestimmt.

4.3.2 Auftauen und Einfrieren eukaryotischer Zellen

Zellen können durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff (-196 °C) für lange Zeit gelagert werden, um bei Bedarf wieder aufgetaut und kultiviert zu werden. Um die intrazelluläre Ausbildung von Eiskristallen, die zur mechanischen Zerstörung der Zellen führen könnten, zu verhindern, wurde ihnen durch Zugabe des stark hygroskopischen Dimethylsulfoxid (DMSO) langsam Wasser entzogen. Dazu wurden $0,5 \cdot 10^7$ Zellen geerntet, in 1 mL kaltem Einfriermedium (siehe Abschnitt 3.4) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden direkt für 24 Stunden bei -80 °C eingefroren und erst anschließend bei -196 °C endgelagert.

Eingefrorene Zellen wurden schnell bei 37 °C aufgetaut und sofort mit 10 mL 37 °C warmen RPMI- bzw. DMEM-Medium versetzt, abzentrifugiert und mit frischem Kulturmedium versehen, um das zelltoxische DMSO zu entfernen. Für transfizierte Zelllinien wurde das Selektionsmedium erst 24 Stunden nach dem Auftauen zugegeben.

4.3.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Die in dieser Arbeit durchgeführten transienten Transfektionen von HEK293-Zellen mit eukaryotischen Expressionsplasmiden (s. Abschnitt 3.7, Tabelle 3. 4) wurden mittels des jetPEITM-Transfektionssystems (Polyplus) nach Herstellerangabe durchgeführt. Bei dem Transfektionsreagenz jetPEI handelt es sich um ein lineares Polyethylenimin, das die DNA in positiv geladene Partikel verdichtet, was die endozytotische Aufnahme der DNA durch die Zellen ermöglicht.

Die für Einzel-Transfektionen und Ko-Transfektionen eingesetzten Expressionskonstrukte, die eingesetzten DNA-Mengen der Maxipräparationen und ein Hinweis auf

den Einsatz der jeweiligen HEK293-Transfektanten sind der Tabelle 4. 3 zu entnehmen. Zur Kontrolle erfolgte die Transfektion mit einem irrelevanten Kontroll-Konstrukt (hIL-15). Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben. 24 bzw. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und für entsprechende Experimente eingesetzt.

Tabelle 4. 3 Tranfektionsansätze

<i>(Ko-) Transfektion mit</i>	<i>DNA-Menge (in µg)</i>	<i>Einsatz in</i>
ART1 + TNF WT	1 + 4	1G4-Assays s. Abschnitt 4.4.1
ART1 + TNFR2 FL	2 + 2	
* ART1 + hIL-15	1 + 4	
* ART1 + hIL-15	2 + 2	
* hIL-15 + TNFR2 FL	2 + 2	
ART1 + TNF WT / TNF-Mutanten	1 + 4	Radioaktiv-Assay s. Abschnitt 4.4.2
* ART1 + hIL-15	1 + 4	
* hIL-15 + TNF WT	1 + 4	
TNFR1 ØcD	5	TNF/Mutanten-Bindungsassays s. Abschnitt 4.5.2
TNFR2 ØcD	5	
TNFR2 FL	5	
* hIL-15	5	
ART1+TNF	2,5 + 2,5	TNFR-Fc-Bindungsassays s. Abschnitt 4.5.3
* ART1	5	
* TNF	5	
TNF WT / TNF-Mutanten	5	Produktion von TNF-Mutanten s. Abschnitt 4.3.6
* hIL-15	5	
TNF WT / TNF-Mutanten	5	Expressionsnachweis der TNF-Mutanten s. Abschnitt 4.3.5
ART1 + TNF WT / TNF-Mutanten	2,5 + 2,5	
* hIL-15	5	

* Kontrollansätze

4.3.4 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung der Zelllysate für den Radioaktivitäts- bzw. den 1G4-Assay (s. Abschnitte 4.4.1 und 4.4.2) wurden $2 \cdot 10^6$ der zuvor mit radioaktiv-markiertem ^{32}P -NAD bzw. mit ethenoNAD inkubierten HEK293-Transfektanten in 200 µl 1% Triton X-100 (w/v) in PBS eingesetzt.

Zur Herstellung von Zelllysaten für den NF-κB-Assay (Abschnitt 4.5.6) wurden $2 \cdot 10^6$ der zuvor mit TNF inkubierten KIT225-Zellen in 100 µL 1% NP-40 (w/v) in PBS eingesetzt.

Beide Lysepuffer enthielten zusätzlich zum Detergenz 1 mM AEBSF zur Hemmung von Proteinasen. Die Zellen wurden für 15-20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2.000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen, um Proteine von Zellkernen und nicht lysierten Zellen zu trennen. In einem zweiten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand bei 13.000 rpm für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, um größere Proteinaggregate zu entfernen.

Die Lysate wurden entweder für die Immunpräzipitation (s. Abschnitt 4.1.1) eingesetzt oder direkt (Gesamtzelllysate) für die SDS-PAGE vorbereitet.

4.3.5 “Fluorescence Activated Cell Sorting” (FACS) -Analysen

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse von Partikeln, wie z.B. Zellen, in einem Flüssigkeitsstrom. Die zu untersuchenden Zellen werden mit Hilfe einer sehr dünnen Kapillare einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Das Gerät misst dann für jede Zelle die Parameter „*forward scatter*“ (FSC), der eine Aussage über Partikelgröße erlaubt, und „*side scatter*“ (SSC), der eine Aussage über die Granularität d. h. innere Komplexität eines Partikels ermöglicht. Weiterhin können je nach technischer Ausstattung des Geräts noch ein oder mehrere Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und nachgewiesen werden. Dadurch können eine Vielzahl einzelner Zellen anhand ihrer Größe (FSC), ihrer Granularität (SSC) und z.B. durch vorangehender Markierung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmoleküle, anhand ihrer Zelloberflächenbeschaffung unterschieden werden. Das Argon-Laserlicht führt dabei zu einer Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe, die wiederum Fluoreszenzlicht emittieren. Diese Fluoreszenz kann durch verschiedene Photozellen detektiert werden.

In dieser Arbeit wurden FACS-Analysen an transfizierten und untransfizierten Zelllinien-Zellen und an humanen peripheren Blutzellen durchgeführt.

Wenn nicht anders angegeben wurden alle Anfärbungen nach folgendem Schema durchgeführt. Die Färbungen wurden in 96-well Platten (*V-bottom*) mit jeweils $5 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Ansatz durchgeführt. Für alle Wasch- und Inkubationsschritte wurde PBS verwendet. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 1.600 rpm und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand wurde abgekippt, und die Zellen wurden mit dem Primär- und dem Sekundär-Antikörper für jeweils 30 Minuten im Dunkeln bei 4 °C in einem Reaktionsvolumen von 100 µl inkubiert. Innerhalb vieler Versuchsreihen wurde, wenn möglich, eine Negativkontrolle mitgeführt, um eine eventuelle unspezifische Bindung der Antikörper ausschließen zu können. Als Negativkontrolle diente, abhängig vom Versuch, entweder der Einsatz eines irrelevanten Antikörpers, der dem Isotyp des relevanten Antikörpers entsprach und aus der gleichen Tierart gewonnen wurde, das Prä-Immunsereum bei Einsatz von polyklonalen Antiseren oder die untransfizierte Zelllinie. Außerdem wurde in einigen Versuchen, in denen ein Sekundär-Antikörper verwendet wurde, eine Probe nur mit Sekundär-Antikörper, aber ohne Primär-

Antikörper inkubiert. Nach jeder Inkubation erfolgte ein Waschschrift. Die Proben wurden in FACS-Röhrchen mit dem Durchflusszytometer (FACS CantoII) unter der Verwendung der dazugehörigen Software (BD FACS Diva) gemessen. Tote Zellen wurden durch die *Scatter*-Eigenschaften identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen. Wenn die Proben nicht am gleichen Tag gemessen wurden, wurden diese nach dem letzten Waschschrift mit 100 µl Fixierlösung (2 % PFA in PBS) versetzt und bei 4 °C im Dunkeln verwahrt.

Expressionsnachweis der TNF-Mutanten

Um die Oberflächenexpression der TNF-Mutanten (s. Abschnitte 3.7 und 4.2.2) nach Transfektion in HEK293-Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen 24 Stunden nach Transfektion geerntet und mit einem monoklonalen Maus-anti-TNF-Antikörper (1:100; Immunotools) bzw. einem monoklonalen biotinylierten Maus-anti-TNF-Antikörper (1:100; Immunotools) und einem PE-konjugierten Esel-anti-Maus-Antikörper bzw. mit PE-konjugiertem Streptavidin angefärbt. Für einige Versuche wurde mit ART1 und dem WT TNF bzw. der R6/32KK-Doppelmutante ko-transfiziert (je 2,5 µg DNA) und je $1 \cdot 10^6$ HEK293-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen NAD (20, 100, 500 µM) oder ohne NAD für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und im Anschluss gewaschen. Die Zellen wurden halbiert und jeweils mit den monoklonalen Maus-anti-TNF-Antikörpern (Immunotools) wie oben beschrieben angefärbt.

Oberflächenmolekülfärbungen von peripheren Blutleukozyten

Die Oberflächenmolekülfärbungen von PBLs erfolgte mit Vollblut in FACS-Röhrchen. 100 µL Vollblut wurden nach oder ohne vorherige TNF-Stimulation (s. Abschnitt 4.5.5) mit dem unkonjugierten Primär-Antikörper oder einem direkt Fluorochrom-konjugierten Antikörper für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Erythrozyten wurden unter gleichzeitiger Fixierung der Probe durch 10minütige Inkubation bei RT mit 1 mL Fix/Lyse-Puffer der Firma BD lysiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben mit 2 mL PBS versetzt und abzentrifugiert. Die PBLs wurden mit PBS gewaschen und gegebenenfalls wurde mit dem Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper im Dunkeln bei 4 °C in einem Reaktionsvolumen von 200 µL inkubiert. Die Unterscheidung der Blut-Subpopulationen in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten erfolgte im FACS anhand der sich deutlich voneinander unterscheidenden *Scatter*-Eigenschaften der einzelnen Subpopulation.

Die Analyse der *Scatter*-Eigenschaften wurde auch eingesetzt, um Veränderungen in der Granulozyten-Morphologie nach Stimulation mit TNF zu verfolgen (s. Abschnitt 4.5.5).

Die eingesetzte stabile KIT225-Transfektante wurden innerhalb dieser Arbeitsgruppe hergestellt (s. Tabelle 3. 6). Die eingesetzten transient transfizierten HEK293-Zellen wurden in dieser Arbeit mittels des Transfektionsreagenz jetPEITM erhalten (s. Abschnitt 4.3.3).

Die eingesetzten Konzentrationen der verwendeten Antikörper zur Färbung spezifischer Oberflächenmoleküle können der Tabelle 3. 1 und Tabelle 3. 2 (Abschnitt 3.6) entnommen werden.

4.3.6 Proteinproduktion löslicher TNF-Mutanten

Die löslichen TNF-Mutanten, bei denen einzelne Arginine zu Lysinen mutiert wurden (s. Abschnitt 4.2.2), wurden durch die konstitutive Freisetzung des TNF in den Zellkulturüberstand durch HEK293-Transfektanten erhalten.

Zwei Tage nach Transfektion mit den entsprechenden Expressionskonstrukten, wurden die Zellkulturüberstände (4 mL DMEM-Komplettmedium) der transfizierten HEK293-Zellen (s. Abschnitt 4.3.3) geerntet. Die Konzentrationen der TNF-Mutanten in den erhaltenen Überständen wurden mittels ELISA (s. Abschnitt 4.1.9) bestimmt. Die TNF-Mutanten wurden für unterschiedliche Funktionsassays eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden Zellüberstände von HEK293.TNF WT-Zellen eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde der Überstand von HEK293-Zellen, die mit einem irrelevanten Kontrollkonstrukt (hIL-15) transfiziert wurden, verwendet.

4.3.7 Proteinproduktion von löslicher ART1

Die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) schneidet den Lipidanteil GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-verankerter Zelloberflächenproteine ab [144].

PI-PLC wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, um die über den GPI-Anker in der Plasmamembran verankerte ART1 in nicht-zellgebundener, löslicher Form zu erhalten („PI-PLC-Überstände“).

Zur Herstellung der PI-PLC-Überstände aus DC27.10.hART1 wurden $1 \cdot 10^8$ Zellen/mL mit 0,1 U/mL PI-PLC für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde mehrmals vorsichtig invertiert. Nach Ablauf der Zeit wurde in einem ersten Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 1.600 rpm vorsichtig abzentrifugiert, um eine grobe Trennung von Zellen und Überstand zu erreichen. In einem zweiten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand für 20 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert, um restliche Zellfragmente und größere Proteinaggregate aus dem Überstand zu entfernen. Der ART1-haltige Überstand wurde bei 4 °C aufbewahrt oder direkt aufgereinigt (s. Abschnitt 4.1.7).

4.4 ADP-Ribosylierungen

4.4.1 1G4-Assay zum Nachweis ethenoADP-ribosylierter Proteine im Western-Blot

Die ADP-Ribosylierung von Proteinen durch ARTs kann mit Hilfe des 1G4-Antikörpers (Maus-anti-ethenoAdenosin) nachgewiesen werden. Die ethenoAdenosin-Gruppe ist in dem NAD-Analogon ethenoNAD vorhanden, welches ein effizientes Substrat für ARTs darstellt und von diesen auf Zielproteine übertragen wird. Dadurch ist es möglich, ADP-Ribosylierungen von Proteinen u. a. im Western-Blot nachzuweisen [145].

Immobilisierung von ART1

Zur Immobilisierung von ART1 wurde die aus PI-PLC-Überständen (s. Abschnitt 4.3.7) erhaltene lösliche, das FLAG-Epitop tragende ART1 an M2-Sepharose (Sigma) gekoppelt. 25 µl PI-PLC-Überstand (entspricht $2,5 \cdot 10^6$ Zellen) wurden mit 5 µl M2-Sepharose (50 %ige Suspension) 2 Stunden bei 4 °C unter Rollern inkubiert. Die Sepharose wurde zweimal mit RPMI gewaschen und bis zum Einsatz bei 4 °C gelagert.

ethenoADP-Ribosylierung von löslichem TNF durch immobilisierte, lösliche und zellständige ART1

Es wurde die ADP-Ribosylierung von löslichem TNF durch immobilisierte ART1, lösliche ART1 (aus PI-PLC-Überständen) bzw. ART1 auf vitalen Zellen (mit hART1 transfizierte DC27.10-Zellen) verglichen. Dazu wurden $2,5 \cdot 10^6$ DC27.10.hART1-Zellen, 25 µl PI-PLC-Überstand (entspricht $2,5 \cdot 10^6$ Zellen) und 5 µl hART1 gekoppelte Sepharose jeweils mit 50 µM ethenoNAD, 1 mM ADP-Ribose und 2 µg/mL rekombinantem TNF (R&D Systems) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl in RPMI für 4 Stunden bei 4 °C gerollt. Die Zugabe von ADP-Ribose diente der Produkthemmung eventuell vorhandener NADasen/ADP-Ribosylzyklasen wie CD38. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Proteine mittels anti-TNF-Antikörpers gekoppelter Protein G-Sepharose (Abschnitt 4.1.1) immunpräzipitiert und anschließend durch die SDS-PAGE (10 %iges Gel, MES-Puffer) aufgetrennt. Durch Silberfärbung wurden Gesamtproteine nachgewiesen, und ethenoADP-ribosylierte Produkte wurden im Western-Blot mittels des 1G4-Antikörpers (1,2 µg/mL) und anschließender Inkubation mit HRP-konjugiertem anti-Maus-IgG-Antikörper (1:2.500) detektiert.

ethenoADP-Ribosylierung von membranständigem TNF durch zellverankerte ART1

Die ADP-Ribosylierung von zellständigem TNF durch zellverankerte ART1 wurde mithilfe von HEK293-Zellen, die mit ART1 und TNF im Verhältnis 1:5 transient ko-transfiziert wurden (s. Abschnitt 4.3.3), untersucht. Zur Spezifitätskontrolle wurden HEK293-Transfektanten untersucht, die mit ART1 und einem Kontrollkonstrukt (hIL-15) ko-transfiziert wurden. Die HEK293-Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion geerntet, mit PBS gewaschen und $5 \cdot 10^6$ Zellen wurden für 30 Minuten bei

37 °C mit 50 µM ethenoNAD in einem Reaktionsvolumen von 500 µL inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und $2 \cdot 10^6$ Zellen wurden mit 200 µL 1 % TritonX-100 lysiert (s. Abschnitt 4.3.4). Die erhaltenen Gesamtzelllysate (GZL) wurden für die SDS-PAGE aufbereitet und 25 µL der GZL wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (entspricht $2,5 \cdot 10^5$ Zellen). Nach Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE (10 %iges Gel, MES-Puffer) wurden die ethenoADP-ribosylierten Proteine im Western-Blot wiederum mittels des 1G4-Antikörpers (1,2 µg/mL) und anschließender Inkubation mit HRP-konjugiertem anti-Maus-IgG-Antikörper (1:2.500) detektiert.

ethenoADP-Ribosylierung des TNFR2 durch zellverankerte ART1

Es wurde die ADP-Ribosylierung des TNFR2 durch ART1 untersucht. Dazu wurden HEK293-Zellen, die mit ART1 und dem Vollängen-TNFR2 (TNFR2 FL) im Verhältnis 1:1 ko-transfiziert wurden (s. Abschnitt 4.3.3), 24 Stunden nach Transfektion geerntet und für 30 Minuten bei 37 °C mit 50 µM ethenoNAD bzw. ohne ethenoNAD inkubiert. Zur Kontrolle wurden HEK293-Zellen nur mit ART1 oder nur mit dem TNFR2 und einem Kontrollkonstrukt (hIL-15) ko-transfiziert. Nach 3maligem Waschen wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen mit 200 µL 1 % TritonX-100 lysiert. Vor Einsatz in der SDS-PAGE wurde der TNFR2 mit Kaninchen-anti-TNFR2-Protein G-Sepharose immunpräzipitiert (s. Abschnitt 4.1.1). Es folgten SDS-PAGE (12 %iges Gel, MOPS-Puffer), Western-Blot und Immunodetektion mit dem 1G4-Antikörper (1,2 µg/mL) und dem HRP-konjugierten Schaf-anti-Maus-IgG-Antikörper (1:2.500).

4.4.2 TNF-Mutationsanalysen mit radioaktiv markiertem NAD

Der in dieser Arbeit durchgeführte Radioaktivassay mit radioaktiv markiertem NAD (^{32}P -NAD) ist eine sensitivere Alternative zum Nachweis ADP-ribosylierter Proteine als die Immunodetektion mittels des 1G4-Antikörpers. Er wurde hier eingesetzt, um die ADP-Ribosylierung von TNF-Mutanten (s. Abschnitt 4.2.2) durch ART1 zu testen.

HEK293-Zellen wurden mit ART1 und verschiedenen TNF-Mutanten (R6K, R32K, R6/32KK oder R31K) oder dem TNF WT jeweils im Verhältnis 1:5 transfiziert (s. Abschnitt 4.3.3). Zusätzlich wurden HEK293-Zellen mit ART1 und einem Kontrollkonstrukt (hIL-15) ko-transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und $1 \cdot 10^7$ Zellen/mL wurden mit 10 µM NAD, 500 µM ADPR und 5 µCi ^{32}P -NAD für 20 Minuten bei 37 °C in PBS in einem Reaktionsvolumen von 100 µL inkubiert. Die Zellen wurden 6x mit je 1 mL 500 µM ADPR in PBS gewaschen, und durch TritonX-100-Lyse wurden Gesamtzelllysate (100 µl je Ansatz) hergestellt (s. Abschnitt 4.3.4). 25 µL der GZL wurden in die Taschen eines Polyacrylamidgels (12 %ig) aufgetragen (entspricht $2,5 \cdot 10^5$ Zellen) und die Proteine wurden durch die SDS-PAGE (MES-Puffer) aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine PVDF-Membran wurde zunächst mit einem HRP-konjugierten anti-HA-Antikörper (1:500) (erkennt den N-terminal an die TNF-Proteine angehängten HA-Tag) immunodetektiert. Zur

Detektion wurde das ECL-System (Amersham) verwendet (s. Abschnitt 4.1.6). Im Anschluss wurde die PVDF-Membran 5x mit TBS-T gewaschen, um das ECL-Reagenz zu entfernen. Die Membran wurde getrocknet und für 7 Tage bei -80 °C einem Röntgenfilm (Kodak) exponiert. Der Film wurde mittels des automatischen Film-Entwicklers Curix60 von AGFA entwickelt.

4.4.3 Herstellung „prä-ADP-ribosylierter“ TNF-Proben

Um den Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf seine Wirkung zu untersuchen, wurde eine Reihe von Bindungs- und Funktions-Assays mit prä-ADP-ribosyliertem TNF durchgeführt.

Prä-ADP-ribosyliertes TNF wurde, wenn nicht anders angegeben, durch Inkubation von 25 µg/mL rekombinantem TNF (R&D Systems) mit 1 µg/mL aufgereinigter ART1 (s. Abschnitte 4.3.7 und 4.1.7) und unterschiedlichen Konzentrationen von NAD (4-1000 µM) in PBS (mit 0,1 % BSA (w/v)) über Nacht bei 4 °C unter Rollern erhalten. Das BSA wurde als *Carrier*-Protein zugesetzt, um eine unspezifische Bindung des TNF an die Reaktionsgefäßwände zu reduzieren. Zur Kontrolle wurde parallel ein TNF-Ansatz ohne Gabe von NAD, aber mit ART1 inkubiert („unmodifiziertes TNF“).

Für die massenspektrometrischen Analysen (s. Abschnitt 4.7) eingesetzte prä-ADP-ribosylierte und unmodifizierte TNF-Proben wurden wie gerade beschrieben durch Inkubation von rekombinantem TNF mit 1 µg/mL ART1 und 1 mM NAD bzw. ohne NAD erhalten. Zusätzlich wurden TNF-Proben in der MS untersucht, die durch 10 µg/mL im Institut rekombinant in *E.coli* produzierte mART2 (s. Abschnitt 3.8) und 1 mM NAD unter ansonsten gleichen Bedingungen prä-ADP-ribosyliert wurden.

Für einige Untersuchungen wurden aus transfizierten HEK293-Zellkulturüberständen gewonnene TNF-Mutanten (s. Abschnitt 4.3.6) in prä-ADP-ribosylierter Form eingesetzt. Für die Prä-ADP-Ribosylierung wurden je 10 ng/mL der TNF-Mutanten mit 50 ng/mL ART1 und 1 mM NAD bei 4 °C über Nacht unter Rollern inkubiert.

Alle TNF-Proben wurden bis zu ihrem Einsatz bei -20 °C verwahrt.

Die rekombinanten, prä-ADP-ribosylierten TNF-Proben wurden für ihren Einsatz in den unterschiedlichen Assays zwischen 1:2.500 und ca. 1:2.500.000 mit PBS verdünnt. Die prä-ADP-ribosylierten TNF-Mutanten bzw. der TNF WT aus den HEK293-Zellkulturüberständen wurden 1:10 mit PBS verdünnt.

4.5 Bindungs- und Funktions-Untersuchungen

4.5.1 Blockade der TNF-Rezeptoren

Zur Untersuchung der TNF-Rezeptor-Anteile an der Auslösung einzelner TNF-induzierter Effekte wurden die untersuchten Zellen vorab mit TNFR-spezifischen Antikörpern prä-inkubiert.

$1 \cdot 10^6$ KIT225-Zellen oder 100 μ L Vollblut wurden mit einem monoklonalen Maus-anti-TNFR1-Antikörper (5 μ g/mL, Klon: H398) und bzw. oder mit einem polyklonalem Kaninchen-anti-TNFR2-Antiserum (1:200) für 20-30 Minuten bei 4 °C oder bei RT vorinkubiert. Wenn nicht anders angegeben, blieb die Antikörperlösung während der Durchführung der Assays auf den Zellen.

Für den TNF-Zelloberflächenbindungs-Assay (s. Abschnitt 4.5.2) wurde nicht gebundener Antikörper nach Ablauf der Inkubationszeit 2x mit PBS von den Zellen gewaschen.

4.5.2 TNF-Zelloberflächenbindungsassay

Um den Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF oder von Punkt-Mutationen im TNF (s. Abschnitt 4.2.2) auf die Bindung an seine TNFR zu untersuchen, wurde die Zelloberflächenbindung von löslichem TNF an KIT225-Zellen oder an mit den TNFR (TNFR1 Δ cD, TNFR2 Δ cD oder TNFR2 FL) transient transfizierten HEK293-Zellen (s. Abschnitt 4.3.3) durchflusszytometrisch untersucht.

Bindungsassays mit „prä-ADP-ribosyliertem TNF“ und TNF-Mutanten

$5 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ KIT225-Zellen oder $5 \cdot 10^5$ transfizierte HEK293.TNFR-Zellen (24 Stunden nach Transfektion) wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0,3-10 ng/mL) von rekombinantem, unbehandeltem TNF (R&D Systems) oder mit 10 ng/mL prä-ADP-ribosyliertem (4-500 μ M NAD) bzw. unmodifiziertem TNF (s. Abschnitt 4.4.3) für 10 Minuten bei 4 °C in einem Volumen von 100 μ L inkubiert. Um die Oberflächenbindung der TNF-Mutanten zu untersuchen, wurden die KIT225-Zellen und die transfizierten HEK293-Zellen mit 10 ng/mL TNF-Mutanten (R6K, R31K, R32K oder R6/32KK) und TNF WT, die aus transfizierten HEK293-Zellüberständen gewonnen wurden (s. Abschnitt 4.3.6), ebenso behandelt. Als Negativkontrolle dienten PBS bzw. Zellkulturüberstände aus HEK293-Kontroll-Transfektanten.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde freies TNF durch zweifaches Waschen mit je 100 μ L PBS entfernt. Das zelloberflächengebundene TNF wurde mit einem polyklonalem Ziege-anti-TNF-Serum (R&D Systems) (1:100 verdünnt) und einem Phycoerythrin (PE)-konjugierten Esel-anti-Ziege-IgG-Sekundärantikörper im FACS detektiert.

Um den Anteil der TNFR an der TNF-Oberflächenbindung an KIT225-Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen vor der TNF-Inkubation mit TNFR-spezifischen Antikörpern für 20 Minuten bei 4 °C prä-inkubiert (s. Abschnitt 4.5.1), anschließend gewaschen und mit 10 ng/mL rekombinantem TNF oder ohne TNF (PBS-Kontrolle) inkubiert.

Bindungsassay mit „ko-ADP-ribosyliertem TNF“

Um den Einfluss der ADP-Ribosylierung durch membranständige ART1 auf die TNF-Oberflächenbindung zu untersuchen, wurden $1 \cdot 10^6$ stabil transfizierte KIT225.ART1-Zellen mit 100 μ M oder 1 mM NAD für 1 h bei 37 °C vorinkubiert und entweder mit 5 ng/mL rekombinantem TNF für weitere 10 Minuten bei 4 °C ko-inkubiert oder nach der NAD-Vorinkubation 1x mit PBS gewaschen und mit 5 ng/mL TNF alleine für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurden parallel untransfizierte KIT225-Zellen mit 1 mM NAD und 5 ng/mL TNF ko-inkubiert. Transfizierte und untransfizierte KIT225-Zellen wurden auch ohne NAD-Inkubation, mit 5 ng/mL TNF bzw. ohne jede Behandlung (PBS-Kontrolle) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 2x mit PBS gewaschen und das oberflächengebundene TNF wurde wie oben beschrieben mit dem Ziege-anti-TNF-Antiserum und dem PE-konjugierten Esel-anti-Ziege-Antikörper durchflusszytometrisch detektiert.

4.5.3 TNFR-Fc-Zelloberflächenbindungsassay

Um den Einfluss der ADP-Ribosylierung von zellständigem TNF durch zellverankerte ART1 auf die Bindung zum TNFR1 und zum TNFR2 zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen, die mit ART1 und TNF im Verhältnis 1: 1 ko-transfiziert wurden (s. Abschnitt 4.3.3), 24 Stunden nach Transfektion geerntet, gewaschen und je $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden mit 500 μ M NAD oder ohne NAD für 30 Minuten bei 37 °C in einem Reaktionsvolumen von 100 μ L inkubiert. Zur Kontrolle wurden HEK293-Zellen, die jeweils einzeln mit ART1 oder TNF transfiziert wurden, parallel untersucht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit 2,5 μ g/mL TNFR1-Fc- bzw. TNFR2-Fc-Fusionsprotein (rekombinanter TNF-Rezeptor mit humanem Fc-Teil fusioniert, R&D Systems) in PBS für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und die oberflächengebundenen TNFR-Fc-Proteine wurden mit einem FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-konjugierten Esel-anti-Human-IgG-Antikörper im FACS detektiert.

4.5.4 Zytotoxizitätsassay

Der in dieser Arbeit eingesetzte Zytotoxizitätsassay beruht darauf, dass tote Zellen mit Propidiumiodid (PI) angefärbt werden, das von lebenden Zellen nicht aufgenommen wird. Der Zytotoxizitätsassay wurde hier verwendet, um den Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF oder von Punkt-Mutationen im TNF (s. Abschnitt 4.2.2) auf seine zytotoxische Wirkung auf KIT225-Zellen zu untersuchen

Zytotoxizitätsassay mit „prä-ADP-ribosyliertem TNF“ und TNF-Mutanten
KIT225-Zellen wurden mit RPMI-Komplettmedium (ohne IL-2) gewaschen und in die Näpfe einer 96 well-Zellkulturplatte (Nunc) in RPMI-Komplettmedium (ohne IL-2) ausgesät. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL mit verschiedenen Konzentrationen (16-10.000 pg/mL) von rekombinantem, unbehandeltem TNF (R&D Systems) oder mit 1 ng/mL prä-ADP-ribosyliertem (4-500 μ M NAD) bzw. unmodifiziertem TNF (s. Abschnitt 4.4.3) für 24 Stunden bei 37 °C unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Zur Kontrolle wurden KIT225-Zellen mit PBS inkubiert. Für die Untersuchung des Einflusses der Punktmutationen im TNF auf den Zelltod wurden die KIT225-Zellen mit 5 ng/mL TNF-Mutanten (R6K, R31K, R32K oder R6/32KK) bzw. wildtyp TNF aus Zellkulturüberständen von entsprechenden HEK293-Transfektanten (s. Abschnitt 4.3.6) für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zellkulturüberstände aus HEK293-Kontroll-Transfektanten dienten als Negativkontrolle. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet und mit 0,2 μ g/mL PI für 15 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert und im FACS vermessen.

Um den Anteil der TNFR an dem TNF-induzierten Zelltod der KIT225-Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen vor der TNF-Inkubation mit TNFR-spezifischen Antikörpern für 20 Minuten bei RT in RPMI-Komplettmedium (ohne IL-2) prä-inkubiert (s. Abschnitt 4.5.1) und anschließend mit 0,2 ng/mL rekombinantem TNF oder ohne TNF (PBS-Kontrolle) für 24 Stunden ko-inkubiert.

Zytotoxizitätsassay mit „ko-ADP-ribosyliertem TNF“

Um den Einfluss der ADP-Ribosylierung durch membranständige ART1 auf die Zytotoxizität von TNF zu untersuchen, wurden $2 \cdot 10^5$ stabil transfizierte KIT225.ART1-Zellen in 200 μ L RPMI-Komplettmedium (ohne IL-2) mit 1 ng/mL rekombinantem TNF und verschiedenen NAD-Konzentrationen (4-500 μ M) für 24 Stunden bei 37 °C ko-inkubiert. KIT225.ART1-Zellen wurden parallel mit den verschiedenen NAD-Konzentrationen ohne TNF-Gabe bzw. mit 1 ng/mL TNF und ohne NAD inkubiert. Zur Kontrolle wurden $2 \cdot 10^5$ untransfizierte KIT225-Zellen mit 100 μ M NAD und 1 ng/mL TNF für 24 Stunden bei 37 °C ko-inkubiert, oder nur mit TNF bzw. nur mit NAD inkubiert. Für beide Zelllinien wurde außerdem eine PBS-Kontrolle durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 0,2 μ g/mL PI inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert.

4.5.5 Aktivierungsassay peripherer Granulozyten

Zur Bestimmung des Einflusses der ADP-Ribosylierung von TNF oder von Punkt-Mutationen im TNF (s. Abschnitt 4.2.2) auf die TNF-induzierte Aktivierung von Granulozyten, wurden humane periphere Blutleukozyten (PBLs) nach Stimulation mit TNF auf ihre Oberflächenexpression von CD62L und CD11b im FACS untersucht. Zusätzlich wurde die Änderung in der Granulozyten-Morphologie durchflusszytometrisch analysiert.

Das für die Versuche eingesetzte Blut wurde von Freiwilligen aus unserer Arbeitsgruppe gespendet. Als Gerinnungshemmer wurde Heparin eingesetzt. Die Stimulation und Antikörper-Färbung wurde, wenn nicht anders angegeben, in Vollblut durchgeführt.

Je 100 µL humanes Vollblut wurden mit verschiedenen Konzentrationen (8-1.000 pg/mL) von rekombinantem, unbehandeltem TNF (R&D Systems) oder mit 333 pg/mL prä-ADP-ribosyliertem (4-500 µM NAD) bzw. unmodifiziertem TNF (s. Abschnitt 4.4.3) für 1 Stunde bei 37 °C unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert und für CD62L angefärbt.

Für die CD11b-Expressionsuntersuchungen wurden 100 µL Vollblut mit 200 pg/mL prä-ADP-ribosyliertem (1mM NAD) oder unmodifiziertem TNF ebenso behandelt.

Außerdem wurden 100 µL Vollblut mit 1 ng/mL unmodifizierten oder prä-ADP-ribosylierten TNF-Mutanten (R6K, R32K oder R6/32KK) bzw. TNF WT (siehe Abschnitt 4.4.3) für 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Als Negativkontrolle wurde Vollblut mit PBS bzw. Zellkulturüberständen aus HEK293-Kontroll-Transfektanten (s. Abschnitt 4.3.6) unter gleichen Bedingungen inkubiert. Als Aktivierungskontrolle wurde mit 100 ng/mL PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat, ein Phorboldiester) für 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert [146].

Im Anschluss wurde mit einem monoklonalem, PE-konjugiertem Maus-anti-CD62L-Antikörper (1:5) oder einem monoklonalem, PE-konjugiertem Maus-anti-CD11b-Antikörper (1:100) für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf der Antikörper-Inkubationszeit wurden die Erythrozyten unter gleichzeitiger Fixierung der Proben lysiert (Fix/Lyse Puffer von BD, s. Abschnitt 4.3.5). Die Leukozyten wurden 1x mit PBS gewaschen und im FACS analysiert. Anhand der *Scatter*-Eigenschaften wurden die Leukozyten-Subpopulationen (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) unterschieden und getrennt voneinander analysiert.

Um den Anteil der TNFR an der TNF-induzierten Aktivierung der Granulozyten zu bestimmen, wurden 100 µL Vollblut vor der TNF-Inkubation mit TNFR-spezifischen Antikörpern für 30 Minuten bei 4 °C prä-inkubiert (s. Abschnitt 4.5.1). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Vollblut mit 100 pg/mL rekombinantem TNF oder ohne TNF (PBS-Kontrolle) für 1 Stunde bei 37° C ko-inkubiert und wie zuvor beschrieben weiter verfahren.

Zusätzlich zu ihrer Oberflächenmolekülexpression wurden die Granulozyten, die mit 333 pg/mL unmodifiziertem oder verschiedenen stark prä-ADP-ribosyliertem TNF und den anti-TNFR-Antikörpern inkubiert wurden, anhand ihrer *Scatter*-Eigenschaften auf die Veränderung ihrer Morphologie analysiert (s. Abschnitt 4.3.5).

4.5.6 NF- κ B-Aktivierungsassay

Durch Aktivierung der TNFR wird das NF- κ B-inhibierende Protein I κ B phosphoryliert und anschließend abgebaut, der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird freigesetzt und kann in den Zellkern wandern, um die Transkription seiner Zielgene zu aktivieren (s. Abschnitt 2.1.4). Innerhalb dieser Arbeit wurde der Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die TNF-induzierte Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade mittels Nachweis von phosphoryliertem I κ B und Nachweis des I κ B-Proteins durch spezifische Antikörper im Western-Blot untersucht.

NF- κ B-Aktivierungsassay mit „prä-ADP-ribosyliertem TNF“

$2 \cdot 10^6$ KIT225-Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 5, 1 oder 0,2 ng/mL prä-ADP-ribosyliertem (500 μ M NAD) bzw. unmodifiziertem TNF (s. Abschnitt 4.4.3) oder ohne TNF (PBS-Kontrolle) für 1 Stunde bei 37 °C unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre im Brutschrank in einem Volumen von 200 μ L inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit 100 μ L Lysepuffer (1 % NP-40 (v/v), 1mM AEBSF in PBS) für 15 Minuten bei 4 °C lysiert (s. Abschnitt 4.3.4). Die Ansätze wurden für die SDS-PAGE vorbereitet und zwei 10 %ige Polyacrylamidgele wurden mit jeweils 25 μ L der Gesamtzelllysate (entspricht $5 \cdot 10^5$ Zellen) beladen. Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE (MOPS-Puffer) wurden phosphoryliertes I κ B bzw. I κ B einzeln im Western-Blot mittels monoklonalem Maus-anti-P-I κ B-Antikörper bzw. Kaninchen-anti-Human-I κ B-Antikörper (beide in der Verdünnung 1:1000) und anschließender Inkubation mit HRP-konjugierten anti-IgG-Antikörpern (Schaf-anti-Maus-IgG-Antikörper bzw. Esel-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper; je 1:2.500) detektiert.

NF- κ B-Aktivierungsassay mit „ko-ADP-ribosyliertem TNF“

Um den Einfluss der ADP-Ribosylierung durch membranständige ART1 auf die TNF-induzierte Aktivierung von NF- κ B zu untersuchen, wurden $2 \cdot 10^6$ stabil transfizierte KIT225.ART1-Zellen mit 1 ng/mL rekombinantem, unbehandeltem TNF bzw. ohne TNF (PBS-Kontrolle) und 1 mM NAD bzw. ohne NAD für 1 Stunde bei 37 °C unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre in einem Reaktionsvolumen von 200 μ L inkubiert. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und mit 100 μ L Lysepuffer (1 % NP-40 (v/v) und 1mM AEBSF in PBS) für 15 Minuten bei 4 °C lysiert. Es folgten wie oben beschrieben SDS-PAGE (je 25 μ L der GZL), Western-Blot und Immunodetektion mit dem Maus-anti-P-I κ B-Antikörper bzw. Kaninchen-anti-Human-I κ B-Antikörper und entsprechenden HRP-konjugierten anti-IgG-Antikörpern.

4.6 Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie

Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) Spektroskopie ist eine Biosensortechnologie, die genutzt wird um biomolekulare Wechselwirkungen unterschiedlichster Art zu untersuchen. Das in dieser Arbeit verwendete System zur Detektion der SPR stammte von der Firma Biacore („Biacore 3000“), die als erste die SPR-Technologie kommerziell verfügbar machte [147]. Einer der beiden zu untersuchenden Analyten wird kovalent an einen Sensorchip gebunden und der (potentielle) Interaktionspartner wird mittels Fließinjektionssystems über den Chip geleitet. Dabei wird die Änderung des Brechungsindex (wird in „Response Units“, RU angegeben) verfolgt, die sich proportional zur Menge des gebundenen Interaktionspartners verhält.

Innerhalb dieser Arbeit wurde die SPR-Spektroskopie eingesetzt, um die Bindungseigenschaften von prä-ADP-ribosyliertem TNF (s. Abschnitt 4.4.3) an die beiden TNFR zu untersuchen. Dazu wurden rekombinante TNFR1-Fc- und TNFR2-Fc-Fusionsproteine (R&D Systems) kovalent an jeweils eine Miniaturflusszelle eines CM5-Sensorchips (GE-Healthcare) gekoppelt und rekombinantes TNF wurde in prä-ADP-ribosylierter bzw. unmodifizierter Form (s. Abschnitt 4.4.3) mittels eines Fließinjektionssystems über den Chip geleitet, und die Bindung wurde mittels Änderung des Brechungsindex detektiert.

Die Biacore-Experimente wurden mit Hilfe von Dr. Christian Schulze vom Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg an dem dort vorhandenen Biacore 3000-Gerät durchgeführt. Zunächst erfolgte die Aktivierung der Carboxylgruppen der carboxylmethylierten Dextran-Matrix des CM5-Sensorchips durch Inkubation der Flusszellen mit 0,2 M N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und 0,5 M N-Hydroxysuccinimid in dH₂O mit einer Flussrate von 5 µL/min für 7 Minuten. Direkt im Anschluss wurden 25 µg/mL des TNFR1-Fc- bzw. TNFR2-Fc-Fusionsprotein in 10 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,0) mit einer Flussrate von 10 µL/min über die Flusszellen geleitet, bis der Anstieg der „Response Units“ Werte zwischen 100 und 200 RU erreichte. Die Kopplung erfolgt über freie Amine im Protein. Zur Blockierung verbleibender aktivierter Carboxylgruppen wurde der Sensorchip mit 1 M Ethanolaminhydrochlorid (pH 8,5) für 7 Minuten mit einer Flussrate von 5 µL/min inkubiert. Anschließend wurden steigende Konzentrationen (1,25 nM – 20 nM) von prä-ADP-ribosyliertem (NAD-Konzentration pro Versuch zwischen 150 und 500 µM) bzw. unmodifiziertem TNF mit einer Flussrate von 10 µL/min nach der *titration kinetic* Methode analysiert. Für die Interaktionen wurden Proben für je 1 Minute injiziert und die Dissoziation für 2 bzw. 20 Minuten verfolgt. Die Sensoroberfläche wurde durch alternierende Injektion von 1 mM NaOH und 1 M NaCl in PBS regeneriert. Die Bindung von TNF an den TNFR1 oder den TNFR2 wurde durch Detektion der Änderung des SPR-Signals verfolgt.

4.7 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren, um die Masse von Teilchen zu bestimmen. Die zu untersuchende Substanz wird dazu in die Gasphase überführt und ionisiert. Die ionisierten Teilchen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt, in einem Massenanalysator nach dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis m/z aufgetrennt und detektiert. Die Massenspektrometrie wurde innerhalb dieser Arbeit dazu eingesetzt, die ADP-Ribosylierungsstellen im TNF zu identifizieren.

TNF, das, katalysiert durch humane ART1 oder murine ART2, mit 1 mM NAD prä-ADP-ribosyliert wurde (s. Abschnitt 4.4.3), wurde mit Trypsin oder V8-Protease oder mit beiden zusammen verdaut und die erhaltenen Peptide wurden mit einer Kombination aus Flüssigkeitschromatographie (LC) und Massenspektrometrie (MS) unter fragmentierenden und nicht-fragmentierenden Bedingungen untersucht (LC/MS^E- und LC/MS-Methode). Zur Kontrolle wurde unmodifiziertes TNF, das mit ART1 oder ART2, aber ohne NAD-Gabe behandelt wurde, ebenso proteolytisch verdaut. Der Verdau der Proben und die MS-Untersuchungen selber wurden von Dr. Friedrich Buck, Institut für Klinische Chemie (UKE-Hamburg) durchgeführt.

Zunächst wurden die TNF-Proben in 50 mM NH_4HCO_3 mit 0,1% RapiGest SF surfactant (Waters) für 10 Minuten bei 80 °C inkubiert, um die Proteine dem proteolytischen Verdau zugänglich zu machen. Zur Reduktion der Disulfid-Brücken wurde nach Gabe von 5 mM DTT (Dithiothreitol) für weitere 10 Minuten bei 60 °C inkubiert. Die reduzierten Cysteine wurden durch Inkubation mit 15 mM Iodoacetamid (30 Minuten bei RT) carbamidomethyliert. Schließlich wurde(n) die Protease(n) in einer Endkonzentration von 5 ng/ μL zugesetzt und die TNF-Proben wurden über Nacht bei 37 °C verdaut. ART1 modifiziertes TNF wurde mit Trypsin und V8 einzeln verdaut, ART2 modifiziertes TNF wurde dem Doppelverdau mit Trypsin und V8 unterzogen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der pH-Wert durch Gabe von konzentrierter Salzsäure auf unter 2 gesenkt; dadurch wurde das zugesetzte Detergenz in unlösliche Komponenten gespalten. Die Proben wurden bei 13.000 rpm abzentrifugiert und 1-3 μL wurden für einen LC/MS-Lauf eingesetzt.

Die erhaltenen Peptide wurden mit einem an ein Trennsystem (nanoUPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*)-System, Waters) gekoppelten Massenspektrometer (QTOF Premier, Micromass) analysiert. Die Proben wurden auf eine Sammel-Säule (nanoAquity UPLC-Säule, C18, 180 μm x 20mm; Waters) aufgetragen und für 10 Minuten mit 5% Acetonitril/0,1% Ameisensäure gewaschen (5 $\mu\text{L}/\text{min}$). Die Proben wurden mit 400 nL/min eines Gradienten (A: 0,1% Ameisensäure; B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril, 5%-50% B in 30 Minuten) von einer Trenn-UPLC-Säule (nanoAquity UPLC-Säule, C18, 100 μm x 100mm; Waters) eluiert.

Die Eluate der an ein Massenspektrometer (QTOF Premier tandem mass spectrometer, Micromass) gekoppelten UPLC-Säule wurden kontinuierlich massenspektrometrisch analysiert. Die Elektrospray-Ionisation wurde mit einem Stahl-Emitter (I.D. 30 μm , Proxion, Odense) mit einer Kapillarspannung von 2,6 kV durchgeführt. Zu jedem

Zeitpunkt der Elution wurden zwei Massenspektren, eines unter fragmentierenden (MS^E), eines unter nicht-fragmentierenden Bedingungen aufgenommen. MS^E -Spektren wurden mit einer CID (*collision induced dissociation*)-Spannung von 28 V aufgenommen.

5. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit hat die strukturellen und funktionellen Konsequenzen der ADP-Ribosylierung des pro-inflammatorischen Zytokins Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF) durch humane ADP-Ribosyltransferase-1 (ART1) zum Thema. Die Ergebnisse werden in zwei Bereiche unterteilt. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Auswirkung der ADP-Ribosylierung von TNF auf seine Funktion. Die Experimente schließen Bindungsstudien von ADP-ribosyliertem TNF an die beiden TNF-Rezeptoren und Untersuchungen zur biologischen Wirkung auf Zielzellen ein. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Identifizierung der ADP-Ribosylierungsstelle(n) im TNF-Molekül. Dazu wurden massenspektrometrische und Mutationsanalysen durchgeführt.

5.1 Funktionelle Konsequenzen der ADP-Ribosylierung von TNF durch ADP-Ribosyltransferase-1

5.1.1 ADP-Ribosylierung von TNF durch ADP-Ribosyltransferase-1

In meiner Diplomarbeit hatte ich gezeigt, dass rekombinantes humanes TNF von löslicher ART1 ADP-ribosyliert werden kann. Es stellte sich daher zunächst die Frage, ob dies auch für endogenes, von menschlichen Zellen produziertes TNF gilt, und ob die Modifikation auch unter anderen topologischen Bedingungen stattfinden kann. Sowohl TNF als auch ART1 können im Organismus sowohl in zellgebundener als auch in löslicher Form vorkommen. Das Zytokin TNF wird zunächst als integrales Membranprotein auf der Zelloberfläche exprimiert, von der es durch die Aktivität der Metalloprotease TACE (*TNF-alpha converting enzyme*) abgeschnitten wird. ART1 ist ein GPI-verankertes Oberflächenenzym, das vermutlich ebenfalls in aktiver Form von der Zelle abgeschnitten werden kann.

Zunächst wurde untersucht, ob rekombinantes, lösliches TNF von ART1 unter unterschiedlichen topologischen Bedingungen (löslich, immobilisiert, zellständig) modifiziert werden kann (Abb. 5. 1 A). Dazu wurde lösliche ART1 durch Inkubation von DC27.10.ART1.GPI-Zellen mit PI-PLC (Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C), welche GPI-verankerte Proteine von der Zelloberfläche spaltet, erhalten. Immobilisierte ART1 wurde durch Inkubation des PI-PLC-Überstandes mit M2-Sepharose (Sigma) hergestellt. Der M2-Antikörper (anti-FLAG-tag) bindet dabei an das in der ART1 enthaltene N-terminale FLAG-Epitop. Als Quelle von zellständigem ART1 wurden DC27.10.ART1.GPI-Zellen verwendet. Die ADP-Ribosylierung von TNF durch ART1 wurde mit Hilfe des für ethenoAdenosin spezifischen 1G4-Antikörpers nachgewiesen [145]. Dazu wurde TNF in Gegenwart von ART1 mit dem NAD-Analogon 1,6-ethenoNAD inkubiert. Der Einbau von ethenoADP-Ribose in das Protein wurde anschließend im Western-Blot mit Hilfe des 1G4-Antikörpers detektiert.

In dem in Abb. 5. 1 A dargestellten Versuch wurde rekombinantes, lösliches TNF in Gegenwart von 50 μ M ethenoNAD mit löslicher (Spur L), an Protein G-Sepharose immobilisierter (Spur I), oder zellständiger (Spur Z) ART1 inkubiert. Das TNF wurde durch Immunpräzipitation aufgereinigt, und die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. ethenoADP-ribosylierte Proteine wurden mit Hilfe des 1G4-Antikörpers detektiert.

Alle drei Präzipitate enthielten eine deutliche Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 17 kDa, welches der vorhergesagten Größe des eingesetzten rekombinanten TNF (17,5 kDa, R&D Systems) entspricht. Die zwei zusätzlich auftretenden Banden in Spur I, die auch in den beiden anderen Spuren zu erkennen sind, können der schweren (ca. 50 kDa) bzw. leichten (ca. 25 kDa) Kette des zur IP eingesetzten anti-TNF-Antikörpers zugeordnet werden. In den Spuren L und Z ist noch eine Vielzahl weiterer Banden sichtbar, die kontaminierenden anderen ADP-ribosylierten Proteinen entsprechen, jedoch in einem höheren Molekulargewichtsbereich liegen und den Nachweis von ethenoADP-ribosyliertem TNF nicht stören.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob neben rekombinantem, in Bakterien hergestellten TNF auch endogenes, von menschlichen Zellen hergestelltes TNF von ART1 modifiziert werden kann. Da bakteriell hergestelltes in Gegensatz zu endogenem TNF nicht glykosyliert ist, sollten diese Versuche auch darüber Aufschluss geben, ob die ADP-Ribosylierung von TNF *in vivo* eventuell durch die Glykosylierung des Moleküls blockiert sein kann.

Um diese Frage zu untersuchen, wurden TNF und ART1 in HEK293-Zellen ko-transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet und mit 50 μ M ethenoNAD inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurden die Zellen lysiert. Zur Kontrolle wurden HEK293-Zellen nur mit ART1, ohne TNF transfiziert. Wie oben beschrieben wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen, und ethenoADP-ribosylierte Proteine wurden mit Hilfe des 1G4-Antikörpers (1G4) immunodetektiert.

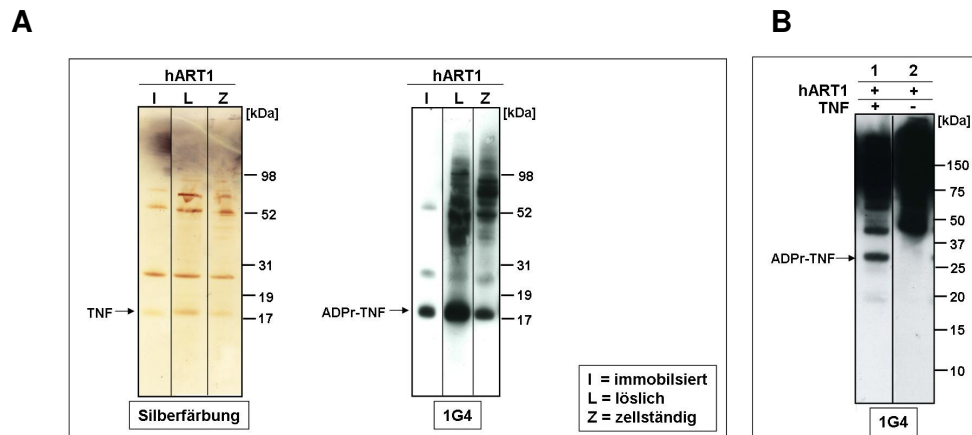


Abb. 5. 1: ethenoADP-Ribosylierung von TNF durch immobilisierte, lösliche und zellständige ART1. A) 100 ng rekombinantes TNF (in 0,1% BSA in PBS) wurde mit

unterschiedlichen Formen von ART1, 50 μM eNAD und 1 mM ADPR für 4 h bei 4 °C inkubiert. Das TNF wurde mit Maus-anti-TNF-Protein G-Sepharose (Klon: MAb1) immunpräzipitiert. Es folgten SDS-PAGE, Western-Blot und Silberfärbung bzw. Immunodetektion. Spur **I** = 5 μL ART1-M2-Sepharose, Spur **L** = 25 μL ART1-PI-PLC-Überstand (entspricht $2,5 \times 10^6$ Zelläquivalenten), Spur **Z** = $2,5 \times 10^6$ DC-27.10.ART1.GPI-Zellen. Als Proteingrößenstandard wurde der MultiMark[®] Multi-Colored Standard (Invitrogen) verwendet (10 μL). **B**) HEK293-Zellen wurden mittels des JetPEI[™] Transfektions-Systems (Polyplus-transfection) mit ART1 und TNF ko-transfiziert (Spur 1). Zur Kontrolle wurden HEK293-Zellen nur mit ART1 transfiziert (Spur 2). 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und für 30 min bei 37 °C mit 50 μM eNAD inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurden $10^7/\text{mL}$ Zellen mit 1 % TritonX-100 lysiert, 25 μL der GZL wurden aufgetragen (entspricht $2,5 \cdot 10^5$ Zellen). Es folgten SDS-PAGE, Western-Blot und Immunodetektion. Als Proteingrößenstandard wurde der Kaleidoscope[™] Precision Plus Protein Standard (BioRAD) eingesetzt (4 μL). **A+B**) Immunodetektion: 1G4-Antikörper (1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und Schaf-anti-Maus-IgG-HRP (Amersham, 1:2.500). Zur Detektion wurde das ECL-System (Amersham) verwendet.

In Abb. 5. 1 B weisen die Lysate der HEK293.ART1/TNF-Ko-Transfektanten (Spur 1) eine deutliche Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 28 kDa, was der erwarteten Größe des zellständigen, unprozessierten TNFs entspricht (25,6 kDa). Die Lysate der Kontrollzellen, die nur mit ART1 transfiziert wurden, weisen auf dieser Höhe keine Bande auf (Spur 2). Auch in diesem Blot ist eine Vielzahl weiterer Banden zu sehen, die anderen ADP-ribosylierten Proteinen entsprechen, die aber auf Grund ihres höheren Molekulargewichts den Nachweis des modifizierten TNFs nicht stören. Zusammengefasst zeigen die in diesem Abschnitt dargestellten Versuche, dass rekombinantes TNF gleichermaßen von löslicher, immobilisierter, oder zellständiger ART1 modifiziert werden kann. Dabei erscheint die Modifizierung durch lösliche ART1 relativ gesehen am effizientesten. Weiterhin wurde gezeigt, dass auch endogenes, von humanen Zellen produziertes, und damit normal glykosyliertes TNF von zellständiger ART1 effizient ADP-ribosyliert wird.

5.1.2 Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die Bindung an beide TNF-Rezeptoren

Da durch die ART-katalysierte Reaktion eine sehr große, sperrige (ca. 540 Da) und zusätzlich zweifach negativ geladene ADP-Ribosegruppe in das TNF-Molekül eingebracht wird, ist davon auszugehen, dass diese posttranslationale Modifikation nicht ohne Auswirkung auf das TNF bleibt. Als erstes wurde untersucht, ob die ADP-Ribosylierung die Bindung von TNF an seine Rezeptoren beeinflusst. TNF vermittelt seine Wirkung durch Bindung an zwei verschiedene TNF-Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2. In diesem Abschnitt wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet, um das Bindungsverhalten von ADP-ribosyliertem TNF zu den Rezeptoren zu studieren. Die erste untersucht die Bindung von ADP-ribosyliertem vs. unmodifiziertem TNF an der Oberfläche der T-Lymphom-Zelllinie KIT225, die zweite nutzt die Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie (Biacore Methode), um die molekulare Wechselwirkung von ADP-ribosyliertem und unmodifiziertem TNF mit seinen Rezeptoren zu überprüfen.

Oberflächenbindung an KIT225-Zellen

Die humane T-Lymphomzelllinie KIT225 wurde in dieser Arbeit für Untersuchungen zu unterschiedlichen TNF-induzierten Effekten eingesetzt. So auch um den Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die Bindung an Zelloberflächen zu untersuchen. Dazu wurde zunächst das Expressionsniveau beider TNF-Rezeptoren auf den KIT225-Zellen untersucht. Abb. 5. 2 zeigt, dass beide TNF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von KIT225-Zellen exprimiert wurden, wobei das Signal für den TNFR2 stärker war als das für den TNFR1.

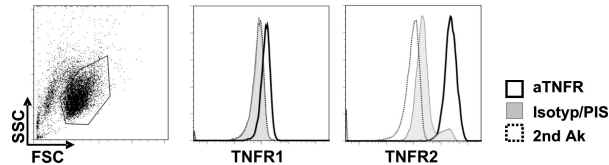
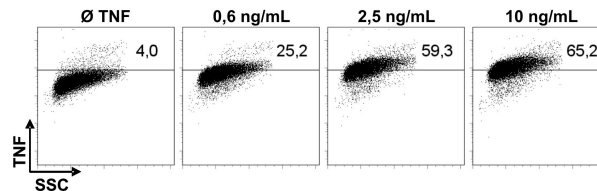


Abb. 5. 2 Oberflächenexpression von TNFR1 und TNFR2 auf KIT225-Zellen: Je 10^6 KIT225-Zellen wurden mit einem monoklonalen Maus-anti-TNFR1-Ak (1:100) oder einem polyklonalen Kaninchen-anti-TNFR2-Serum (1:200) für 30 min bei 4°C inkubiert und mit einem entsprechendem PE-konjugierten Sekundär-Antikörper (1:100) angefärbt. Die Zellen wurden im FACS analysiert. Anhand der *Scatter*-Eigenschaften wurden vitale von toten Zellen unterschieden und nur die vitalen Zellen wurden analysiert. Die Histogramme zeigen die mittleren Fluoreszenzintensitäten der vitalen Zellen für TNFR1 und für TNFR2 (schwarze Linien). Isotyp-Antikörper (anti-V5-IgG2a) bzw. Prä-Immunsereum (grau-gefüllt) und Anfärbungen ohne Primär-Antikörper (gestrichelt) wurden zur Spezifitätskontrolle eingesetzt.

Danach wurde untersucht, ob die Bindung von TNF an die TNF-Rezeptoren auf der Oberfläche dieser Zellen nachgewiesen werden konnte. Dazu wurden KIT225-Zellen mit löslichem TNF inkubiert, und anschließend mit einem TNF-spezifischen Ziegen-Antiserum und PE-konjugiertem anti-Ziege-IgG-Antikörper gefärbt.

A



B

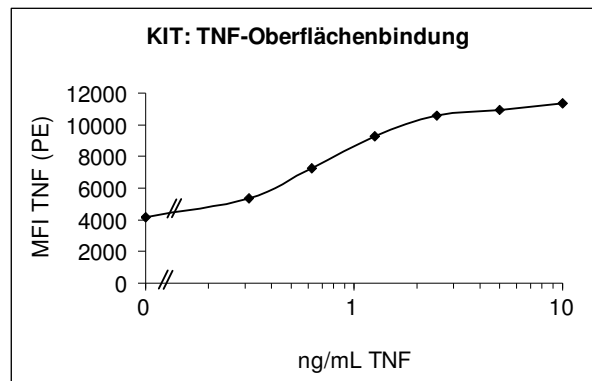


Abb. 5. 3: Oberflächenbindung von TNF auf KIT225-Zellen: Jeweils 10^6 KIT225 Zellen wurden mit verschiedenen TNF-Konzentrationen (0,3; 0,6; 1,2; 2,5; 5 und 10 ng/mL) in PBS und ohne TNF für 10 min bei 4 °C inkubiert und gewaschen. Das oberflächengebundene TNF wurde mit einem Ziege-anti-TNF-Serum und einem PE-konjugierten Esel-anti-Ziege-Ak detektiert. **A)** *Dotblot*-Darstellung der TNF-Bindung gegen *Side Scatter* (SSC) für die TNF-Konzentrationen 0; 0,6; 2,5 und 10 ng/mL, die Zahlen geben die % TNF-bindender Zellen wieder. **B)** Diagramm-Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensitäts- (MFI-) Werte von TNF gegen die TNF-Konzentration (ng/mL), in logarithmischer Skalierung aufgetragen.

Die *Dotblots* in Abb. 5. 3 A zeigen einen deutlichen Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensitäten der KIT225-Zellen mit steigender TNF-Konzentration. Die Zahlen geben die Prozentzahl der Zellen an, deren TNF-Bindung über einem bestimmten Schwellenwert liegt. Ohne Zugabe von TNF liegen nur 4% der Zellen oberhalb des Schwellenwerts, nach Gabe von 10 ng/mL TNF sind es ca. 65 % der Zellen. Die Abb. 5. 3 B zeigt das selbe Ergebnis in einer anderen Darstellung. Hier wurde die MFI gegen die TNF-Konzentration logarithmisch aufgetragen. Das Anstiegsmaximum der TNF-Bindung liegt in dem Bereich um 1 ng/mL, der Sättigungsbereich setzt bereits bei ca. 2,5 ng/mL TNF ein. Die KIT225-Zellen eignen sich also, um die Oberflächenbindung des TNFs eindeutig und konzentrationsabhängig nachzuweisen.

Um nun den Einfluss der ADP-Ribosylierung des TNFs auf seine Oberflächenbindung an KIT225-Zellen zu untersuchen, wurde verschieden stark prä-ADP-ribosyliertes TNF auf die Zellen gegeben, und das auf der Zelloberfläche gebundene TNF wurde wie oben beschrieben detektiert. Das unterschiedlich stark prä-ADP-ribosylierte TNF wurde durch über Nacht Inkubation von 25 µg/mL TNF und gereinigter ART1 mit verschiedenen NAD-Konzentrationen (4 - 500 µM) (s. Abschnitt 4.4.3) hergestellt. Alle TNF-Präparationen wurden in einer Konzentration von 10 ng/mL TNF, also im anfänglichen Sättigungsbereich der Bindung eingesetzt (Abb. 5. 3). Der Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die Zell-Oberflächenbindung ist in Abb. 5. 4 gezeigt.

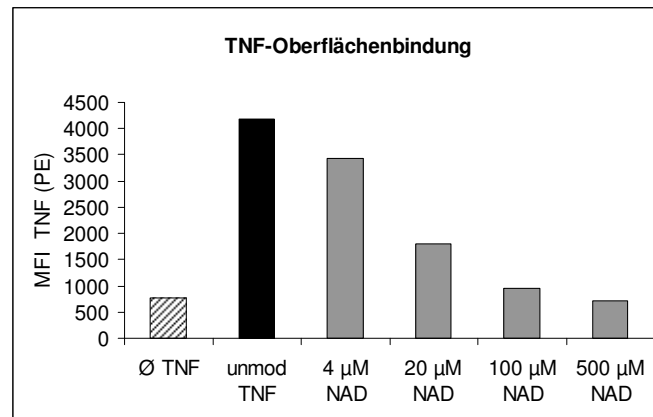


Abb. 5. 4 Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die Oberflächenbindung an KIT225-Zellen: Prä-ADP-ribosyliertes TNF wurde durch über Nacht Inkubation von 25 µg/mL rekombinantem TNF (in 0,1 % BSA in PBS) mit 1 µg/mL ART1 und unterschiedlichen Konzentrationen von NAD (4; 20; 100; 500 µM) bei 4 °C erhalten. Das unmodifizierte TNF wurde genauso behandelt wie das prä-ADP-ribosylierte, jedoch ohne Zusatz von NAD. Jeweils 10^6 KIT225 Zellen wurden mit 10 ng/mL prä-ADP-ribosyliertem bzw. unmodifiziertem TNF und

ohne TNF für 10 min bei 4 °C inkubiert und gewaschen. Das oberflächengebundene TNF wurde mit einem Ziege-anti-TNF-Serum und einem PE-konjugierten Esel-anti-Ziege-Ak detektiert. Das Balkendiagramm zeigt die MFI-Werte der einzelnen TNF-Präparationen. Die Analyse schließt tote Zellen aus.

Wie im vorherigen Versuch bereits gezeigt, kann die Bindung des unmodifizierten TNF (schwarzer Balken) an KIT225-Zellen durch einen deutlichen Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität gegenüber dem Ansatz ohne TNF-Inkubation (gestreifter Balken) nachgewiesen werden. Die grauen Balken zeigen die Bindung an KIT225-Zellen mit unterschiedlich stark prä-ADP-ribosylierten TNF-Proben. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit steigendem Grad an Prä-ADP-Ribosylierung (steigende NAD-Konzentration bei der Vorinkubation des TNF) die Bindung von TNF an die KIT225 Zellen abnimmt. Für den mit 500 µM NAD maximal ADP-ribosylierten TNF-Ansatz geht der MFI-Wert beinahe auf den Wert des Ansatzes ohne zugesetztes TNF zurück, die Bindung wird also durch die ADP-Ribosylierung fast vollständig blockiert. Weiterhin zeigt sich, dass selbst die ADP-Ribosylierung mit niedriger NAD-Konzentration (4 µM NAD) schon ausreicht, um eine leichte Reduktion der TNF-Oberflächenbindung zu erzielen. Die Ergebnisse zeigen also eindeutig, dass die TNF-Oberflächenbindung an KIT225-Zellen durch ADP-Ribosylierung von TNF blockiert wird, und dass dieser Effekt mit dem Grad der ADP-Ribosylierung des TNFs korreliert.

Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie (Biacore)

Eine andere Möglichkeit, die Bindungseigenschaften von TNF an die beiden TNF-Rezeptoren zu untersuchen, stellt die Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie (SPR) dar (s. Abschnitt 4.6). Es handelt sich hierbei um eine Biosensortechnologie, die genutzt wird, um biomolekulare Wechselwirkungen unterschiedlichster Art zu untersuchen. TNFR1- und TNFR2- (als Fc-Fusionsproteine; R&D Systems) wurden an jeweils eine Miniaturflusszelle eines CM5-Sensorchips kovalent gekoppelt. Aufsteigende Konzentrationen von prä-ADP-ribosyliertem (25 µg/mL rekombinantes humanes TNF; 1 µg/mL aufgereinigte ART1; 150 µM NAD; 0,1 % BSA, üN; 4 °C) oder unmodifiziertem TNF (derselbe Ansatz, aber ohne NAD) wurden mittels eines automatisierten Fließinjektionssystems über die Flusszellen geleitet (Biacore). Die Bindung der TNF-Proben an den TNFR1 oder den TNFR2 wurde durch Detektion der Änderung des SPR-Signals verfolgt. Dieser Messwert, der ein direktes Maß für die Menge des gebundenen TNFs an seinen Rezeptor ist, wird in „*Response Units*“, RU angegeben und in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

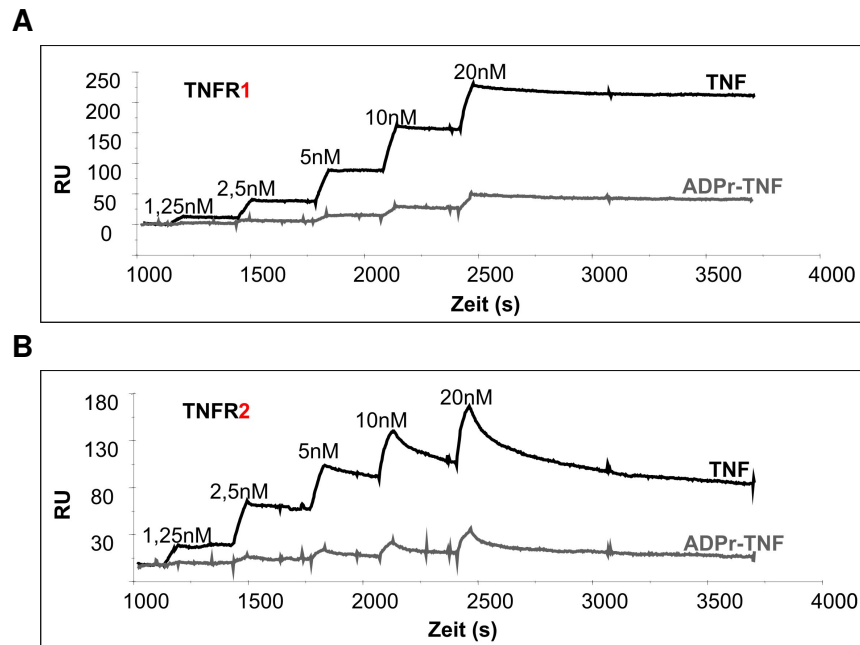


Abb. 5. 5 Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie (Biacore): Rekombinantes TNFR1-Fc-Fusionsprotein (**A**) oder TNFR2-Fc-Fusionsprotein (**B**) wurden an jeweils eine Miniaturflusszelle eines Sensorchips (CM5) kovalent gekoppelt. Steigende Konzentrationen (1,25 nM – 20 nM) von prä-ADP-ribosyliertem bzw. unmodifiziertem TNF wurden mittels eines Fließinjektionssystems über den Chip geleitet, und die Bindung wurde mittels Änderung des Brechungsindexes detektiert. Die Angabe dieser Änderung erfolgte in „Response Units“ (RU) und wird in Abhängigkeit von der Zeit (s) dargestellt. Prä-ADP-ribosyliertes TNF wurde durch Inkubation von 25 µg/mL TNF mit 1 µg/mL ART1 und 150 µM NAD üN bei 4 °C hergestellt. Unmodifiziertes TNF wurde gleich behandelt, jedoch ohne Zugabe von NAD.

Die beiden Graphen in Abb. 5. 5 zeigen die Bindung von ADP-ribosyliertem und unmodifiziertem TNF an TNFR1 (A) und TNFR2 (B). Die jeweilige Kurve für das unmodifizierte TNF (schwarze Kurven) zeigt die zu erwartende Zunahme der „Response Units“ (proportional zur Menge an gebundenem TNF) mit steigender TNF-Konzentration. Dabei ist die Assoziationsgeschwindigkeit von TNF zu beiden Rezeptoren ähnlich, wohingegen die Dissoziation von TNF von dem TNFR2 schneller erfolgt, als es für TNFR1 der Fall ist.

Die grauen Kurven zeigen die Bindung von ADP-ribosyliertem TNF an die jeweiligen Rezeptoren. Das ADP-ribosylierte TNF wurde in gleichen Konzentrationen wie das native TNF eingesetzt (1,25 - 20 nM). Es ist zu erkennen, dass auch bei höheren TNF-Konzentrationen kein wesentlicher Anstieg der RU zu verzeichnen ist.

Aus der Messung wurden unter Annahme eines 1:1-Bindungsmodells die Assoziationsraten (k_a), Dissoziationsraten (k_d) und Dissoziationsgleichgewichtskonstante (K_D) mit Hilfe der BIAevaluation3.0 Software (Biacore) für die Bindung von TNF an beide Rezeptoren bestimmt (s. Tabelle 5. 1). Die Dissoziationskonstante (K_D -Wert) für das ADP-ribosylierte TNF war für die Bindung an den TNFR1 um das ca. sechsfache, für den TNFR2 um das ca. 20fache im Vergleich zum K_D -Wert des unmodifizierten TNF erhöht. Damit war der blockierende Effekt der ADP-Ribosylierung auf die Bindung an TNFR2 deutlich stärker als auf die Bindung an

TNFR1. Bei der Interpretation der absoluten Zahlen muss jedoch berücksichtigt werden, dass zum einen die Stöchiometrie der beiden Interaktionspartner (TNF und TNFR) nicht klar ist, und zum anderen sich die ADP-ribosylierte Probe vermutlich aus verschiedenen Spezies unterschiedlich stark ADP-ribosylierter TNF-Moleküle zusammensetzt (s. Diskussion, Abschnitt 6.1.1)

Tabelle 5. 1 Assoziationsraten (k_a), Dissoziationsraten (k_d) und Dissoziationskonstanten (K_D) aus Abb. 5. 5 für die Bindung von unmodifiziertem bzw. ADP-ribosyliertem TNF an TNFR1 und TNFR2.

	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	K_D [M]
unmod TNF und TNFR1	$3,3 \cdot 10^5$	$6,6 \cdot 10^{-5}$	$2,0 \cdot 10^{-10}$
ADPr TNF und TNFR1	$1,1 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-9}$
unmod TNF und TNFR2	$8,8 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-9}$
ADPr TNF und TNFR2	$3,2 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^{-2}$	$5,5 \cdot 10^{-8}$

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Biacore Messungen, dass die ADP-Ribosylierung von TNF die Bindung zu beiden TNF-Rezeptoren deutlich beeinflusste, der Effekt auf den TNFR2 war dabei stärker als auf den TNFR1. Weitere Experimente, die den Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF differenziert für den TNFR1 und den TNFR2 untersuchen, werden in Abschnitt 5.1.6 beschrieben.

5.1.3 Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf den TNF-vermittelten Zelltod

TNF kann durch die Bindung an seine Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 eine Vielzahl unterschiedlicher Effekte auf verschiedenen Zielzellen auslösen. Eine der ersten entdeckten Wirkungen von TNF war das Auslösen des Zelltodes in Tumorzellen [2]. Da im vorherigen Abschnitt die Bindung von TNF an die Oberfläche von KIT225-Zellen gezeigt werden konnte, wurde diese Zelllinie verwendet, um den TNF-induzierten Zelltod und den möglichen Einfluss der ADP-Ribosylierung auf diesen Effekt zu untersuchen.

Bei der humanen T-Lymphomzelllinie KIT225 handelt es sich um eine IL-2-abhängige Zelllinie [148]. Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass TNF einen stärkeren induzierenden Effekt auf den Zelltod unter Abwesenheit von IL-2 hat. Daher wurden alle Experimente bezüglich des Zelltods in IL-2-freiem Medium durchgeführt.

Zunächst wurde die Abhängigkeit des Zelltods von der Konzentration des unmodifizierten TNFs festgestellt. KIT225-Zellen wurden mit IL-2-freiem Medium gewaschen und mit unterschiedlichen Konzentrationen von rekombinantem TNF für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Um die Zahl toter Zellen zu bestimmen wurde den Proben am folgenden Tag Propidiumiodid (PI) zugesetzt. Propidiumiodid dringt unspezifisch in Zellen ein, wird aber nur von vitalen Zellen aktiv wieder nach

außen transportiert. Zellen die sich mit PI anfärben lassen können somit als tote Zellen definiert werden. Die Zellen wurden nach 10minütiger Inkubation durchflusszytometrisch gemessen, die Ergebnisse sind in Abb. 5. 6 zu sehen.

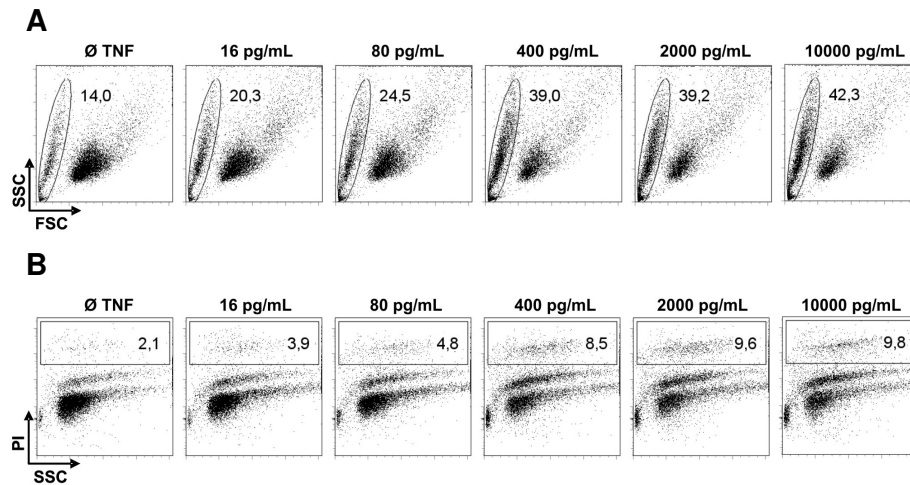


Abb. 5. 6 TNF-induzierter Zelltod von KIT225-Zellen: 10^6 KIT225-Zellen/mL (96 well) wurden in RPMI-Komplettmedium (Ø IL-2) mit verschiedenen Konzentrationen TNF (0; 16; 80; 400; 2.000 und 10.000 pg/mL) 24 h bei 37 °C unter 5 %iger CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, 0,2 µg/mL Propidiumiodid (PI) wurde zugesetzt, und die Zellen wurden im FACS vermessen. Die Abbildung zeigt in Form von *Dotblots* zwei unterschiedliche Arten, den TNF-induzierten Zelltod zu analysieren: **A**) Tote Zellen und Zelltrümmer wurden aufgrund ihrer SSC/FSC-Eigenschaften identifiziert, **B**) anhand der MFI-Werte wurde auf PI-positive Zellen (tote Zellen) *gated*. Die Zahlen geben die Anzahl der Zellen innerhalb eines *Gates* in % wieder.

Die Abb. 5. 6 zeigt zwei unterschiedliche Möglichkeiten, den TNF-induzierten Tod der KIT225-Zellen darzustellen. In der Reihe A wurden die toten und lebenden Zellen anhand ihrer *Scatter*-Eigenschaften definiert. Es ist zu erkennen, dass sich die Zellen mit zunehmenden TNF-Konzentrationen besonders bezüglich ihrer Größe (*Forward Scatter*), aber auch in ihrer Granularität (*Side Scatter*) verändern. Die abnehmende Zellgröße ist auf die Zunahme von toten Zellen und von Zelltrümmern zurückzuführen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zahl toter Zellen abhängig von der TNF-Konzentration zunimmt. Die Zahl der Zellen, die sich in der markierten Region, die die toten Zellen und die Zelltrümmer definiert, steigt von 14 % ohne TNF-Gabe auf über 40 % in dem letzten Ansatz, der mit 10.000 pg/mL TNF inkubiert wurde, an.

In der Reihe B wurden dieselben Zellen analysiert wie in Reihe A, nur wurde die PI-Fluoreszenz gegen den SSC-Wert aufgetragen, und ein *Gate* auf die PI-positiven Zellen gesetzt. Auch mit dieser Form der Auswertung ist klar zu erkennen, dass der Zelltod in KIT225-Zellen durch TNF ausgelöst werden kann, und dass dieser abhängig von der TNF-Konzentration ansteigt. Die Zahl PI-positiver Zellen steigt von ca. 2 % im Kontrollansatz ohne TNF auf beinahe 10 % nach Gabe der höchsten TNF-Konzentration von 10.000 pg/mL TNF an. Das hier gesetzte *Gate* beinhaltet nur die stark PI-positiven Zellen, Zelltrümmer, die PI-negativ sind, wurden nicht analysiert. Dies erklärt auch den großen Unterschied in den Prozentzahlen beider *Gating*-

Strategien (14 % tote Zellen in A und 2 % in B für den Kontrollansatz ohne TNF-Gabe).

Unabhängig von den unterschiedlichen Prozentzahlen zeigen beide Methoden dieselbe Tendenz bezüglich des dosisabhängigen TNF-vermittelten Zelltods an. In allen folgenden Versuchen, die den TNF-vermittelten Zelltod behandeln, wurde die *Gating*-Strategie von Abb. 5. 6 B, die tote Zellen über die Aufnahme von PI definiert, gewählt. Als nächstes wurde der Einfluss, den die ADP-Ribosylierung von TNF auf die Auslösung des Zelltods in KIT225-Zellen hat, untersucht. Dazu wurden KIT225-Zellen wie zuvor mit TNF 24 h bei 37 °C in IL-2-freiem Medium inkubiert. Prä-ADP-ribosyliertes und unmodifiziertes TNF wurde in einer Konzentration von 1 ng/mL eingesetzt. Die unterschiedlich stark prä-ADP-ribosylierten TNF-Proben wurden wie unter Abschnitt 4.4.3 beschrieben durch Inkubation von rekombinantem TNF mit ART1 und verschiedenen NAD-Konzentrationen hergestellt.

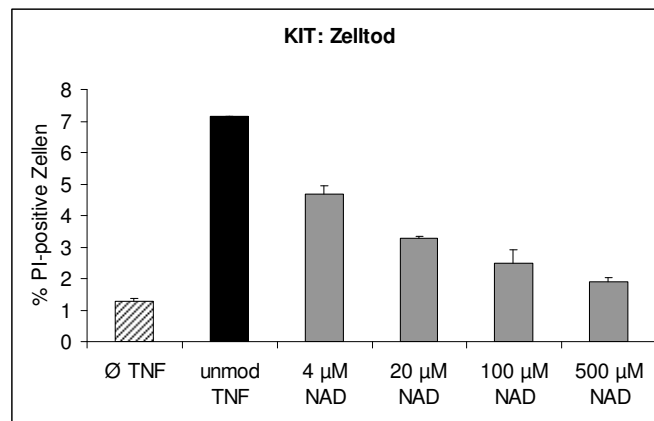


Abb. 5. 7 Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf den TNF-induzierten Zelltod von KIT225-Zellen: 10^6 KIT225-Zellen/mL (96 well) wurden in RPMI-Komplettmedium (Ø IL-2) mit 1 ng/mL unterschiedlich stark prä-ADP-ribosyliertem TNF (25 µg/mL rTNF, 1 µg/mL ART1 und 4; 20; 100 oder 500 µM NAD, üN, 4 °C) oder mit unmodifiziertem TNF (selber Ansatz, ohne NAD) oder ohne TNF (PBS) 24 h bei 37 °C unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, 0,2 µg/mL PI wurde zugesetzt und die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Das Balkendiagramm zeigt den Anteil PI-positiver Zellen (s. Abb. 5. 6 B). Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Der Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf den TNF-vermittelten Zelltod ist in Abb. 5. 7 dargestellt. Unmodifiziertes TNF (schwarzer Balken) führte zu einem Anstieg von ca. 1 % in dem Ansatz ohne TNF-Gabe (gestreifter Balken) auf ungefähr 7 % PI-positiver Zellen. Die grauen Balken zeigen die unterschiedlich stark ADP-ribosylierten TNF-Proben. Es ist zu erkennen, dass, je stärker das TNF ADP-ribosyliert wurde, desto weniger Zellen positiv für Propidiumiodid sind. Der TNF-Ansatz, der mit 500 µM NAD ADP-ribosyliert wurde zeigte noch gerade 2 % PI-positive Zellen, was nur geringfügig über dem Kontrollwert ohne TNF entspricht (1 % PI-positive Zellen). Bereits der Ansatz, der mit nur 4 µM NAD ADP-ribosyliert wurde, zeigte eine deutliche Reduktion des TNF-induzierten Zelltods gegenüber dem unmodifizierten TNF (weniger als 5 % gegenüber 7 % PI-positiver Zellen). Die ADP-Ribosylierung von TNF besitzt demnach

einen protektiven Effekt gegenüber TNF auf die KIT225 Zellen, der mit steigendem ADP-Ribosylierungsgrad des TNFs zunimmt.

5.1.4 Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die Aktivierung humaner peripherer Blutleukozyten (PBLs)

Neben seiner zytotoxischen Wirkung bewirkt TNF eine Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Unter anderem bewirkt TNF auf diesen Zellen die Abspaltung von CD62L (L-Selektin) von der Zelloberfläche (*CD62L-Shedding*), die Heraufregulation der Oberflächenexpression von CD11b (alpha-Kette des $\alpha M/\beta 2$ Integrins, Mac-1) bei Granulozyten und Monozyten, sowie eine Veränderung der Morphologie.

Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die Expression von CD62L auf Granulozyten

Zunächst wurden humane periphere Blutleukozyten (PBLs) auf ihre TNFR-Oberflächenexpression untersucht. Dazu wurde Vollblut ohne vorherige Separation der einzelnen Subpopulationen (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) mit den bereits für die Untersuchung der TNFR-Expression auf KIT225-Zellen eingesetzten Antikörpern für TNFR1 und TNFR2 (Abschnitt 5.1.2) inkubiert. Nach erfolgter Erythrozyten-Lyse wurden die Gesamt-PBLs mit entsprechenden PE-konjugierten Sekundär-Antikörpern angefärbt. Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten können durch ihre unterschiedlichen *Scatter*-Eigenschaften (*Dotplot*, Abb. 5. 8) getrennt voneinander analysiert werden. Die in Abb. 5. 8 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich der TNFR1 (oberes *Panel*) weder auf Granulozyten noch auf Lymphozyten nachweisen lässt, während er von Monozyten sehr schwach exprimiert wird. Der TNFR2 (unteres *Panel*) konnte hingegen auf allen drei Leukozytenpopulationen deutlich nachgewiesen werden, wobei die Expression auf Monozyten am stärksten und auf Lymphozyten am schwächsten war.

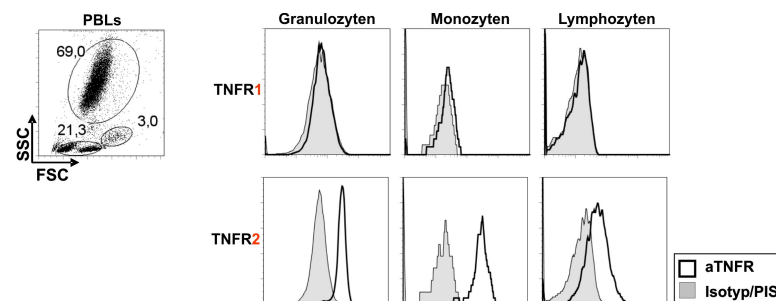


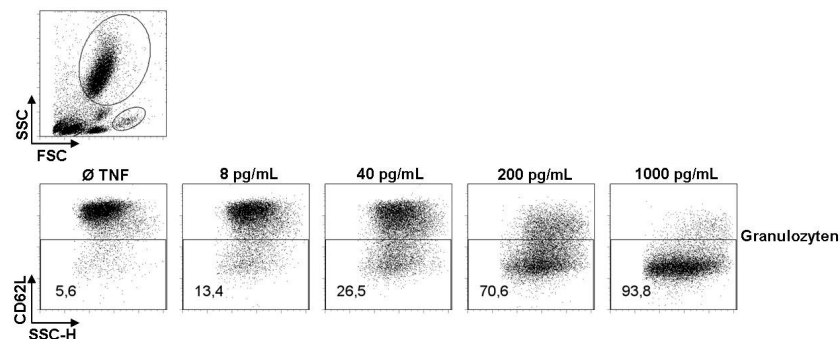
Abb. 5. 8 Oberflächenexpression von TNFR1 und TNFR2 auf humanen PBLs: Je 100 μ L humanes Vollblut wurden mit einem monoklonalem Maus-anti-TNFR1-Ak (1:100) oder einem polyklonalem Kaninchen-anti-TNFR2-Serum (1:200) für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Erythrozyten wurden unter gleichzeitiger Fixierung der Proben lysiert (Fix/Lyse Puffer von BD). Nach Waschen wurden die Zellen mit einem entsprechenden PE-konjugierten Sekundär-Antikörper (1:100) angefärbt und im FACS analysiert. Anhand der *Scatter*-Eigenschaften wurden die PBL-Subpopulationen voneinander unterschieden und getrennt voneinander analysiert. Die Histogramme zeigen die mittleren Fluoreszenzintensitäten von Granulozyten,

Monozyten und Lymphozyten für den TNFR1 und den TNFR2 (schwarze Linien). Isotyp-Antikörper bzw. Prä-Immunsereum (grau-gefüllt) wurden als Ak-Spezifitätskontrolle eingesetzt.

Trotz der starken Expression von TNFR2 konnte keine (Granulozyten und Lymphozyten) oder nur eine sehr geringe (Monozyten) Oberflächenbindung von TNF auf den humanen PBLs detektiert werden (nicht gezeigt).

Dennoch konnte eine Wirkung des TNF auf die Aktivierung von Granulozyten und Monozyten gezeigt werden. Da die Aktivierung von Granulozyten durch TNF besonders deutlich war und die TNF-induzierte Aktivierung von Granulozyten für verschiedene humanpathologische Effekte relevant ist, wurden für die folgenden Experimenten nur die Ergebnisse der Granulozyten gezeigt.

A



B

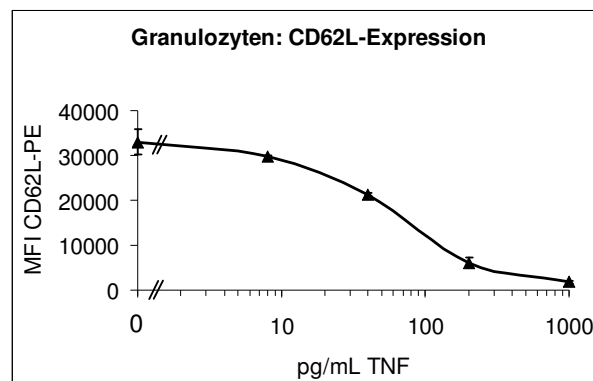


Abb. 5. 9 TNF-induzierte Abnahme der CD62L-Oberflächenexpression auf Granulozyten:

Je 100 μ L humanes Vollblut wurden mit verschiedenen TNF-Konzentrationen (0; 8; 40; 200; und 1000 pg/mL) für 1 h bei 37 °C unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert und mit einem monoklonalem, PE-konjugiertem Maus-anti-CD62L-Ak (1:5) für 30 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Erythrozyten unter gleichzeitiger Fixierung der Proben lysiert (Fix/Lyse Puffer von BD). Nach Waschen wurden die Zellen im FACS analysiert. Anhand der *Scatter*-Eigenschaften (*Dotplot* A) wurden die PBL-Subpopulationen unterschieden und getrennt voneinander analysiert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. **A)** Die *Dotblots* zeigen die MFI-Werte einer Einzelmessung von Granulozyten für CD62L gegen den *Side-Scatter* aufgetragen. Die Zahlen geben die % CD62L-negativer Zellen wieder. **B)** Diagramm-Darstellung der MFI-Werte von CD62L von Granulozyten gegen die TNF-Konzentration (pg/mL) in logarithmischer Skalierung aufgetragen.

Abb. 5. 9 zeigt die TNF-induzierte Abspaltung von CD62L von der Zelloberfläche von Granulozyten. Frisch entnommenes humanes Vollblut wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen TNF für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend mit einem PE-konjugierten anti-CD62L-Antikörper angefärbt. Die PBLs wurden nach Lyse der Erythrozyten im FACS gemessen. Granulozyten wurden anhand ihrer *Scatter*-Eigenschaften getrennt von den restlichen PBLs analysiert. In Abb. 5. 9 A ist zu erkennen, dass die meisten Granulozyten im Kontrollansatz ohne TNF-Inkubation stark positiv für CD62L waren. Nur ca. 6 % der Granulozyten wiesen eine niedrige CD62L-Expression auf. Die Behandlung mit TNF bewirkte eine Abnahme der CD62L-Fluoreszenz. Die Inkubation mit 8 pg/mL rekombinanten TNF führte bereits zu einer Zunahme auf ca. 13 % CD62L-negativer Zellen. Bei der höchsten eingesetzten TNF-Konzentration von 1000 pg/mL hatten fast alle Granulozyten (ca. 94 %) ihr Zelloberflächen-CD62L verloren. Abb. 5. 9 B zeigt das beschriebene Ergebnis in Form eines Diagramms, in dem die MFI-Werte in Abhängigkeit von der TNF-Konzentration logarithmisch dargestellt sind. Die Konzentration der halbmaximalen Wirkung auf die CD62L-Abnahme lag bei ca. 60 pg/mL TNF.

In einem folgenden Versuch wurde überprüft, ob die ADP-Ribosylierung von TNF einen Einfluss auf das TNF-vermittelte *Shedding* von CD62L hat. Der Versuchsaufbau war wie oben beschrieben. Humanes Vollblut wurde mit unterschiedlich stark prä-ADP-ribosyliertem TNF für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, und für CD62L angefärbt. Für die TNF-Inkubation wurde eine Konzentration von 333 pg/mL gewählt, die im beginnenden Sättigungsbereich für diesen Effekt liegt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5. 10 dargestellt.

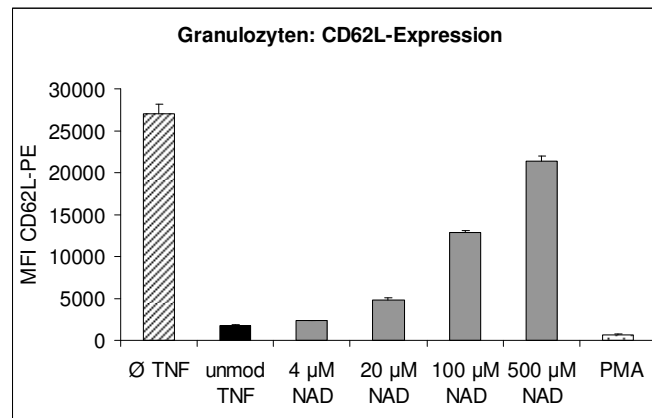


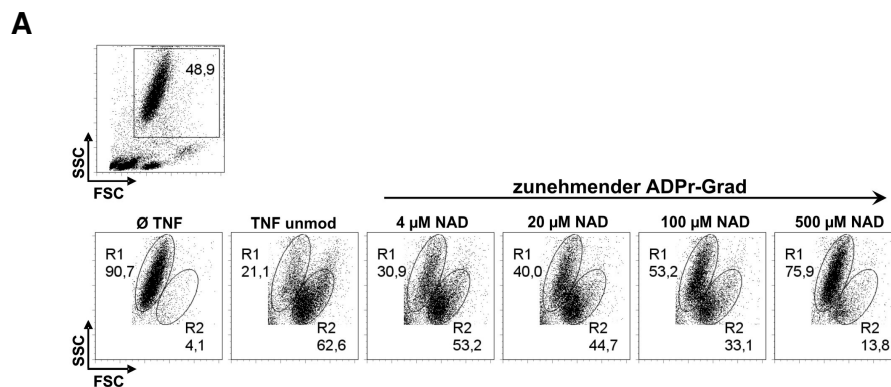
Abb. 5. 10 Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die TNF-induzierte Abnahme der CD62L-Oberflächenexpression auf Granulozyten: Je 100 µL humanes Vollblut wurden mit 333 pg/mL unterschiedlich stark prä-ADP-ribosyliertem TNF (25 µg/mL rhTNF, 1 µg/mL ART1 und 4; 20; 100 oder 500 µM NAD, üN, 4 °C) oder mit unmodifiziertem TNF (selber Ansatz, ohne NAD) oder ohne TNF (PBS) 1 h bei 37 °C unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Der Phorboldeste PMA (100 ng/mL) wurde als Aktivierungskontrolle eingesetzt. Anschließend wurden die Proben mit einem monoklonalen, PE-konjugierten Maus-anti-CD62L-Ak (1:5) für 30 min bei 4 °C gefärbt. Die Erythrozyten wurden unter gleichzeitiger Fixierung der Proben lysiert (Fix/Lyse Puffer von BD), und nach Waschen mit PBS wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die PBL-Subpopulationen wurden anhand ihrer *Scatter*-Eigenschaften (s. Abb. 5. 9) voneinander unterschieden und getrennt analysiert. Die Balken-

diagramme zeigen die MFI-Werte für die CD62L-Anfärbung von Granulozyten. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

In diesem Versuch wurde als Positivkontrolle für die Vollständigkeit der CD62L-Abspaltung Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) eingesetzt. PMA aktiviert direkt die Proteinkinase C (PKC), welche die TACE aktiviert und damit das *Shedding* von CD62L von der Zelloberfläche bewirkt (Abb. 5. 10, gepunkteter Balken). Die Inkubation mit 333 pg/mL TNF (schwarzer Balken) führte zu einer fast vollständigen Abspaltung von CD62L von der Oberfläche von Granulozyten. Der Einsatz der prä-ADP-ribosylierten TNF-Proben zeigte, dass auch die Aktivierung von Granulozyten durch die ADP-Ribosylierung von TNF beeinflusst wird (graue Balken). Mit steigender NAD-Konzentration und damit zunehmendem ADP-Ribosylierungsgrad des TNF wurde die Induktion des CD62L-*Sheddings* zunehmend gehemmt. Dabei zeigte sich ein Effekt der ADP-Ribosylierung erst bei NAD-Konzentrationen um 20 μ M. Selbst die mit 500 μ M NAD in diesem Versuch maximal prä-ADP-ribosylierte TNF-Probe konnte das TNF-induzierte CD62L-*Shedding* nicht vollständig unterdrücken

Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die TNF-induzierte Änderung der Granulozyten-Morphologie

Neben der Abspaltung von CD62L bewirkt TNF auch eine Veränderung der Morphologie von Granulozyten, die sich aufgrund von Veränderungen in den *Side-* und *Forward-Scatter*-Eigenschaften durchflusszytometrisch bestimmen lässt [149].



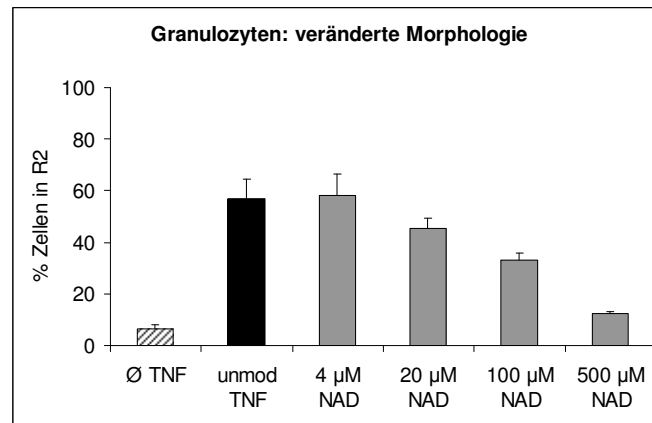
B

Abb. 5. 11 Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die TNF-induzierte Änderung der Granulozyten-Morphologie: Die in Abb. 5. 10 dargestellten Granulozyten wurden anhand ihrer *Scatter*-Eigenschaften analysiert. **A)** *Dotblot*-Darstellung eines Einzelexperiments. Die Region R1 beinhaltet Granulozyten mit normaler Morphologie, die Region R2 zeigt Granulozyten mit veränderter Morphologie. Die Zahlen unterhalb der Regionen-Beschriftung geben den prozentualen Anteil der Zellen in der jeweiligen Region wieder. **B)** Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil der Granulozyten mit veränderter Morphologie (R2). Es werden die Mittelwerte von Doppelbestimmungen dargestellt.

In Abb. 5. 11 A zeigt der obere *Dotblot* die *Scatter*-Eigenschaften aller PBLs. Es wurde eine großzügige Region um die Granulozyten-Population definiert, um die Granulozyten allein, aber unter gleichzeitiger Berücksichtigung der starken Änderung ihrer *Scatter*-Eigenschaften analysieren zu können. Die untere Reihe stellt die *Scatter*-Eigenschaften der Granulozyten innerhalb der gesetzten Region dar. Nach Inkubation mit TNF war eine starke Veränderung in der Morphologie der Granulozyten im Vergleich zu den unstimulierten Granulozyten zu erkennen. Die Granulozyten wurden größer (anhand des *Forward-Scatters* ablesbar) und verloren gleichzeitig ihre hohe Granularität (definiert durch den *Side-Scatter*). Zwei weitere Regionen wurden innerhalb der Granulozyten-Population definiert, um die Granulozyten mit normaler (R1) und mit veränderter (R2) Morphologie zu erfassen. Die Zahlen unterhalb der Regionen-Bezeichnung geben den prozentualen Anteil der Zellen innerhalb der jeweiligen Region an, bezogen auf die Gesamtzahl der Granulozyten. Ohne TNF-Inkubation befanden sich 91 % der Granulozyten in R1 und nur 4 % in R2. Nach Inkubation mit unmodifiziertem TNF dagegen befanden sich nur noch 21 % in R1 und mehr als 60 % in R2. Wurde mit prä-ADP-ribosyliertem TNF inkubiert, so zeigte sich, dass die durch TNF induzierte Formveränderung der Granulozyten mit zunehmendem ADP-Ribosylierungsgrad von TNF sukzessiv abnahm. Bei der am stärksten ADP-ribosylierten TNF-Probe (500 µM NAD) war die Formveränderung weitgehend unterdrückt (nur 14 % der Zellen in R2), erreichte aber nicht ganz den Wert der unstimulierten Granulozyten (4 % der Zelle in R2). Abb. 5. 11 B fasst die Ergebnisse in einem Balkendiagramm zusammen. Insgesamt besitzt die ADP-Ribosylierung von TNF also, wie bei anderen durch TNF vermittelten Effekten auch, einen hemmenden Einfluss auf die TNF-induzierte Änderung der Granulozytengestalt, der jedoch auch bei dem

höchsten erzielten ADP-Ribosylierungsgrad die Wirkung von TNF abschwächen, aber nicht völlig unterdrücken kann.

Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die TNF-induzierte Expressionszunahme von CD11b

Als letzter untersuchter Parameter, um den Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf seine Wirkung auf Granulozyten zu untersuchen, wurde die Oberflächenexpression von CD11b gewählt, das nach Aktivierung auf Granulozyten verstärkt exprimiert wird [150]. Dazu wurde humanes Vollblut mit rekombinantem, unmodifiziertem oder prä-ADP-ribosyliertem (1 mM NAD) TNF inkubiert, und für CD11b angefärbt.

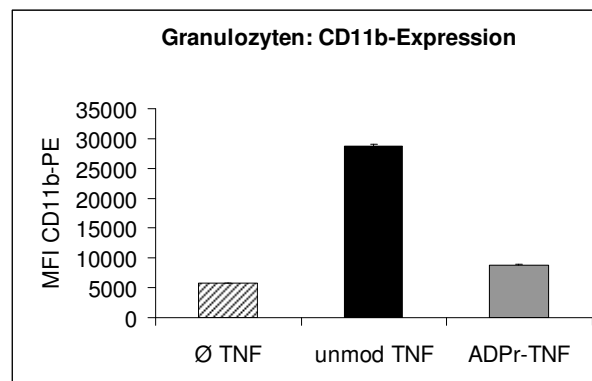


Abb. 5. 12 Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die TNF-induzierte Zunahme der CD11b-Oberflächenexpression auf Granulozyten: Je 100 µL humanes Vollblut wurden mit 200 pg/mL TNF, entweder unmodifiziert (schwarzer Balken) oder prä-ADP-ribosyliert (25 µg/mL rhTNF, 1 µg/mL ART1 und 1 mM NAD, üN, 4 °C; grauer Balken) bzw. ohne TNF (PBS; gestreifter Balken) 1 h bei 37 °C unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit einem monoklonalen, PE-konjugierten Maus-anti-CD11b-Ak (1:100) gefärbt. Die Erythrozyten wurden unter gleichzeitiger Fixierung der Proben lysiert (Fix/Lyse Puffer von BD) und nach Waschen mit PBS wurden die PBLs im FACS analysiert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die PBL-Subpopulationen wurden anhand ihrer *Scatter*-Eigenschaften voneinander unterschieden und getrennt analysiert. Die Balkendiagramme zeigen die MFI-Werte für CD11b von Granulozyten für die einzelnen TNF-Ansätze.

Humane Granulozyten weisen unter Ruhebedingungen eine niedrige Expression von CD11b auf ihrer Zelloberfläche auf (gestreifter Balken; Abb. 5. 12). Nach Stimulation mit rekombinantem TNF wurde eine deutliche Zunahme (ca. um das fünffache) der CD11b-Oberflächenexpression auf den Granulozyten beobachtet (schwarzer Balken). Durch ADP-Ribosylierung von TNF wurde die Heraufregulation von CD11b deutlich gehemmt (grauer Balken).

Somit weisen alle untersuchten Aktivierungsparameter (CD62L-*Shedding*, Formveränderung von Granulozyten, Hochregulation von CD11b) dieselbe Tendenz auf und führen zu dem Schluss, dass die TNF-induzierte Aktivierung humaner Granulozyten durch die ART1-katalysierte ADP-Ribosylierung von TNF, abhängig vom Grad der Modifikation blockiert wird.

5.1.5 Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade

TNF löst viele seiner Effekte über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B aus. NF- κ B ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der von großer Bedeutung für eine Vielzahl von Zellprozessen, wie beispielsweise für die Regulation von Zellproliferation, Zelltod und Immunantworten ist. Die Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade durch verschiedene (meist extrazelluläre) Signalmoleküle (Wachstumsfaktoren, virale/bakterielle Antigene und Zytokine) führt zur Translokation des normalerweise im Zytosol lokalisierten NF- κ Bs in den Zellkern, wo es die Transkription unterschiedlicher Gene aktiviert. Im unstimulierten Zustand wird das im Zytosol befindliche NF- κ B durch Bindung von inhibitorischen I κ B-Proteinen (I κ B) an der Translokation in den Zellkern gehindert. Nach Stimulation der Zelle wird eine I κ B-Kinase (IKK) aktiviert, die zwei spezifische Serin-Reste in der regulatorischen Domäne von I κ B phosphoryliert (S32/S36), was zur sofortigen Freisetzung des NF- κ B und zu einer anschließenden Ubiquitinierung des I κ B mit darauf folgendem Abbau im Proteasom führt (s. Abschnitt 2.1.4).

Um den Effekt der ADP-Ribosylierung von TNF auf molekularer Ebene zu verfolgen, wurde die TNF-induzierte Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade untersucht. Diese Aktivierung kann durch Nachweis der Phosphorylierung des I κ B und gleichzeitig durch Nachweis der zunehmenden I κ B-Degradation mithilfe von Antikörpern beobachtet werden, die das phosphorylierte bzw. das Gesamt-I κ B jeweils spezifisch erkennen. Dazu wurden KIT225-Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen (5, 1 und 0,2 ng/mL) von prä-ADP-ribosyliertem (Reaktion mit 500 μ M NAD und ART1) bzw. unmodifiziertem TNF für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und lysiert. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurde phosphoryliertes I κ B und das Gesamt-I κ B-Protein im Western-Blot nachgewiesen.

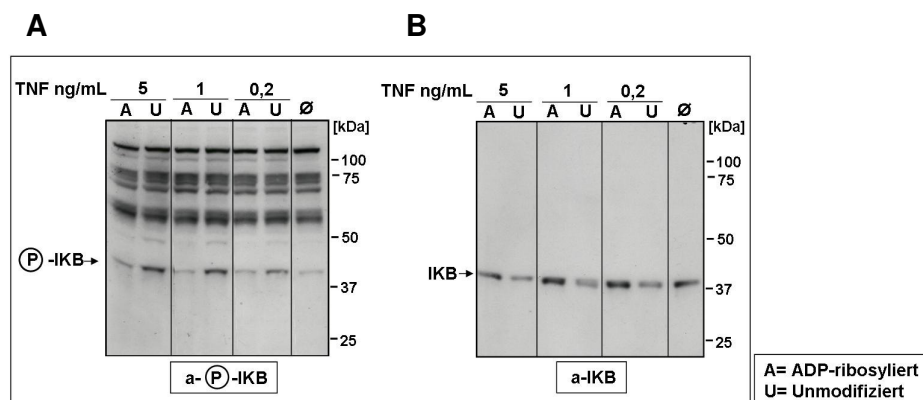


Abb. 5. 13 Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die TNF-induzierte Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade: $2 \cdot 10^6$ KIT225-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von ADP-ribosyliertem (A) oder unmodifiziertem (U) TNF bzw. ohne TNF (Ø; PBS) für 60 min bei 37 °C unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. ADP-ribosyliertes TNF wurde durch γ N Inkubation von 25 μ g/mL rekombinantem hTNF (in 0,1 % BSA in PBS) mit 1 μ g/mL ART1 und 500 μ M NAD bei 4 °C erhalten. Die Zellen wurden gewaschen und mit 100 μ L Lysepuffer (1 % NP-40, 1 mM Na₃VO₄, 1mM AEBSF in PBS +/-) für 15 min bei 4 °C lysiert. Es folgten SDS-

PAGE, Western-Blot und Immunodetektion mit **A**) Maus-anti-Human-P-IkB-mAk (1:1000) und Schaf-anti-Maus-IgG-HRP (1:2500) bzw. **B**) Kaninchen-anti-human-IkB-mAk (1:1000) und Esel-anti-Kaninchen-IgG-HRP (1:2500). Zur Detektion wurde das ECL-System (Amersham) verwendet. Je Spur wurden 25 µL GZL aufgetragen, als Proteingrößenstandard (4 µL) wurde der Kaleidoscope™ Precision Plus Protein Standard (BioRAD) verwendet.

Der Western-Blot in Abb. 5. 13 A zeigt die Ergebnisse zur TNF-induzierten Phosphorylierung von IkB (P-IkB). Alle Spuren zeigen, neben einer Vielzahl unspezifischer Banden im oberen Molekulargewichtsbereich (> 50 kDa), eine deutlich abgesetzte Bande bei ca. 40 kDa, was dem apparenten Molekulargewicht von IkB entspricht (38 kDa). Die Intensitäten der phospho-IkB-Banden unterscheiden sich jedoch deutlich voneinander. Während die phospho-IkB-Bande des Kontrollansatzes (Ø) eine nur sehr geringe Intensität aufweist (Basis-Phosphorylierung von IkB), zeigen die Banden der mit unmodifiziertem TNF (U) inkubierten Ansätze sehr viel höhere Intensitäten auf. Die Banden der Ansätze mit 1 oder 5 ng/mL unmodifiziertem TNF zeigen die gleiche Intensität, und sind etwas stärker als die des Ansatzes mit 0,2 ng/mL TNF. Die Banden der Proben dagegen, die mit ADP-ribosyliertem TNF (A) inkubiert wurden, weisen für alle drei TNF Konzentrationen eine ähnliche Intensität auf, die kaum höher ist als die Bandenintensität des Kontrollansatzes, und damit nicht über dem Basisniveau der IkB-Phosphorylierung liegt.

Neben der Phosphorylierung wurde auch die durch TNF induzierte Degradation von IkB untersucht (Western-Blot der Abb. 5. 13 B). Die Aktivierung der NF-κB-Signalkaskade korreliert in diesem Fall mit einer Abnahme der Bandenintensität. Alle Spuren weisen jeweils eine einzige Bande bei ca. 38 kDa auf, die dem apparenten Molekulargewicht von IkB entspricht. Die Intensität der Bande im Kontrollansatz (Ø) zeigt eine vergleichsweise hohe IkB-Expression. Im Vergleich dazu sind die Bandenintensitäten in den Ansätzen mit unmodifiziertem TNF (U) deutlich reduziert (man beachte die trotz niedrigerer IkB-Expression erhöhten phospho-IkB-Signale). Die Bandenintensitäten in den Ansätzen mit ADP-ribosyliertem TNF (A) dagegen sind wieder vergleichbar mit derjenigen des Kontrollansatzes.

Insgesamt zeigen die Western-Blot-Analysen zur TNF-induzierten Phosphorylierung und Degradation von IkB das gleiche Ergebnis: Die ADP-Ribosylierung von TNF hemmt die TNF-induzierte Aktivierung der NF-κB-Signalkaskade.

Bisher kann zusammenfassend festgehalten werden, dass sowohl membranständiges als auch prozessiertes TNF durch humane ART1, in zellständiger oder in löslicher Form, ADP-ribosyliert werden kann (Abschnitt 5.1.1). Die Einbringung der relativ großen und negativ geladenen ADP-Ribosegruppe(n) in das TNF-Molekül infolge der Modifikation hat einen deutlich blockierenden Einfluss auf seine Funktion. So wurde gezeigt, dass die Bindungsfähigkeit von TNF an seine Rezeptoren auf Zelloberflächen (KIT225) und an Matrix-gekoppelte Rezeptoren (Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie) stark von der Modifikation beeinträchtigt wird (Abschnitt 5.1.2). Die Wirkung von ADP-ribosyliertem TNF auf Zielzellen, wie der TNF-induzierte Zelltod von humanen

KIT225-Zellen und die TNF-vermittelte Aktivierung von humanen Granulozyten gezeigt haben, ist gegenüber der Wirkung des unmodifizierten TNF deutlich reduziert. Die blockierenden Einflüsse der ADP-Ribosylierung von TNF auf seine Funktion nehmen dabei sukzessiv mit dem Grad der ADP-Ribosylierung zu (Abschnitte 5.1.3 und 5.1.4). Außerdem konnte der hemmende Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auch auf molekularer Ebene bestätigt werden, wie die Versuche der TNF-induzierten Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade gezeigt haben (Abschnitt 5.1.5). Unklar bleibt, ob die Modifikation die Bindung an beide TNF-Rezeptoren gleichermaßen beeinträchtigt, oder ob die Interaktion mit einem der beiden Rezeptoren präferenziell betroffen ist.

5.1.6 Welcher TNF-Rezeptor wird durch die ADP-Ribosylierung von TNF beeinflusst?

Bisher wurde gezeigt, dass die ADP-Ribosylierung von TNF einen starken Einfluss auf seine Rezeptor-Bindung und Funktionalität besitzt. Im Folgenden soll untersucht werden, welcher der beiden TNF-Rezeptoren durch die ADP-Ribosylierung in seiner Signalübermittlung am stärksten beeinflusst wird. TNF übt vielfältige Wirkungen auf Zellen aus durch Interaktionen mit zwei Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2, wobei die einzelnen Wirkungen in der Regel jedoch nicht eindeutig der Signalübertragung durch einen bestimmten Rezeptor zugeordnet werden können. In den in diesem Abschnitt beschriebenen Experimenten wurden verschiedene Methoden angewendet, um den Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die Interaktion mit den beiden TNF-Rezeptoren getrennt betrachten zu können. Dabei wurden Zellen mit TNFR1- und TNFR2-Expressionskonstrukten transfiziert, rekombinante TNFR1- bzw. TNFR2-Fc-Fusionsproteine eingesetzt, sowie TNFR1- bzw. TNFR2-spezifische Antikörper verwendet.

TNF-Oberflächenbindung auf TNFR-transfizierten HEK293-Zellen

Um den Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die Zelloberflächenbindung einem der beiden TNF-Rezeptoren zuordnen zu können, wurden zunächst humane HEK293-Zellen, die endogen keinen der beiden TNF-Rezeptoren zu einem mit Antikörpern nachweisbaren Grad exprimieren, mit Expressionskonstrukten für TNFR1 oder TNFR2 transfiziert. Dazu wurden eukaryotische Expressionskonstrukte hergestellt, die nur für den extrazellulären, TNF-bindenden Teil von TNFR1 bzw. TNFR2 kodieren. Der relativ große zytoplasmatische Teil der Rezeptoren wurde deletiert und die Transmembrandomäne durch eine trunkierte Variante des PDGF-Rezeptors ersetzt (s. Abschnitt 3.7). Die Deletion der zytoplasmatischen Domäne der TNF-Rezeptoren, die für die TNF-Signalweiterleitung notwendig ist, sollte versichern, dass die Bindungsstudien nicht durch etwaige receptorspezifische Effekte gestört werden. Zum Vergleich wurde ein Konstrukt, das für das native Vollängen TNFR2-Protein kodiert, eingesetzt.

HEK293-Zellen wurden mit den beschriebenen TNFR-Expressionskonstrukten und mit einem Kontroll-Konstrukt transfiziert und am nächsten Tag geerntet. Parallel dazu wurden KIT225-Zellen, für die der blockierende Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die TNF-Oberflächenbindung gezeigt wurde (Abschnitt 5.1.2), untersucht. Die Zellen wurden mit unmodifiziertem oder prä-ADP-ribosyliertem TNF, welches durch Inkubation mit ART1 und unterschiedlichen Konzentrationen an NAD (27 μ M-1000 μ M NAD) erhalten wurde, zehn Minuten bei 4 °C inkubiert. Freies TNF wurde gewaschen und das zelloberflächengebundene TNF mit dem polyklonalen Ziegenanti-TNF-Serum im FACS nachgewiesen.

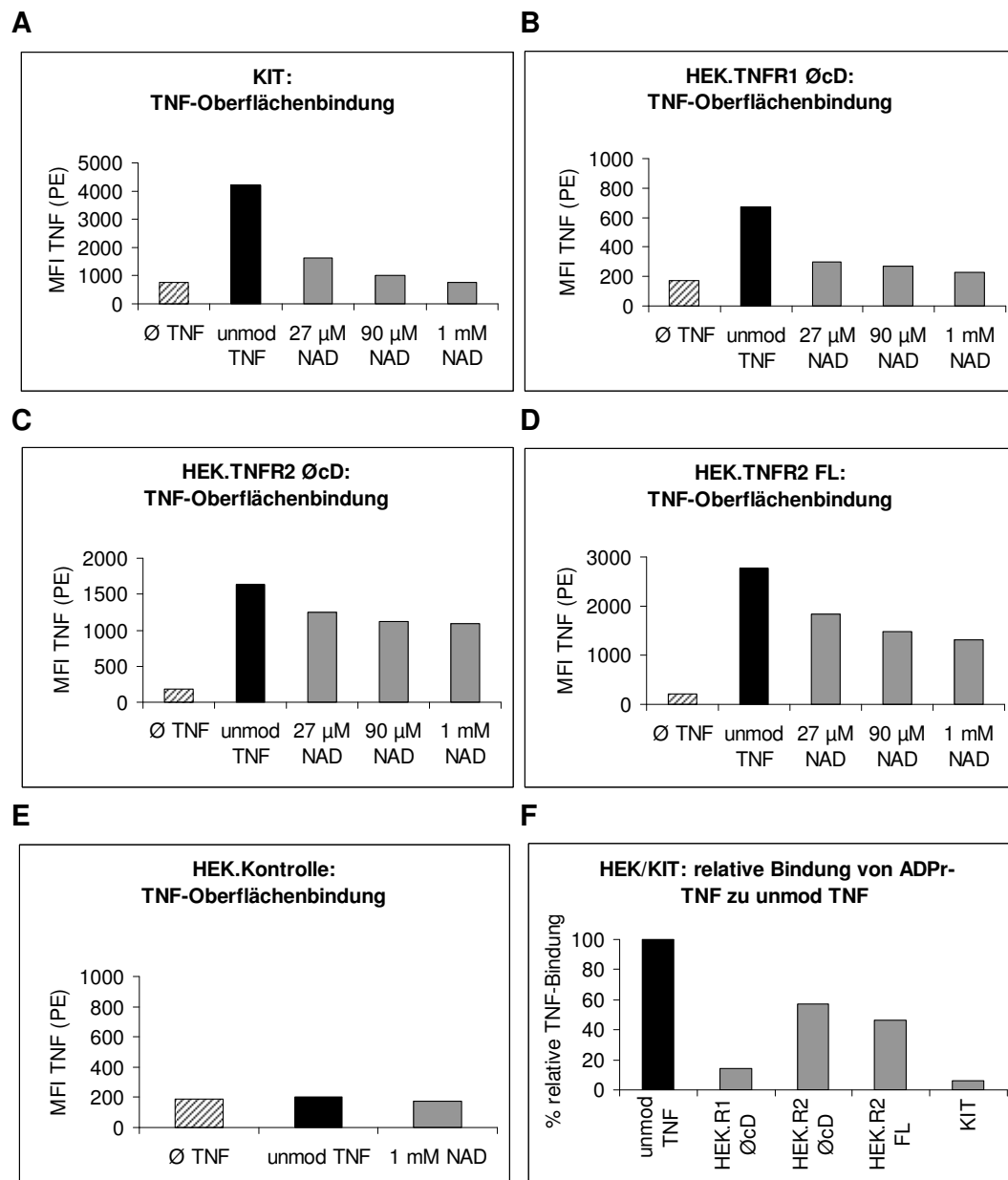


Abb. 5. 14 Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die Oberflächenbindung an TNFR-transfizierte HEK293-Zellen: HEK293-Zellen wurden mittels des JetPEI™ Transfektions-Systems mit verschiedenen TNF-Rezeptor-Expressionskonstrukten oder mit

einem Kontroll-Expressionskonstrukt (je 5 µg DNA) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. Je $5 \cdot 10^5$ HEK293-Zellen oder KIT225-Zellen wurden mit 10 ng/mL prä-ADP-ribosyliertem (25 µg/mL rhTNF, 1 µg/mL ART1 und 27; 90 und 1000 µM NAD, üN, 4 °C) oder unmodifiziertem TNF (selber Ansatz, ohne NAD) bzw. ohne TNF (PBS) für 10 min bei 4 °C inkubiert und gewaschen. Das oberflächengebundene TNF wurde mit einem Ziege-anti-hTNF-Serum und einem PE-konjugierten Esel-anti-Ziege-Ak detektiert. Die Analyse schließt tote Zellen aus. Die Balkendiagramme zeigen die MFI-Werte von TNF für **A)** KIT225-Zellen, **B)** HEK293-Zellen transfiziert mit TNFR1 ohne cytoplasmatische Domäne (TNFR1 ØcD), **C)** HEK293-Zellen transfiziert mit TNFR2 ohne cytoplasmatische Domäne (TNFR2 ØcD), **D)** HEK293-Zellen transfiziert mit nativem *full-length* TNFR2 (TNFR2 FL) und **E)** HEK293-Zellen transfiziert mit einem Kontroll-Konstrukt (hIL-15). Das Balkendiagramm **F)** zeigt die relative Bindung von mit 90 µM NAD ADP-ribosyliertem zu unmodifiziertem TNF für A-D. Die MFI-Werte für den unmodifizierten TNF-Ansatz wurden dabei jeweils für die einzelnen Zellarten auf 100 % gesetzt.

Abb. 5. 14 zeigt, dass die Oberflächenbindung von unmodifiziertem TNF auf allen HEK293.TNFR-Transfektanten (Diagramme B-D) nachzuweisen ist (schwarze Balken), was an dem Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensitäten gegenüber den Ansätzen ohne TNF-Inkubation (gestreifte Balken) abzulesen ist. Die HEK293-Zellen die mit einem Kontroll-Konstrukt transfiziert wurden (Diagramm E) wiesen keinen Anstieg in der Fluoreszenzintensität nach TNF-Inkubation auf. Für die mit dem TNFR1 transfizierten HEK293-Zellen war eine deutliche Abnahme der TNF-Bindung durch ADP-Ribosylierung des TNFs mit bereits 27 µM NAD zu erkennen, die durch steigenden ADP-Ribosylierungsgrad aber nicht weiter zunahm (Diagramm B, graue Balken). ADP-ribosyliertes TNF hat demnach eine reduzierte Affinität zum zellständigen TNFR1. Dabei ist anzumerken, dass sich für diese Zellen insgesamt nur sehr geringe MFI-Werte ergaben, was auf ein niedriges Expressionsniveau des TNFR1 hinweist. HEK293-Zellen die mit TNFR2 transfiziert wurden, zeigten höhere MFI-Werte (Diagramm C). Auffällig war jedoch die geringe Abnahme der Fluoreszenzintensitäten nach Behandlung der Zellen mit ADP-ribosyliertem TNF, auch bei hoher NAD-Konzentration (1 mM). Die KIT225-Zellen zeigten die bereits in Abb. 5. 4 dargestellte Abnahme der TNF-Oberflächenbindung mit zunehmendem ADP-Ribosylierungsgrad (Diagramm A), und dienten damit gleichzeitig als Kontrolle für die Qualität der ADP-Ribosylierungsansätze.

Dass der nur schwache Effekt der ADP-Ribosylierung auf die Bindung von TNF an HEK293.TNFR2-transfizierte Zellen durch die Deletion der zytoplasmatischen Domäne bedingt sein könnte, wurde durch den Vergleich mit HEK293-Zellen, die mit dem nativen Vollängen TNFR2-Konstrukt transfiziert waren, ausgeschlossen (Diagramm D).

Das Balkendiagramm F der Abb. 5. 14 gibt die relative Bindung des mit 90 µM NAD ADP-ribosylierten in Verhältnis zu unmodifiziertem TNF wieder, wobei der MFI-Wert des unmodifizierten TNF jeweils auf 100 % gesetzt wurde. Die beschriebenen Unterschiede in der Sensitivität gegenüber der ADP-Ribosylierung von TNF werden dadurch besonders anschaulich. Die Ergebnisse zeigen, dass die mit TNFR1 transfizierten HEK293-Zellen sowie die KIT225 Zellen eine besonders hohe Sensitivität gegenüber der Modifikation zeigen, während die mit TNFR2 transfizierten HEK293-

Zellen nur eine geringe Sensitivität aufweisen. Während die relative Bindung von ADP-ribosylierten TNF für KIT225-Zellen unter 10 % des Wertes für unmodifiziertes TNF liegt, werden bei den HEK293.TNFR2-Transfektanten durch ADP-ribosyliertes TNF noch über 50 % der Fluoreszenzintensitäten erreicht.

Dieser Befund ist insofern erstaunlich, als die Untersuchung der Expressionsdichte der beiden TNF-Rezeptoren auf KIT225 Zellen gezeigt hatte, dass auf diesen Zellen die Expression des TNFR2 sehr viel höher als die des TNFR1 ist (Abb. 5. 2). Darüber hinaus konnte in Versuchen, die im folgenden Abschnitt dargestellt werden, gezeigt werden, dass die Vorbehandlung der Zellen mit TNFR2-spezifischen Antikörpern die messbare Bindung von TNF fast vollständig unterdrückt (Abb. 5. 16). Es muss daher der Schluss gezogen werden, dass die in diesem Assay gemessene Bindung von TNF an KIT225-Zellen fasst ausschließlich auf Bindung an den TNFR2 zurückzuführen ist. Die Ergebnisse zeigen also, dass die Bindung von TNF zumindest an den TNFR2 unterschiedlich sensitiv gegenüber der ADP-Ribosylierung ist, je nachdem, in welchem zellulären Kontext sie stattfindet (z.B. auf einer HEK293-Zelle oder auf einer KIT225-Zelle).

Oberflächenbindung von rekombinanten TNFR1-Fc- und TNFR2-Fc-Fusionsproteinen an TNF und ART1 ko-transfizierte HEK293-Zellen

Als weitere Möglichkeit, den Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf seine Bindung an die Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 getrennt zu analysieren, wurden rekombinante TNFR1-Fc- und TNFR2-Fc-Fusionsproteine eingesetzt (TNFR fusioniert mit dem Fc-Teil des humanen IgG, R&D Systems). Dabei wurde eine im Vergleich zu den vorherigen Versuchen umgekehrte Strategie angewandt, indem hier die Bindung von zellständigem TNF durch lösliche TNF-Rezeptoren untersucht wurde. Durch Ko-Transfektion von Zellen mit TNF und ART1 kann, wie in Abb. 5. 1 B gezeigt, die ADP-Ribosylierung von zellständigem TNF erzielt werden. Die Bindung der löslichen TNFR-Fc-Fusionsproteine an zellgebundenes TNF kann durch Anfärbung mit Fluorochrom-markierten anti-human-IgG Antikörpern sichtbar gemacht werden.

HEK293-Zellen wurden mit TNF und ART1 ko-transfiziert, nach 24 Stunden geerntet, und mit 500 µM NAD oder ohne NAD für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurden HEK293-Zellen nur mit ART1 transfiziert und ebenso behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem TNFR1-Fc- bzw. TNFR2-Fc-Fusionsprotein inkubiert. Nicht gebundene TNFR-Fc-Proteine wurden gewaschen und zelloberflächengebundenes Fc-Fusionsprotein mit einem FITC-konjugierten anti-Human-IgG-Antikörper gefärbt. Die Ergebnisse der FACS-Analysen sind in Abb. 5. 15 zu sehen.

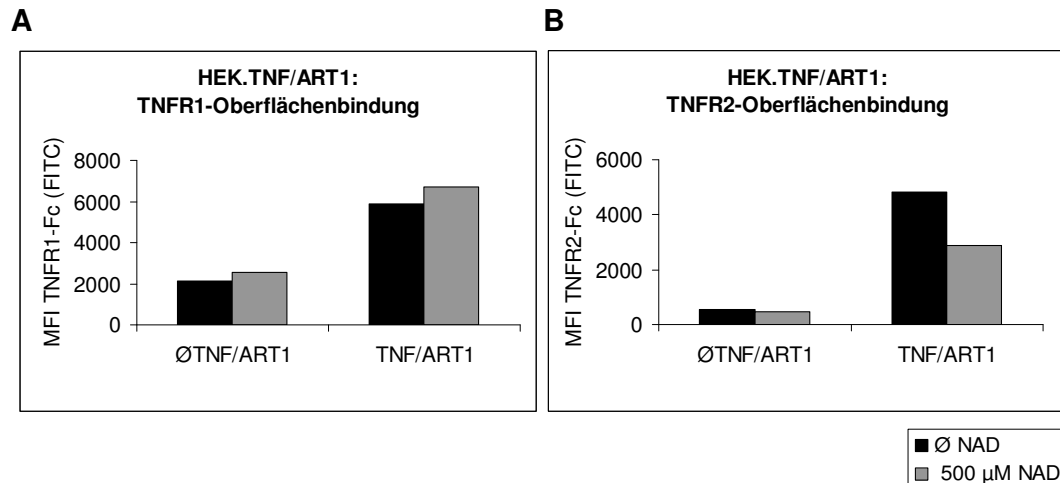


Abb. 5. 15 Einfluss der ADP-Ribosylierung von zellständigem TNF auf die Bindung von TNFR1-Fc- und TNFR2-Fc-Fusionsproteinen: HEK293-Zellen wurden mittels des JetPEI™ Transfektions-Systems mit TNF und ART1 ko-transfiziert (je 2,5 µg DNA) bzw. mit ART1 ohne TNF transfiziert (5 µg DNA). 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. Je 10⁶ HEK293-Zellen wurden mit 500 µM NAD (graue Balken) oder ohne NAD (schwarze Balken) für 30 min bei 37 °C inkubiert und gewaschen. Die Zellen wurden mit 2,5 µg/mL TNFR1-Fc- bzw. TNFR2-Fc-Fusionsprotein (rekombinanter TNF-Rezeptor mit humanem Fc-Teil fusioniert, R&D Systems) für 20 min bei 4 °C inkubiert, gewaschen und die oberflächengebundenen TNFR-Fc-Proteine mit einem FITC-konjugierten Esel-anti-Human-IgG-Ak detektiert. Die Balkendiagramme zeigen die MFI-Werte für **A**) das TNFR1-Fc-Fusionsprotein und **B**) das TNFR2-Fc-Fusionsprotein. Die Analysen schließen tote Zellen aus.

Die Ergebnisse zeigen, dass beide TNFR-Fc-Fusionsproteine an TNF-transfizierte, nicht aber an untransfizierte HEK293-Zellen binden (Abb. 5. 15, Diagramme A und B). Die vorherige ADP-Ribosylierung von TNF mit 500 µM NAD hat keinen Einfluss auf die Bindung des TNFR1-Fc-Fusionsproteins (Diagramm A). Im Gegensatz dazu wird die Bindung des TNFR2-Fc-Fusionproteins eindeutig durch die Oberflächen-ADP-Ribosylierung des TNF um ca. ein Drittel gesenkt (Diagramm B).

Insgesamt haben die Untersuchungen, die die Auswirkung der ADP-Ribosylierung von TNF auf die Bindung an die einzelnen Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 kein einheitliches Bild erbracht. Vielmehr deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Bindung von TNF an seine beiden Rezeptoren sehr vom Kontext abhängig ist, in dem diese Bindung stattfindet. Auf diesen Punkt wird in der Diskussion näher eingegangen.

Anteil der TNF-Rezeptoren an der Oberflächenbindung von TNF an KIT225-Zellen

Die Bindung von TNF an KIT225-Zellen wird durch die ADP-Ribosylierung stark gehemmt (s. Abb. 5. 4). Diese Zellen exprimieren beide TNF-Rezeptoren endogen (s. Abb. 5. 2). Um den jeweiligen Anteil der beiden Rezeptoren an der TNF-Oberflächenbindung festzustellen, wurden die KIT225-Zellen mit einem monoklonalen anti-TNFR1-Antikörper und einem anti-TNFR2-Kaninchenserum einzeln oder zusammen für 20 min bei 4 °C vorinkubiert und im Anschluss mit rekombinantem TNF

versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation wurden die Zellen gewaschen und das auf der Zelloberfläche gebundene TNF wurde mittels des polyklonalen anti-TNF-Ziegenserums und eines anti-Ziegen-PE-Konjugats im FACS detektiert.

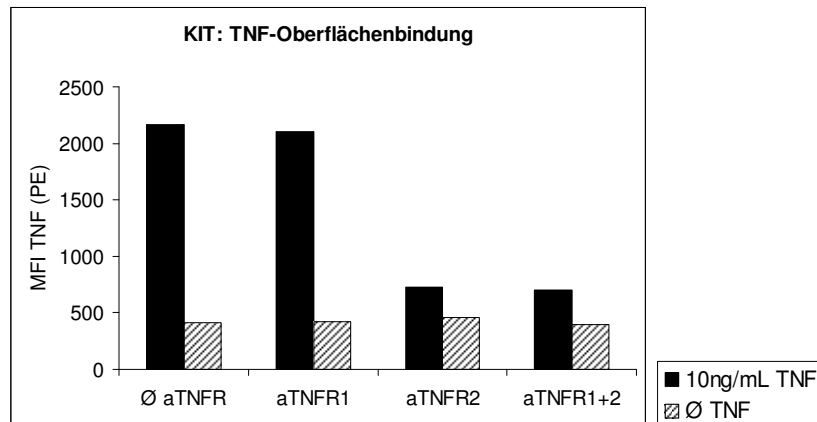


Abb. 5. 16 Anteil der TNF-Rezeptoren an der gemessenen TNF-Oberflächenbindung auf KIT225-Zellen: Je 10^6 KIT225-Zellen wurden mit einem monoklonalem Maus-anti-TNFR1-Ak (1:100) und einem polyklonalem Kaninchen-anti-TNFR2-Serum (1:200) einzeln bzw. zusammen für 20 min bei 4 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne Behandlung mit a-TNFR-Ak untersucht. Die KIT225-Zellen wurden mit 10 ng/mL rekombinantem TNF (schwarze Balken) und ohne TNF (gestreifte Balken) für 10 min bei 4 °C inkubiert und gewaschen. Das oberflächengebundene TNF wurde mit einem Ziege-anti-TNF-Serum und einem PE-konjugierten Esel-anti-Ziege-Ak detektiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Vorinkubation mit dem anti-TNFR1-Antikörper keinen Einfluss auf die messbare Bindung von TNF hat. Dagegen bewirkte die Vorinkubation mit dem anti-TNFR2-Antikörper einen deutlichen Rückgang der TNF-Oberflächenbindung, welcher nicht weiter durch den gemeinsamen Einsatz beider anti-TNFR-Antikörper verstärkt wurde (Abb. 5. 16). Diese Ergebnisse zeigen, dass die an KIT225-Zellen gemessene Oberflächenbindung von TNF fast vollständig auf Bindung an den TNFR2 zurückzuführen ist.

Anteil der TNF-Rezeptoren an dem TNF-induzierten Zelltod von KIT225-Zellen

Der durch TNF ausgelöste Zelltod lässt sich nicht eindeutig der Aktivierung eines der beiden TNF-Rezeptoren zuordnen. In einer Vielzahl von Berichten wird der TNF-induzierte Zelltod dem TNFR1, der intrazellulär die so genannte Todes-Domäne (DD) besitzt, zugeschrieben (s. Einleitung). Es gibt aber auch andere Publikation, die die Zelltod-auslösende Wirkung des TNF dem TNFR2 oder der synergistischen Aktivität beider Rezeptoren zuschreiben (s. Einleitung). So ist per se keine Aussage über den TNF-Rezeptor möglich, auf den sich die in Abb. 5. 7 gezeigte Abnahme des KI225-Zelltodes in Abhängigkeit vom ADP-Ribosylierungsgrad zurückzuführen ließe.

Daher wurde untersucht, ob der in KIT225 durch TNF induzierte Zelltod durch Prä-Inkubation mit den TNFR-spezifischen Antikörpern beeinflusst werden konnte. Dazu wurden KIT225-Zellen mit dem anti-TNFR1-Antikörper und dem anti-TNFR2-Serum

einzelnen oder zusammen für 20 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert und dann mit rekombinantem TNF für 24 Stunden ko-inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Propidiumiodid versetzt und die Zahl toter Zellen im FACS bestimmt.

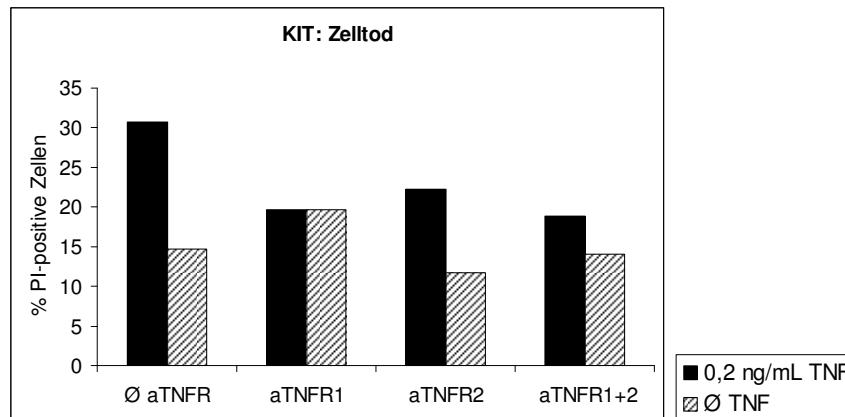


Abb. 5. 17 Anteil der TNF-Rezeptoren am TNF-induzierten Zelltod von KIT225-Zellen: 10^6 KIT225-Zellen/mL (96 well) wurden in RPMI-Komplettmedium (Ø IL-2) mit einem monoklonalem Maus-anti-TNFR1-Ak (1:100, Klon H398) und einem polyklonalem Kaninchen-anti-TNFR2-Serum (1:200) einzeln bzw. zusammen für 20 min bei RT vorinkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne anti-TNFR-Ak Prä-Inkubation untersucht. Die Zellen wurden mit 0,2 ng/mL rekombinantem TNF (schwarze Balken) oder PBS (gestreifte Balken) versetzt und 24 h bei 37 °C unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Zellen wurden mit 0,2 µg/mL PI inkubiert und am FACS vermessen. Anhand der MFI-Werte wurde auf PI-positive Zellen (tote Zellen) *gated* (s. Abb. 5. 6 B). Die Zahlen geben die Anzahl der Zellen innerhalb des *Gates* in % wieder. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Versuche.

Die Ergebnisse sind in Abb. 5. 17 zusammengefasst. Die Betrachtung der Ansätze ohne Zugabe von TNF (gestreifte Balken) zeigt, dass allein die Inkubation mit dem anti-TNFR1-Antikörper schon zu einer geringen Zunahme des Zelltods führt, dass dieser Antikörper also einen partiell agonistischen Effekt aufweist. Dies ist für das anti-TNFR2-Serum nicht der Fall. Die Ko-inkubation der Zellen mit beiden Antikörpern hebt den agonistischen Effekt des anti-TNFR1-Antikörpers auf. Die Inkubation der Zellen mit TNF (schwarze Balken) führt zu einer deutlichen Zunahme des Zelltods in Abwesenheit der Antikörper. Dieser Effekt wird durch beide Antikörper blockiert.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass beide TNF-Rezeptoren an dem TNF-induzierten Zelltod in KIT225-Zellen beteiligt sind, und lassen daher keine Rückschlüsse zu, welcher der beiden TNF-Rezeptoren für die in Abb. 5. 7 gezeigte Abnahme des Zelltodes durch ADP-Ribosylierung des TNFs verantwortlich ist.

Anteil der TNF-Rezeptoren an der TNF-induzierten Aktivierung von Granulozyten

Als nächstes wurden die anti-TNF-Rezeptor-Antikörper eingesetzt, um die Beteiligung der beiden Rezeptoren an dem durch TNF induzierten CD62L-*Shedding* auf Granulozyten zu untersuchen. Dazu wurden 100 µL humanes Vollblut zunächst mit dem anti-TNFR1-Antikörper und dem anti-TNFR2-Serum einzeln oder zusammen für 30 Minuten bei 4 °C vorinkubiert, dann mit rekombinantem TNF versetzt, und nach

einstündiger Inkubation mit einem anti-CD62L-PE-Konjugat angefärbt. Nach Erythrozyten-Lyse wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

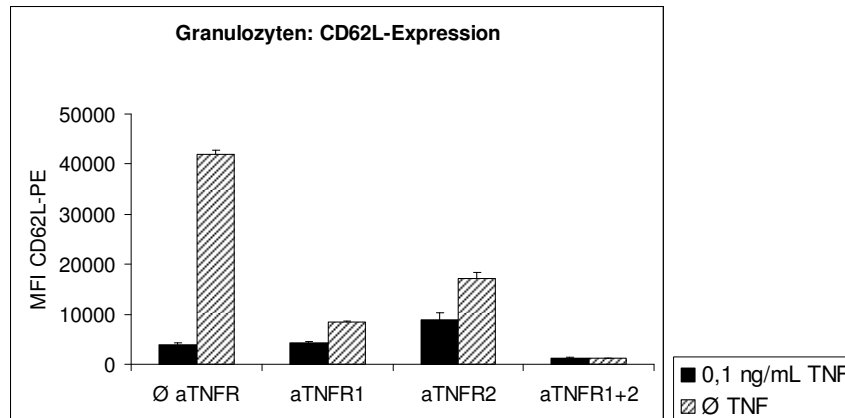


Abb. 5. 18 Anteil der TNF-Rezeptoren an der TNF-induzierten Abnahme der CD62L-Oberflächenexpression auf Granulozyten: Je 100 µL humanes Vollblut wurden mit einem monoklonalen Maus-anti-TNFR1-Ak (1:100, Klon: H398) und einem polyklonalen Kaninchen-anti-TNFR2-Serum (1:200) einzeln bzw. zusammen für 30 min bei 4 °C vorinkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne a-TNFR-Ak-Prä-Inkubation untersucht. Die Ansätze wurden mit 0,1 ng/mL TNF (schwarze Balken) und ohne TNF (gestreifte Balken) für 1 h bei 37 °C unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert und mit einem monoklonalem, PE-konjugiertem Maus-anti-CD62L-Ak (1:5) für 30 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Erythrozyten unter gleichzeitiger Fixierung der Proben lysiert (Fix/Lyse Puffer von BD). Nach Waschen wurden die Zellen im FACS analysiert. Anhand der *Scatter*-Eigenschaften (s. Abb. 5. 9) wurden die Granulozyten von den restlichen PBLs unterschieden und getrennt analysiert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Das Balkendiagramm zeigt die MFI-Werte von CD62L auf Granulozyten für die einzelnen anti-TNFR-Ak-Ansätze.

Die Ergebnisse sind in Abb. 5. 18 dargestellt. Hier zeigt sich eine starke agonistische Wirkung sowohl des anti-TNFR1-Antikörpers als auch des anti-TNFR2-Serums, wobei beide Antikörper zusammen einen synergistisch-agonistischen Effekt aufweisen (gestreifte Balken). Bei den Ansätzen, die mit TNF inkubiert wurden (schwarze Balken), zeigt das anti-TNFR2-Serum zusätzlich zu seinem oben beschriebenen starken agonistischen einen leichten antagonistischen Effekt, indem es die durch TNF-induzierte Abnahme der CD62L-Expression gegenüber dem Ansatz ohne Antikörper abschwächt.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass, ähnlich wie bei dem TNF-induzierten Zelltod in KIT225-Zellen, beide Rezeptoren an dem TNF-induzierten *Shedding* von CD62L auf Granulozyten beteiligt sind. Auch dieser Versuch trägt also nicht zur Klärung der Frage bei, welcher TNF-Rezeptor durch die ADP-Ribosylierung von TNF präferenziell beeinflusst wird. Bei der Bewertung dieses Versuches muss allerdings berücksichtigt werden, dass es nicht sicher ausgeschlossen werden kann, dass bakterielle Verunreinigungen in den Antikörperlösungen möglicherweise zur Abnahme der CD62L-Expression beigetragen haben, da Granulozyten in Bezug auf ihre CD62L-Expression sehr empfindlich auf Stimulanzen wie LPS reagieren.

In denselben Ansätzen wurde auch die Änderung der Granulozyten-Morphologie wie in Abschnitt 5.1.4 beschrieben analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 5. 19 zusammengefasst.

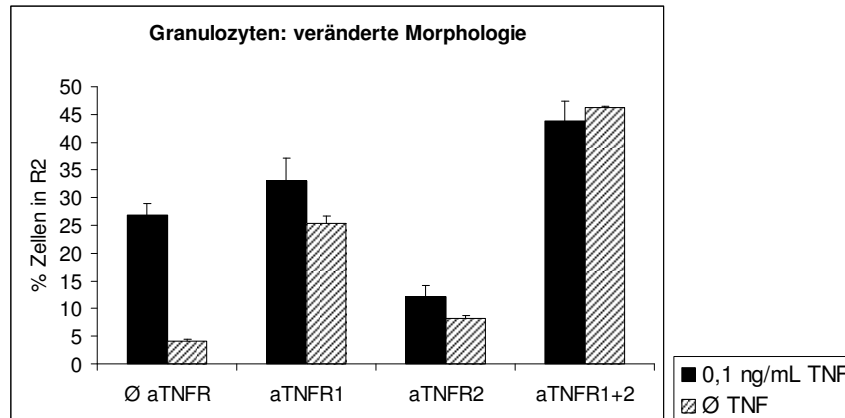


Abb. 5. 19 Anteil der TNF-Rezeptoren an der TNF-induzierten Änderung der Granulozyten-Morphologie: Die Granulozyten der Abb. 5. 18, die mit den a-TNFR1-Ak und/oder dem a-TNFR2-Antiserum vorinkubiert wurden und mit 0,1 ng/mL TNF ko-incubiert (schwarze Balken), bzw. ohne TNF inkubiert wurden (gestreifte Balken), wurden anhand ihrer *Scatter*-Eigenschaften analysiert. Das Balkendiagramm zeigt die % der Granulozyten mit veränderter Morphologie aus R2, wie in Abb. 5. 11 A. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

In den Ansätzen ohne Zugabe von TNF (gestreifte Balken) zeigte sich wiederum ein starker agonistischer Effekt des anti-TNFR1-Antikörpers, der durch Ko-Inkubation mit dem anti-TNFR2-Serum noch gesteigert wurde. Mit ca. 25 % Granulozyten in R2 nach Inkubation erreichte der anti-TNFR1-Antikörper beinahe den Wert, der durch Inkubation mit TNF erzielt wurde (ca. 27 %, linker schwarzer Balken). Der anti-TNFR1-Antikörper zeigte keinerlei antagonistischen Effekt auf die Formveränderung der Granulozyten. Im Gegenteil, wurden die anti-TNFR1-Antikörper behandelten Zellen zusätzlich mit TNF inkubiert, stieg der Anteil von Granulozyten mit veränderter Morphologie noch weiter an. Das anti-TNFR2-Serum zeigte dagegen keinen agonistischen Effekt auf die TNF-Wirkung (vgl. ersten und dritten gestreiften Balken), aber einen starken antagonistischen (vgl. ersten und dritten schwarzen Balken).

Auch dieses Ergebnis weist darauf hin, dass beide Rezeptoren an der durch TNF ausgelösten Änderung der Morphologie von Granulozyten beteiligt sind. Die deutliche Hemmung des Effekts durch das anti-TNFR2-Serum zeigt eine Beteiligung von TNFR2, aber die agonistische Wirkung des anti-TNFR1-Antikörpers weist auch auf eine Beteiligung von TNFR1 hin.

Die Untersuchungen dieses Abschnitts zeigen, dass beide TNF-Rezeptoren an allen untersuchten Wirkungen von TNF beteiligt sind. Der TNF-induzierte Zelltod konnte sowohl durch Einsatz des monoklonalen anti-TNFR1-Antikörpers, als auch des polyklonalen anti-TNFR2-Antiserums ganz bzw. teilweise blockiert werden (antagonistischer Effekt). Die Aktivierung von Granulozyten wurde dagegen durch

Inkubation mit dem anti-TNFR1-Antikörper und dem anti-TNFR2-Antiserum ausgelöst (agonistischer Effekt). Damit lassen sich für diese Effekte keine Rückschlüsse auf den durch die ADP-Ribosylierung von TNF beeinflussten TNF-Rezeptor ziehen. Eine eindeutige Zuordnung war nur für die Bindung von TNF an die KIT225-Zelloberfläche möglich, diese wird hauptsächlich durch den TNFR2 vermittelt. Damit ist die in Abb. 5. 4 gezeigte reduzierte Bindung des ADP-ribosylierten TNF an die KIT225-Zelloberfläche auf die verminderte Bindungsaffinität von modifiziertem TNF zum TNFR2 zurückzuführen.

5.1.7 Einfluss der ADP-Ribosylierung auf Zelloberflächen von Zielzellen auf TNF-induzierte Effekte

Die bisherigen Untersuchungen hatten die Wirkung von löslichem, prä-ADP-ribosyliertem TNF auf Zielzellen, die selber keine ART-Aktivität besitzen, zum Gegenstand. In diesem Abschnitt soll eine weitere topologische Konstellation, die Modifikation von löslichem TNF durch eine auf der Zielzelle selbst befindliche, zellständige ART1, untersucht werden. Die beiden Situationen unterscheiden sich sowohl in räumlichen als auch in zeitlichen Aspekten voneinander. Während im ersten Fall TNF zeitlich vor dem Auftreffen des TNFs auf seine Zielzelle, unabhängig von dieser und möglicherweise räumlich entfernt von der Zielzelle ADP-ribosyliert wird („endokriner“ Effekt der ADP-Ribosylierung), trifft bei der zweiten Möglichkeit noch unmodifiziertes TNF auf eine Zelle, die es bei Anwesenheit von NAD selbst ADP-ribosylieren kann („autokriner“ Effekt der ADP-Ribosylierung).

Einfluss der ADP-Ribosylierung auf Zelloberflächen von Zielzellen auf die TNF-Bindung

Um den Effekt der ADP-Ribosylierung durch eine zellständige ART auf die Bindung von TNF an die ART-exprimierende Zelle zu untersuchen, wurden KIT225-Zellen stabil mit humaner ART1 transfiziert (KIT225.ART1). Transfizierte und nicht-transfizierte Zellen wurden mit und ohne TNF und NAD in verschiedenen Kombinationen inkubiert (Abb. 5. 20). Um herauszufinden, ob die ADP-Ribosylierung anderer Zelloberflächenproteine einen Einfluss auf die Bindung von TNF nimmt, wurden die KIT225.ART1-Zellen zur Kontrolle mit NAD prä-inkubiert und vor der TNF-Behandlung gewaschen. Anschließend wurde das oberflächengebundene TNF wie gewohnt detektiert.

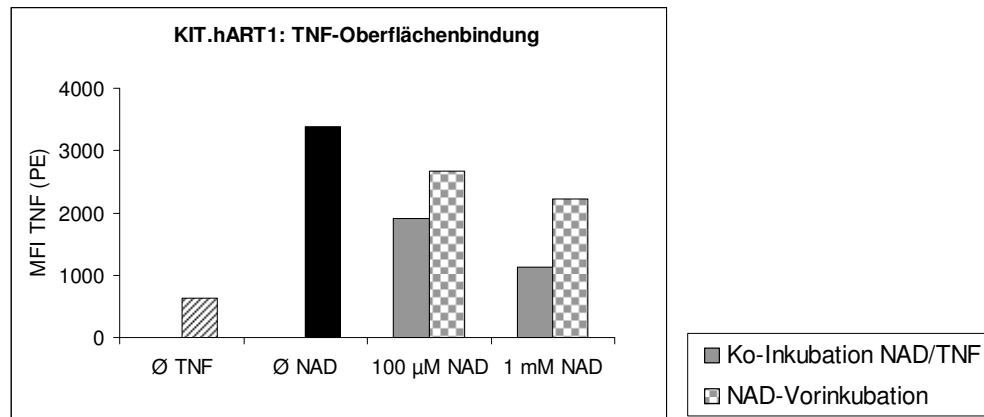
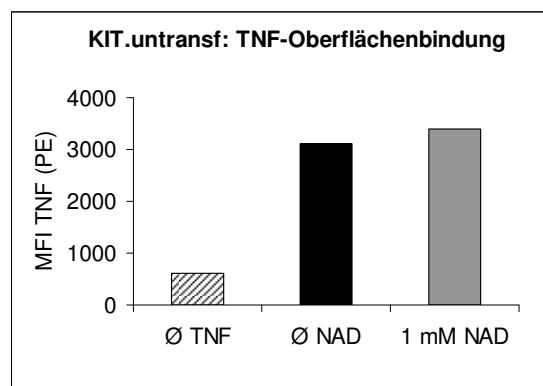
A**B**

Abb. 5. 20 Einfluss der ADP-Ribosylierung durch KIT225.ART1-Zellen auf die Oberflächenbindung von TNF: **A)** 10^6 KIT225-Zellen, die mit ART1 stabil transfiziert wurden, wurden mit NAD (100 μ M 1 mM NAD) für 1 h bei 37 °C vorinkubiert und entweder mit 5 ng/mL rekombinantem TNF für weitere 10 min bei 4 °C ko-inkubiert (graue Balken) oder nach der NAD-Vorinkubation gewaschen und mit TNF allein für 10 min inkubiert (grau-karierte Balken). **B)** Zur Kontrolle wurden untransfizierte KIT225-Zellen nach NAD-Vorinkubation mit TNF ko-inkubiert. **A+B)** Zellen wurden auch ohne NAD-Inkubation (schwarze Balken) bzw. ohne jede Behandlung (gestreifte Balken) untersucht. Das oberflächengebundene TNF wurde mit einem Ziege-anti-TNF-Serum und einem PE-konjugierten Esel-anti-Ziege-Ak detektiert. Das Balkendiagramm zeigt die MFI-Werte der einzelnen TNF-Präparationen. Die Analyse schließt tote Zellen aus.

Die Ergebnisse für KIT225.ART1-Zellen sind in Abb. 5. 20 A dargestellt. Bei Vorinkubation der Zellen mit NAD und Gabe von TNF unter Bedingungen, unter denen es selber nicht mehr ADP-ribosyliert werden kann, zeigte sich eine leichte, aber deutliche Reduktion der TNF-Bindung in Abhängigkeit von der NAD-Dosis (grau-karierte Balken), die durch die Modifikation anderer Zelloberflächenproteine (wie z.B. TNFR2, s. Abb. 5. 23) bedingt sein könnte. In den Ansätzen wo NAD und TNF gleichzeitig gegeben wurden, nahm die TNF-Bindung vergleichsweise stärker und ebenfalls NAD-dosisabhängig ab (graue Balken). Dabei konnte die höchste eingesetzte NAD-Konzentration (1 mM) die TNF-Bindung nicht ganz vollständig hemmen. Dieser Rückgang in der TNF-Zelloberflächenbindung ist abhängig von ART1, da

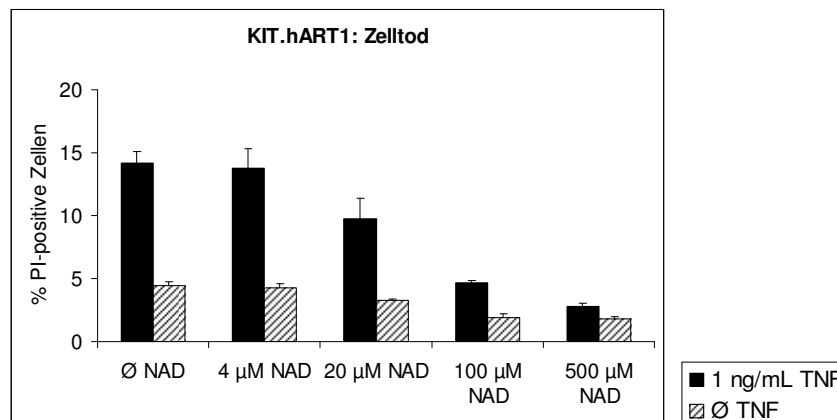
untransfizierte Zellen keine Reduktion der Oberflächenbindung von TNF nach Inkubation mit NAD zeigen (Abb. 5. 20 B).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass lösliches TNF von zellständiger ART1 bei Anwesenheit von NAD modifiziert wird, und dass dies die Bindung des TNF an die Zelloberfläche hemmt (s. letzten Punkt dieses Abschnitts und Abschnitt 6.5).

Einfluss der Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung auf den TNF-induzierten Zelltod

Als nächstes wurde der Einfluss der Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung auf den TNF-induzierten Zelltod von KIT225.ART1-Zellen untersucht. Dazu wurden KIT225.ART1- und untransfizierte KIT225-Zellen mit oder ohne 1 ng/mL rekombinantem TNF in Anwesenheit unterschiedlicher NAD-Konzentrationen für 24 Stunden in IL-2-freiem Medium inkubiert, und anschließend wie in Abb. 5. 6 beschrieben auf den Anteil toter Zellen analysiert.

A



B

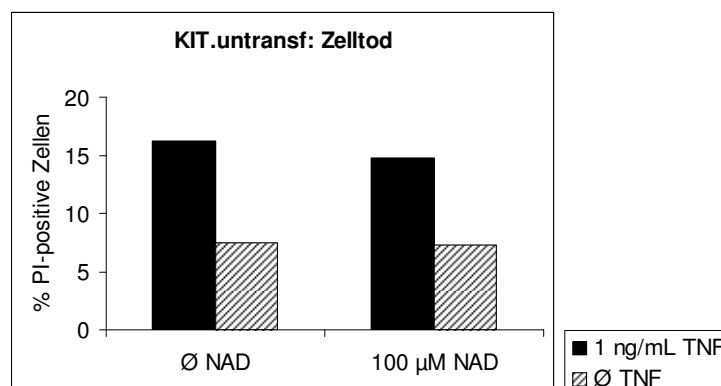


Abb. 5. 21 Einfluss der ADP-Ribosylierung durch KIT225.ART1-Zellen auf den TNF-induzierten Zelltod: 10^6 KIT225-Zellen/mL (96 well) die **A**) mit ART1 stabil transfiziert wurden oder **B**) untransfiziert waren, wurden in RPMI-Komplettmedium (Ø IL-2) mit 1 ng/mL rhTNF (schwarze Balken) bzw. ohne TNF (gestreifte Balken) und unterschiedlichen NAD-Konzentrationen (4; 20; 100 oder 500 µM NAD) oder ohne NAD üN bei 37 °C unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, 0,2 µg/mL PI wurde zugesetzt und die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Das Balkendiagramm zeigt die % PI-positiver

Zellen, die aufgrund der MFI-Werte für PI erhalten wurden (s. Abb. 5. 6 B). Es wurden Doppelbestimmungen für die KIT225.ART1-Zellen durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 5. 21 A zu sehen. Die Ko-Inkubation von KIT225.ART1-Zellen mit TNF und NAD führte zu einer Abnahme der toten Zellen in Abhängigkeit von der NAD-Konzentration (schwarze Balken). Die höchste NAD-Konzentration (500 μ M) bewirkte eine fast vollständige Hemmung des TNF-induzierten Zelltods. Interessanterweise führte die Inkubation mit NAD auch in den nicht mit TNF behandelten Ansätzen zu einer leichten Reduktion des Zelltodes (gestreifte Balken). Die beschriebenen Effekte waren von der ART1-katalysierten ADP-Ribosylierung abhängig, da NAD keinen Effekt auf untransfizierte KIT225-Zellen hatte (Diagramm B).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass KIT225.ART1-Zellen durch die Aktivität der auf ihrer Zelloberfläche exprimierten ART1 sich vor dem TNF-induzierten Zelltod effektiv schützen können.

Einfluss der Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung auf die TNF-induzierte Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade

Als nächstes wurde der Einfluss der Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung auf die Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade durch TNF untersucht (s. Abschnitt 5.1.5). KIT225.ART1-Zellen wurden mit oder ohne TNF und NAD für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, und die Aktivierung von NF- κ B wurde durch Nachweis der Phosphorylierung und Degradation von I κ B wie in Abb. 5. 13 nachgewiesen.

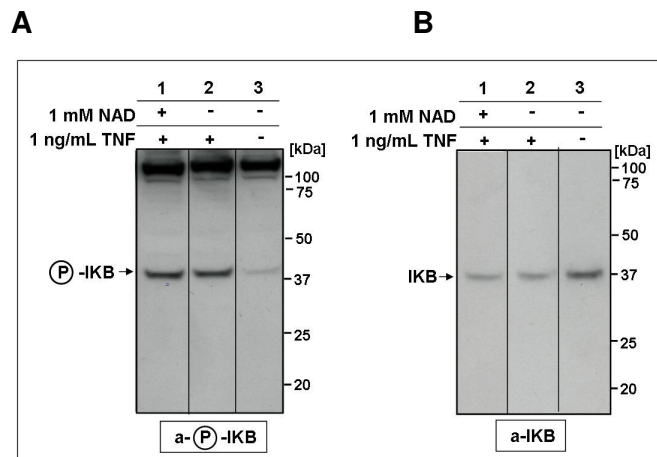


Abb. 5. 22 Einfluss der ADP-Ribosylierung durch KIT225.ART1-Zellen auf die TNF-induzierte Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade: $2 \cdot 10^6$ stabil transfizierte KIT225.ART1-Zellen wurden mit 1 ng/mL TNF bzw. ohne TNF ($\emptyset$; PBS) und 1 mM NAD bzw. ohne NAD für 60 min bei 37 °C unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und mit 100 μ L Lysepuffer (1 % NP-40, 1 mM Na₃VO₄, 1mM AEBSF in PBS +/-) für 15 min bei 4 °C lysiert. Es folgten SDS-PAGE, Western-Blot und Immunodetektion mit **A**) Maus-anti-Human-P-I κ B-mAk (1:1000) und Schaf-anti-Maus-IgG-HRP (1:2500) bzw. **B**) Kaninchen-anti-human-I κ B-mAk (1:1000) und Esel-anti-Kaninchen-IgG-HRP (1:2500). Zur Detektion wurde das ECL-System (Amersham) verwendet. Je Spur wurden 25 μ L GZL aufgetragen, als

Proteingrößenstandard (4 µL) wurde der Kaleidoscope™ Precision Plus Protein Standard (BioRAD) verwendet.

Die Ergebnisse sind in Abb. 5. 22 gezeigt. Wie erwartet führte die Inkubation mit TNF zu einer Zunahme des phosphorylierten IκB (vgl. Spuren 2 und 3 in Blot A). Wurden die KIT225.ART1-Zellen zusätzlich mit NAD inkubiert, so war jedoch keine Abnahme der Intensität der phospho-IκB-Bande im Vergleich zu dem Ansatz ohne NAD zu verzeichnen (vgl. Spuren 1 und 2 in Blot A). Parallele Ergebnisse wurden durch Detektion des IκB-Proteins erhalten (Blot B). Die Inkubation mit TNF führte zu einer Abnahme des IκB-Proteins (vgl. Spuren 2 und 3), die durch die zusätzliche Inkubation mit NAD nicht verhindert wurde (vgl. Spuren 1 und 2).

Somit zeigen die Ergebnisse, dass die ADP-Ribosylierung von TNF durch eine zellständige ART nicht ausreicht, um die Aktivierung des NF-κB Signalweges zu unterdrücken, obwohl, wie im vorangegangenen Experiment gezeigt, der TNF-induzierte Zelltod sehr wohl beeinflusst wird (s. Diskussion, Abschnitt 6.5).

ADP-Ribosylierung von TNFR2 durch ART1

Die in Abb. 5. 20 dargestellten Untersuchungen an KIT225.ART1-Zellen hatten die Möglichkeit angedeutet, dass TNF-Rezeptoren Zielproteine für die humane ART1 sein könnten. Um dem nachzugehen, wurden HEK293-Zellen mit Expressionskonstrukten für ART1 und den TNFR2 (TNFR2 FL) ko-transfiziert. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion geerntet, mit ethenoNAD behandelt, und nach mehrmaligem Waschen lysiert. Der TNFR2 wurde mittels eines an Protein G-Sepharose gekoppelten Kaninchen-anti-TNFR2-Antiserums immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot wurden ethenoADP-ribosylierte Proteine mit Hilfe des Maus-anti-ethenoAdenosin-Antikörpers (1G4) und anschließender Inkubation mit anti-Maus-IgG-HRP detektiert.

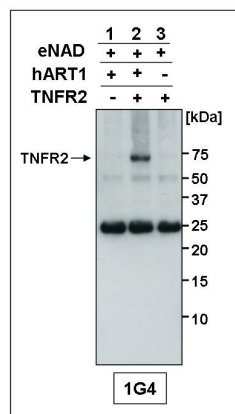


Abb. 5. 23 ethenoADP-Ribosylierung von TNFR2: HEK293-Zellen wurden mittels des JetPEI™ Transfektions-Systems (Polyplus-transfection) mit 2µg ART1 und 2µg TNFR2 FL (Spur 2) ko-transfiziert. Zur Kontrolle wurden HEK293-Zellen nur mit ART1 oder nur mit dem TNFR2 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und für 30 min bei 37 °C mit 50 µM eNAD inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurden 10⁷ Zellen/mL mit 1 % TritonX-100 lysiert. Der TNFR2 FL wurde mit Kaninchen-anti-TNFR2-Protein G-Sepharose immunpräzipitiert. Es folgten SDS-PAGE, Western-Blot und Immunodetektion. Als Proteingrößenstandard wurde der Kaleidoscope™ Precision Plus Protein Standard (BioRAD)

eingesetzt (4 µL). Immunodetektion mit 1G4-Antikörper (1,2 µg/mL) und Schaf-anti-Maus-IgG-HRP (1:2.500).

Wie dem Ergebnis der Abb. 5. 23 zu entnehmen ist, weist die HEK293.TNFR2/ART1-Ko-Transfektante (Spur 2) eine deutliche Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 74 kDa auf, was dem Molekulargewicht des TNFR2 entspricht (75 kDa). Die Kontroll-Ansätze ohne TNFR2 (Spur 1) oder ohne ART1 (Spur 3) zeigen auf dieser Höhe keine Banden. Der TNFR2 stellt somit ein neu identifiziertes Zielprotein von ART1 dar. Die in allen drei Spuren auftretenden zusätzlichen 2 Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von 25 bzw. 50 kDa entsprechen der leichten bzw. schweren Kette des zur Immunpräzipitation eingesetzten Antikörpers.

Über den Einfluss der ADP-Ribosylierung des TNFR2 auf seine Funktion ist bisher nichts bekannt. Der hemmende Effekt der Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung auf KIT225-Zellen auf den TNF-induzierten Zelltod (s. Abb. 5. 21) könnte möglicherweise auf die Modifikation des TNFR2 zurückzuführen sein.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieses Abschnitts, dass die ADP-Ribosylierung durch eine zellständige ART1 die Bindung von TNF hemmen und die Zelle vor dem TNF-induzierten Zelltod schützen kann. Interessanterweise hatte die Oberflächen-ADP-Ribosylierung aber keinen hemmenden Effekt auf die TNF-induzierte Aktivierung der NF-κB-Signalkaskade. Damit zeigt sich, dass es Unterschiede gibt zwischen der aktiven Modulation der TNF-Wirkung durch eine ART-tragende Zelle und der Konfrontation anderer, nicht ART-tragender Zellen mit durch lösliche ART1 bereits vormodifiziertem TNF. Weiterhin wurde gezeigt, dass der TNFR2 selber von humaner ART1 ADP-ribosyliert werden kann. Wie sich diese Modifikation des Rezeptors auf seine Signalübertragung auswirkt, bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

5.2 Bestimmung der ADP-Ribosylierungsstelle(n) im TNF-Molekül

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der strukturellen Charakterisierung der ADP-Ribosylierung von TNF. Mit Hilfe der Massenspektrometrie und mit Mutationsanalysen sollten die ADP-Ribosylierungsstellen im TNF-Molekül identifiziert werden. Im weiteren Verlauf wurden Bindungsassays und Untersuchungen zu den biologischen Wirkungen von TNF-Mutanten durchgeführt, um die im Abschnitt 5.1 beschriebenen blockierenden Effekte der ADP-Ribosylierung von TNF der Modifikation bestimmter Ziel-Arginine zuzuordnen.

5.2.1 Massenspektrometrie

Um die ADP-Ribosylierungsstelle(n) im TNF-Molekül zu identifizieren, wurde das Verfahren der Massenspektrometrie eingesetzt. Eukaryotische Mono-ADP-Ribosyltransferasen übertragen die ADP-Ribosegruppe von NAD spezifisch auf Argininreste. Prozessiertes TNF (157 Aminosäuren) enthält neun Argininreste, die potentielle ADP-Ribosylierungsstellen darstellen. Die Aminosäuresequenz von humanem, prozessiertem TNF ist in Abb. 5. 28 dargestellt.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden von Dr. Friedrich Buck, Institut für Klinische Chemie am UKE durchgeführt. Um das Verhalten von ADP-ribosylierten Peptiden im Verlauf massenspektrometrischer Verfahren zu untersuchen, wurden zunächst Vorversuche mit dem Modell-Peptid „Kemptide“ durchgeführt, einem Heptamer, das von anderen Gruppen als artifizielles Substrat der ADP-Ribosylierung beschrieben worden war [151, 152]. Diese Vorversuche zeigten, dass die ADP-Ribosegruppe bei hoher Fragmentierungsenergie (*collision induced fragmentation*, CID) vom Argininrest des Peptids abgespalten wird, und sich daraus ein eindeutiges Muster aus vier Fragmenten („ADPR-Fragmente“) ergibt, die der ADP-Ribosegruppe zugeordnet werden können (Tabelle 5. 2). Zeitgleich mit unserer Entdeckung dieses spezifischen „Fingerabdrucks“ der ADP-Ribosegruppe unter CID-Bedingungen wurde die gleiche Methode von Hengel *et al.* veröffentlicht [153].

Tabelle 5. 2 Fragmentierungsmuster der ADP-Ribosegruppe

ADP-Ribose-Fragment	Theoretische Masse (in Da)
Adenosin-Diphosphat	428,04
Adenosin-Monophosphat	348,07
Adenosin (-18)	250,09
Adenin	136,06

Durch Kopplung von Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie (LC/MS) kann dieser „Fingerabdruck“ der ADP-Ribosegruppe genutzt werden, um in komplexen Protein- oder Peptid-Mischungen die Fraktion, die ein ADP-ribosyliertes Protein bzw. Peptid enthält, zu identifizieren. Die detaillierte Vorgehensweise ist schematisch in Abb. 5. 24 wiedergegeben.

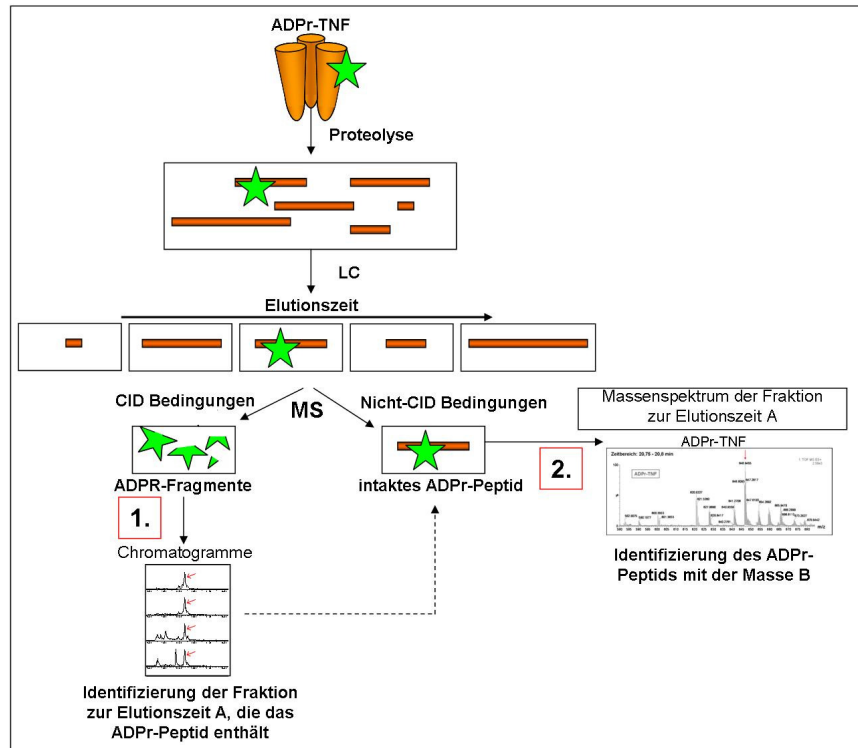


Abb. 5. 24 schematische Darstellung der LC/MS-Analyse von TNF: Die TNF-Proben werden proteolytisch verdaut und die erhaltenen Peptide werden über eine Flüssigkeitschromatographie (LC)-Säule aufgetrennt. Für jede eluierte Fraktion werden alternierend Massenspektren (MS) unter CID (*collision induced fragmentation*)-Bedingungen (hohe Fragmentierungsenergie) und unter Nicht-CID-Bedingungen (niedrige Fragmentierungsenergie) aufgenommen. Unter CID-Bedingungen wird die ADP-Ribosegruppe vom Peptid abgespalten und in kleinere Fragmente zerlegt („ADPR-Fragmente“). Zunächst werden die unter CID-Bedingungen erhaltenen Chromatogramme der bekannten Massen der ADPR-Fragmente (s. Tabelle 5. 2) extrahiert und analysiert (Schritt 1). Bei der Fraktion (Elutionszeit A), bei der alle Massen der vier ADPR-Fragmente gleichzeitig eluieren, handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um die Fraktion, die das ursprünglich intakte ADPR-Peptid enthält. In einem 2. Schritt werden dann die Massenspektren dieser bestimmten Fraktion (Elutionszeit A), die unter Nicht-CID-Bedingungen für das ADPR- bzw. unmodifizierte TNF erhalten wurden, analysiert und verglichen. Das Auffinden von Massen, die nur in der ADP-ribosylierten TNF-Probe, nicht aber in der unmodifizierten TNF-Probe vorhanden sind und den Massen ADP-ribosylierter Peptide zugeordnet werden können, wird somit erheblich erleichtert.

Die für die massenspektrometrischen Untersuchungen eingesetzten ADP-ribosylierten TNF-Proben wurden durch Inkubation von humanem rekombinantem TNF (25 µg/mL in PBS mit 0,125 % BSA) mit 1 mM NAD und 1 µg/mL aufgereinigter ART1 oder 10 µg/mL muriner ART2 über Nacht bei 4 °C hergestellt (s. Abschnitt 4.4.3). ART2 wurde eingesetzt, da es sich besser als ART1 in *E. coli* rekombinant produzieren lässt. Parallelansätze, die ohne NAD inkubiert wurden, lieferten die unmodifizierten TNF-Proben. Die TNF-Proben wurden proteolytisch entweder mit Trypsin, welches nach Arginin- oder Lysinresten schneidet, oder mit der Proteinase V8 (aus *Staphylococcus aureus*), welche nach Glutaminsäureresten schneidet, oder mit beiden in Kombination in Peptide zerlegt. Die Peptidmischung wurde mittels einer nanoUPLC-Anlage (*Ultra Performance Liquid Chromatography*; Waters), die „on-line“ an ein QTOF Tandem-

Massenspektrometer (Micromass) gekoppelt war, aufgetrennt. Von den eluierten Peptiden, die durch Elektrospray Ionisierung (ESI) ionisiert wurden, wurden alternierend MS-Spektren mit niedriger und hoher Fragmentierungsenergie (CID) aufgenommen (MS^E -Methode) [154]. Dadurch wurden in einem Durchgang zwei Chromatogramme erhalten, von denen eines den Vorläufer-Peptidionen und eines den fragmentierten Ionen der Vorläufer-Peptidionen entspricht (s. Abb. 5. 24).

Aus dem fragmentierten Ionen-Chromatogramm der tryptisch verdauten ADP-ribosylierten TNF-Probe wurden die Ionen-Chromatogramme für die Massen der in Tabelle 5. 2 aufgeführten ADP-Ribose-Fragmente extrahiert (s. Abb. 5. 24, Schritt 1).

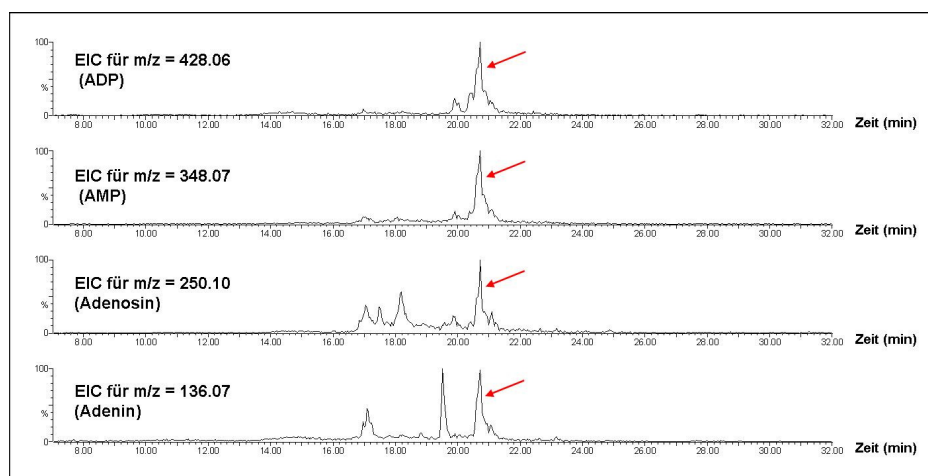


Abb. 5. 25 extrahierte LC/ MS^E -Chromatogramme der Massen der ADP-Ribosegruppe zugeordneten Fragmente: Nach tryptischem Verdau (5 ng/ μ L Trypsin, $\bar{u}$ N, 37 °C) von ADP-ribosyliertem TNF wurden die Peptidfragmente über eine UPLC-Säule aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Dargestellt sind die aus dem fragmentierten Ionen-Chromatogramm extrahierten Ionen-Chromatogramme (EIC = *extraxted ion current*) für die Massen der ADP-Ribose-Fragmente ADP, AMP, Adenosin und Adenin (s. Tabelle 5. 2). Die roten Pfeile weisen auf die Elutionszeit hin (ca. 20,75 min), bei der alle vier Massen eluiert wurden. Die unmodifizierte TNF-Probe wurde nicht gezeigt.

Die Fragmentionen-Chromatogramme der für die ADP-Ribosylierung diagnostischen Massen 428 Da, 348 Da, 250 Da und 136 Da sind in Abb. 5. 25 zu sehen. Es ist zu erkennen, dass jeweils mehrere Fragmente mit diesen Massen zu verschiedenen Zeitpunkten von der UPLC-Säule eluiert wurden. Eine Aussage über die Fraktion, die das ADP-ribosylierte Peptid enthält, ist aus einem einzelnen Chromatogramm also nicht abzulesen. Werden jedoch die Chromatogramme gemeinsam betrachtet, ist zu erkennen, dass nur zum Zeitpunkt 20,7 min alle vier Massen des ADP-Ribose-spezifischen Fragmentierungsmusters gleichzeitig eluiert wurden, was auf die ursprünglich in dieser Fraktion enthaltene ADP-Ribosegruppe und damit auf das Vorhandensein des ADP-ribosylierten Peptids schließen lässt.

Als nächstes wurde das über den Zeitbereich (20,75 - 20,8 min), in dem die ADP-Ribose-Fragmente im MS^E -Chromatogramm detektiert wurden, kombinierte MS-Spektrum (niedrige Fragmentierungsenergie) von ADP-ribosyliertem TNF mit dem

kombinierten MS-Spektrum des unmodifizierten TNF verglichen (s. Abb. 5. 24, Schritt 2).

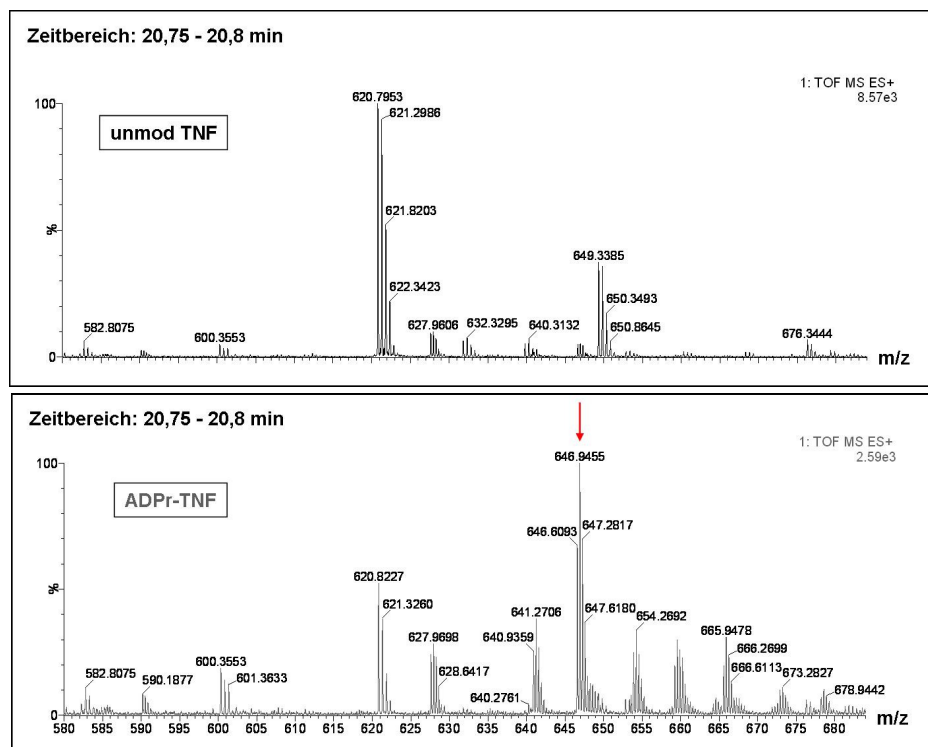


Abb. 5. 26 Kombinierte LC/MS-Spektren (Elutionszeitbereich 20,75 - 20,8 min) der unmodifizierten und ADP-ribosylierten TNF-Proben: Nur Ausschnitte der MS-Spektren, die bei niedriger Fragmentierungsenergie, aufgenommen wurden, wurden dargestellt. In der ADP-ribosylierten TNF-Probe (unteres Massenspektrum) wurde ein Signal mit $m/z = 646,62$ (3x geladenes Vorläufer-Ion) detektiert (roter Pfeil), das in der unmodifizierten TNF-Probe nicht erscheint (oberes Massenspektrum).

Die Abb. 5. 26 zeigt wegen der besseren Übersichtlichkeit nur den relevanten Teil der erhaltenen Massenspektren ($m/z = 580-690$). Bei $m/z = 646,6$ wurde für die ADP-ribosylierte TNF-Probe ein Signal einer dreifach-geladenen Masse detektiert (rot markiert), das in dem LC/MS-Spektrum der unmodifizierten TNF-Probe nicht vorkommt.

Um die Korrelation dieses dreifachgeladenen $m/z = 646,6$ Massenpeaks des LC/MS-Spektrums mit den ADP-Ribosylierungs-Fragmenten des MS^E -Chromatogramms (Abb. 5. 25) zu bestätigen, wurde das Elutionsprofil der identifizierten Masse ($m/z = 646,6$) extrahiert als Chromatogramm dargestellt. In Abb. 5. 27 sind die für das unmodifizierte und für das ADP-ribosylierte TNF erhaltenen extrahierten LC/MS-Chromatogramme (bei niedriger Fragmentierungsenergie) gezeigt.

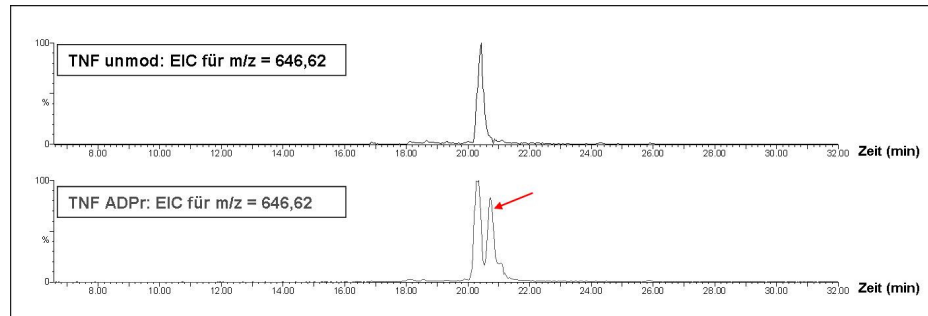


Abb. 5. 27 Extrahierte LC/MS-Chromatogramme von Vorläufer-Ionen mit $m/z = 646,62 \pm 3$ von unmodifiziertem TNF (oberes Chromatogramm) und ADP-ribosyliertem TNF (unteres Chromatogramm): In der ADP-ribosylierten TNF-Probe (unteres Chromatogramm) wurde ein Signal bei 20,75 min detektiert (roter Pfeil), das in der unmodifizierten TNF-Probe nicht erscheint (oberes Chromatogramm). EIC = *extracted ion current*

Das in Abb. 5. 27 dargestellte Elutionsprofil des dreifach geladenen Vorläufer-Ions (ohne CID) mit $m/z = 646,6$ zeigt, dass für die ADP-ribosylierte TNF-Probe (unteres Chromatogramm) ein Ion dieser Masse bei ca. 20,75 min eluierte (roter Pfeil), das in der unmodifizierten Probe nicht erscheint und genau mit dem Elutionsprofil der ADP-Ribose-Fragmente nach der CID korrelierte (Abb. 5. 25). Die anderen Signale in dem Chromatogramm korrelierten nicht mit den Signalen der ADP-Ribose-Fragmente und wurden auch in der unmodifizierten TNF-Kontrolle detektiert.

Zusammen liefern die Daten einen klaren Beweis für die ADP-Ribosylierung eines Peptids mit der neutralen, monoisotopischen Masse von 1936,86 Da ($3 \times 646,62 - 3 \times H^+$), das dazugehörige unmodifizierte Peptid hat eine kalkulierte Masse von 1395,80 Da ($1936,86 \text{ Da} - 541 \text{ Da (ADP-Ribosegruppe)}$), und kann dem tryptischen TNF-Peptid RANALLANGVELR (Aminosäuren 32-44) zugeordnet werden (Abb. 5. 28). Da Trypsin nach ADP-ribosylierten Argininresten nicht schneidet (mündliche Mitteilung von Fritz Buck und s. unten), ist davon auszugehen, dass der C-terminale Argininrest keine ADP-Ribosegruppe trägt und das N-terminale Arginin (R32) die ADP-Ribosylierungsstelle für ART1 darstellt.

Die nach Spaltung mit der Protease V8 (durch ART1 ADP-ribosylierte TNF-Probe) und nach Doppelverdau (Trypsin und V8; durch murine ART2 ADP-ribosylierte TNF-Probe) erhaltenen MS-Spektren und Chromatogramme sind im Anhang, Abschnitt 8.1 zu sehen. Die MS-Analyse des Einzelverdaus mit der V8-Protease identifizierte ein ADP-ribosyliertes Peptid, das zwei Argininreste enthielt (R2 und R6; s. Abb. 5. 28, grüne unterstrichene Sequenz), und daher eine eindeutige Bestimmung des Ziel-Arginins nicht erlaubte. Durch den Doppelverdau mit V8-Protease und Trypsin wurde ein um die zwei N-terminalen Aminosäuren verkürztes Peptid, das die ADP-Ribosegruppe enthielt, detektiert (Abb. 5. 28, schwarz unterstrichene Sequenz). Damit wurde das Arginin 6 als weitere ADP-Ribosylierungsstelle identifiziert.

Dieser Befund liefert zusätzlich die Bestätigung, dass Trypsin nach ADP-ribosylierten Argininresten nicht spaltet, da sonst nach dem Doppelverdau dieses Peptid nicht erhalten worden wäre (s. oben).

Die Ergebnisse aller MS-Untersuchungen sind in Abb. 5. 28 zusammengefasst.

1	V R S S S R T P S D K P V A H V V A N P Q A E G Q L Q W L N
31	R R A N A L L A N G V E L R D N Q L V V P S E G L Y L I Y S
61	Q V L F K G Q G C P S T H V L L T H T I S R I A V S Y Q T K
91	V N L L S A I K S P C Q R E T P E G A E A K P W Y E P I Y L
121	G G V F Q L E K G D R L S A E I N R P D Y L D F A E S G Q V
151	Y F G I I A L

Abb. 5. 28 Aminosäuresequenz von humanem TNF: ADP-ribosylierte Arginine sind fettgedruckt. Unterstrichene Sequenzen zeigen die ADP-ribosylierten Peptide aus dem Trypsinverdau (rot) bzw. dem V8-Verdau (grün). Das aus dem Doppelverdau (Trypsin und V8) erhaltene Peptid ist schwarz unterstrichen.

5.2.2 Identifikation der Ziel-Arginine im TNF durch Mutationsanalysen

Zur Bestätigung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen wurden die identifizierten Argininreste R6 und R32 durch zielgerichtete Mutagenese jeweils einzeln bzw. gemeinsam durch Lysinreste (K) ersetzt. Es wurde eine möglichst konservative Mutation gewählt, die die mutierten Positionen als ADP-Ribosylierungsstellen ausschalten sollten ohne die native Faltung des Proteins zu sehr zu verändern. Die ADP-Ribosylierung der TNF-Mutanten wurde durch Einsatz von radioaktivem [^{32}P]-NAD als Substrat verfolgt.

Als Ausgangspunkt für die Klonierungs- und Mutationsexperimente diente das in dem Expressionsvektor pCMV.SPORT6 erhaltene Gen für das wildtyp TNF (TNF WT) (Imagenes, Berlin). Durch Einsatz geeigneter Restriktionsenzyme wurde das TNF-Gen in den Expressionsvektor pEGFP-N1 unter Fusion eines HA-Tags an das N-terminale Ende von TNF kloniert. Der angefügte HA-Tag sollte die Aufreinigung erleichtern und den Vergleich des Expressionsniveaus der einzelnen TNF-Mutanten ermöglichen. Mit Hilfe der PCR wurden die Primer-gesteuerten Punktmutationen in das wildtyp TNF-Gen eingebracht (s. Abschnitt 4.2.2). Der Erfolg der Mutationen wurde durch Sequenzierung überprüft.

Wildtyp TNF und die Mutanten TNF(R6K), TNF(R32K) und TNF(R6/32KK), sowie eine weitere TNF-Mutante, bei der das dem R32 benachbarte R31 zu K mutiert wurde, wurden untersucht. Die TNF-Varianten wurden jeweils mit ART1 in HEK293-Zellen ko-transfiziert, mit ^{32}P -NAD inkubiert und nach gründlichem Waschen lysiert (s. Abschnitt 4.4.2). Zur Kontrolle wurden TNF bzw. ART1 jeweils alleine transfiziert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Zunächst wurde die Spurenbeladung der einzelnen TNF-Mutanten durch Immunodetektion mit einem HRP-konjugierten anti-HA-Antikörper überprüft. Nach mehrmaligem Waschen der Membran wurden ^{32}P -ADP-ribosylierte Proteine durch Exposition der PVDF-Membran mit einem Röntgenfilm (Kodak) detektiert.

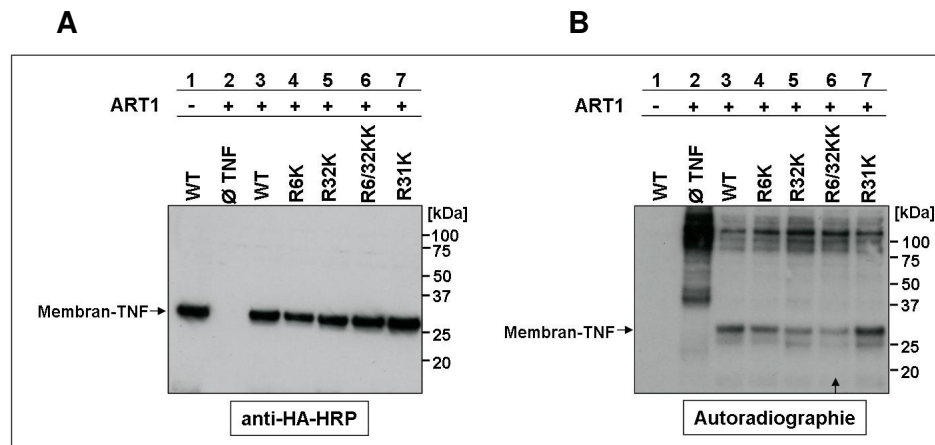


Abb. 5. 29 Autoradiographie der TNF-Mutanten: HEK293-Zellen wurden mittels des JetPEI™ Transfektions-Systems mit 1 µg ART1 und mit 4 µg wildtyp TNF (WT; Spur 3) bzw. den TNF-Mutanten ko-transfiziert (Spuren 4-7). Zur Kontrolle wurden HEK293-Zellen mit TNF WT ohne ART1 (Spur 1) bzw. ohne TNF mit ART1 (Spur 2) jeweils mit einer Kontroll-DNA (hIL-15) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und 10^7 Zellen/mL wurden mit 10 µM NAD und 5 µCi 32 P-NAD für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden 5x gewaschen und mit 1 % TritonX-100 für 30 min bei 37 °C lysiert (10^7 Zellen/mL). 25 µL der GZL wurden für die SDS-PAGE aufgetragen (entspricht $2,5 \cdot 10^5$ Zellen) und die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen. **A**) Es wurde mit einem HRP-konjugierten anti-HA-Antikörper (1:500) (erkennt den N-terminal an die TNF-Proteine angehängten HA-Tag) immunodetektiert. Zur Detektion wurde das ECL-System (Amersham) verwendet. **B**) Die PVDF-Membran wurde mehrmals gewaschen, getrocknet und für 7 Tage bei -80 °C einem Röntgenfilm (Kodak) exponiert. Der Film wurde mittels eines automatischen Film-Entwicklers entwickelt. Als Proteingrößenstandard wurde der Kaleidoscope™ Precision Plus Protein Standard (BioRAD) eingesetzt (4 µL).

Die Ergebnisse der Immunodetektion und der Autoradiographie sind in Abb. 5. 29 dargestellt. Die Immunodetektion des HA-Tags der TNF-Proteine zeigte bei allen mit TNF transfizierten Ansätzen eine deutliche Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 27 kDa (Spur 1; Spuren 3-7; Blot A), was dem Molekulargewicht des unprozessierten, membranständigen TNF entspricht (25,6 kDa). Die Banden wiesen für die TNF WT-Ansätze, ohne und mit ART1, für die TNF-Doppelmutante TNF(R6/32KK) und die TNF-Einzelmutante TNF(R31K) ähnlich hohe Intensitäten auf, die beladenen TNF-Mengen zwischen diesen Ansätzen waren also vergleichbar (Spuren 1, 3, 6 bzw. 7). Die Bandenintensitäten der beiden Einzelmutanten TNF(R6K) bzw. TNF(R32K) waren dagegen etwas schwächer (Spur 4 bzw. Spur 5).

Die Autoradiographie der Abb. 5. 29 B zeigte in den Ansätzen, die mit TNF und ART1 ko-transfiziert wurden (Spuren 3-7), eine Bande bei ca. 27 kDa, die in dem Kontrollansatz, der nicht mit TNF transfiziert wurde, fehlte (Spur 2), und die daher eindeutig dem 32 P-ADP-ribosylierten TNF zugeordnet werden konnte.

Die Einzelmutanten TNF(R6K) und TNF(R32K), bei denen jeweils nur eine der beiden identifizierten ADP-Ribosylierungsstellen verändert wurde, zeigten jeweils eine geringe Abnahme im ADP-Ribosylierungsgrad gegenüber dem Wildtyp TNF. Diese war allerdings nicht eindeutig zu beurteilen, da für diese Mutanten auch die Menge des geladenen TNF-Proteins geringer war (Abb. 5. 29 A). Dagegen zeigte die Doppelmutante TNF(R6/R32KK) gegenüber dem Wildtyp TNF eine deutlich reduzierte

Bandenintensität (vgl. Spur 6 mit Spur 3), obwohl beide Ansätze die gleiche Beladung aufwiesen (s. dieselben Spuren in Abb. 5. 29 A). Demnach wird die ADP-Ribosylierung des TNF durch Veränderung der beiden Arginine R6 und R32 deutlich reduziert. Die Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass es mindestens eine weitere ADP-Ribosylierungsstelle im TNF-Molekül geben muss.

5.2.3 Bindung und biologische Wirkung der TNF-Mutanten

In diesem Abschnitt wurde der Einfluss der Mutationen auf die Bindungsaffinität und biologische Wirksamkeit von TNF untersucht, um herauszufinden, ob der blockierende Effekt der ADP-Ribosylierung von TNF (s. Abschnitte 5.1.2 - 5.1.5) einer bestimmten Modifikationsstelle zugeschrieben werden kann. Als Kontrolle wurde in manchen Versuchen die Einzelmutante TNF(R31K) untersucht, weil R31 direkt dem Ziel-Arginin R32 benachbart ist, aber vermutlich selber nicht von ART1 modifiziert wird.

Zelloberflächenbindung der TNF-Mutanten

Zunächst wurde die Bindung der TNF-Mutanten an die Oberfläche von KIT225-Zellen überprüft. Wildtyp TNF und die vier TNF-Mutanten (R6K, R32K, R6/32KK und R31K) wurden aus Zellkulturüberständen transfizierter HEK293-Zellen gewonnen (s. Abschnitt 4.3.6). Die Konzentrationen wurden mittels eines TNF-spezifischen ELISA-Kits (Immunotools) bestimmt und angeglichen. KIT225-Zellen wurden mit den TNF-Überständen in einer Endkonzentration von 10 ng/mL inkubiert. Als Negativ-Kontrolle diente der Überstand von HEK293-Zellen, die mit einem Kontrollkonstrukt (hIL-15) transfiziert worden waren. Der Nachweis des zellgebundenen TNF erfolgte wie in Abschnitt 5.1.2 beschrieben.

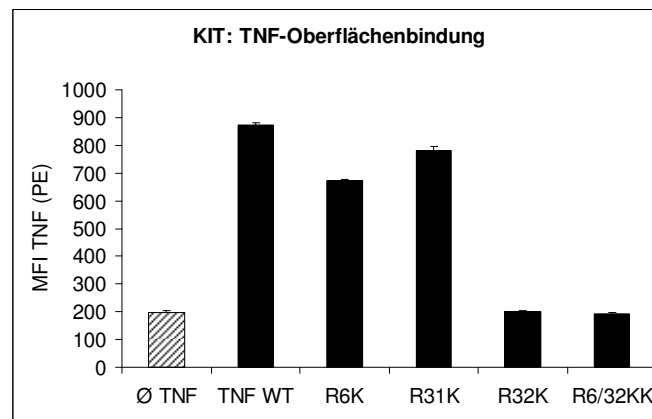


Abb. 5. 30 Affinität der TNF-Mutanten zu der Oberfläche von KIT225-Zellen: 10^6 KIT225-Zellen wurden mit 10 ng/mL TNF WT oder den TNF-Mutanten für 10 min bei 4 °C inkubiert. TNF WT bzw. die TNF-Mutanten wurden nach Transfektion von HEK293-Zellen durch Sammeln der Zellkulturüberständen nach 2 Tagen erhalten (s. Abschnitt 4.3.6). Die Konzentration von TNF in den Überständen wurde mittels ELISA (Immunotools) bestimmt. Zellüberstände aus HEK293-Kontroll-Transfektanten wurden als Negativkontrolle eingesetzt (Ø TNF). Das Oberflächen-gebundene TNF wurde mit einem Ziege-anti-TNF-Serum und einem PE-konjugierten Esel-anti-

Ziege-Ak detektiert. Die Analyse schließt tote Zellen aus. Die Balkendiagramme zeigen die MFI-Werte von TNF.

In Abb. 5. 30 wird die Bindung der TNF-Varianten an KIT225-Zellen zusammengefasst. Erstaunlicherweise zeigte weder die R32K-Einzelmutante noch die R6/32KK-Doppelmutante eine detektierbare Bindung. Obwohl es sich um eine relativ konservative Mutation handelt, führt also der Austausch von Arginin zu Lysin an der Position 32 (R32K) zu einer vollständigen Blockade der Bindung von TNF an die KIT225-Zelloberfläche. Die Bindung der beiden anderen Mutanten R6K bzw. R31K wurde durch den Aminosäureaustausch nicht beeinflusst.

Da die R32K Mutation die TNF-Zelloberflächenbindung an die KIT225-Zellen bereits vollständig hemmte, konnte nicht untersucht werden, ob die ADP-Ribosylierung dieser Mutante zu einer weiteren Reduktion der Bindung führt. Die ADP-Ribosylierung der R6K-Mutante bewirkte eine ähnliche Abnahme der Oberflächenbindung wie die des Wildtyps (nicht gezeigt), woraus geschlossen werden kann, dass die ADP-Ribosylierung an dieser Stelle für die Bindung nicht funktionell relevant ist.

Die Bindung der R32K-Mutante an mit den TNFRs transfizierte HEK293-Zellen wurde ebenfalls untersucht. Die TNF(R32K)-Variante und wildtyp TNF (je 10 ng/mL) aus den Zellkultur-Überständen wurden auf die HEK293.TNFR-Transfektanten gegeben, gewaschen, und das Oberflächen-gebundene TNF wurde wie beschrieben mit dem TNF-spezifischen Antiserum detektiert.

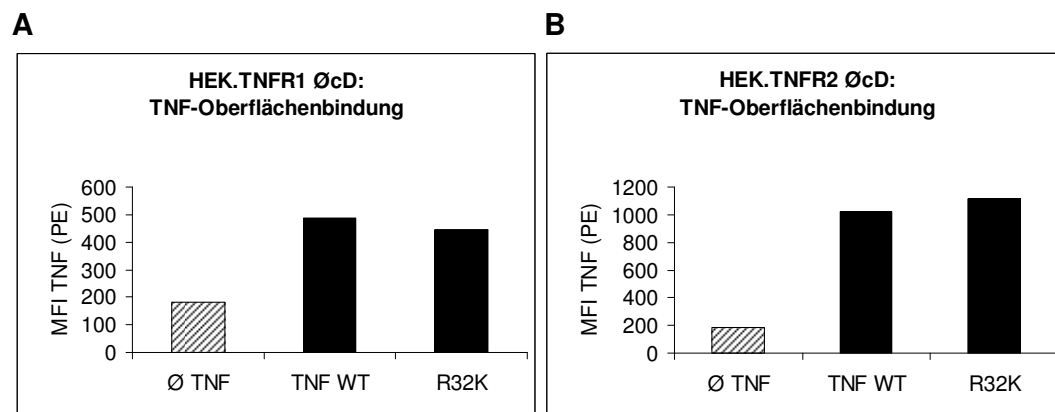


Abb. 5. 31 Affinität der R32K-TNF-Mutante zu der Oberfläche TNFR-transfizierter HEK293-Zellen: HEK293-Zellen wurden mittels des JetPEITM Transfektions-Systems mit verschiedenen TNFR-Expressionskonstrukten (je 5 µg DNA) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. Je 5 · 10⁵ HEK293-Zellen wurden mit 10 ng/mL TNF WT oder der TNF(R32K)-Mutante für 10 min bei 4 °C inkubiert (s. Abb. 5. 30). Zelloberflächen-gebundenes TNF wurde wie unter Abb. 5. 30 beschrieben detektiert. **A**) HEK293-Zellen transfiziert mit TNFR1 ohne cytoplasmatische Domäne (TNFR1 ØcD) und **B**) HEK293-Zellen transfiziert mit TNFR2 ohne cytoplasmatische Domäne (TNFR2 ØcD)

Im Gegensatz zu KIT225-Zellen, bei denen die Bindung der TNF(R32K)-Mutante vollständig blockiert war, gab es in der Bindung an TNFR1- oder an TNFR2-

transfizierte HEK293-Zellen keinen Unterschied zwischen der R32K-Mutante und dem Wildtyp (Abb. 5. 31, Diagramme A und. B).

Damit zeigt sich für die R32K-Mutante ebenso wie für ADP-ribosyliertes TNF (s. Abb. 5. 14) ein unterschiedliches Bindungsverhalten an den TNFR2, je nachdem, ob die Bindung auf HEK293-Zellen oder KIT225-Zellen stattfindet. Insgesamt spiegelt die R32K-Mutante jedoch nicht den Phänotyp von ADP-ribosyliertem TNF wider, da die HEK293.TNFR1-Transfektante interessanterweise eine hohe Sensitivität gegenüber der ADP-Ribosylierung, nicht jedoch gegenüber der R32K Mutation aufwies.

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, welchen Einfluss die Mutationen auf verschiedene Funktionen von TNF haben.

Einfluss der TNF-Mutationen auf den Zelltod

Zunächst wurde der Einfluss der Mutationen auf den TNF-induzierten Zelltod untersucht. Dazu wurden KIT225-Zellen mit 5 ng/mL Wildtyp TNF oder den vier TNF-Mutanten (R6K; R32K; R6/32KK und R31K) für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet, mit Propidiumiodid inkubiert, und der Anteil PI-positiver Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

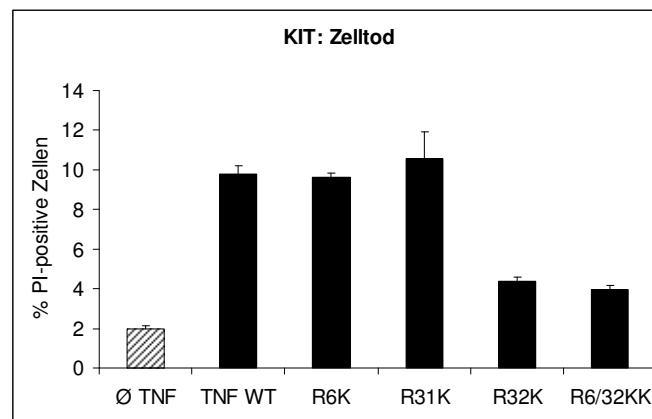


Abb. 5. 32 Einfluss der Mutationen im TNF auf den TNF-induzierten Zelltod: 10^6 KIT225-Zellen/mL (96 well) wurden in RPMI-Komplettmedium (Ø IL-2) mit 5 ng/mL TNF WT und den TNF-Mutanten üN bei 37 °C unter 5 %iger CO_2 -Atmosphäre inkubiert. TNF WT und die TNF-Mutanten wurden wie in Abb. 5. 30 erhalten. Zellüberstände aus HEK293-Kontroll-Transfektanten wurden als Negativkontrolle eingesetzt (Ø TNF). Die Zellen wurden geerntet, mit 0,2 µg/mL PI inkubiert und am FACS gemessen. Das Balkendiagramm zeigt die % PI-positiver Zellen, die aufgrund der MFI-Werte für PI durch Setzen eines *Gates* erhalten wurden (s. Abb. 5. 6 B). Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Abb. 5. 32 zeigt, dass die Mutation R32K auch einen starken Einfluss auf die Induktion des Zelltods durch TNF nimmt. Während durch Inkubation mit wildtyp TNF ca. 10 % tote Zellen erhalten wurden, waren es für TNF(R32K) und TNF(R6/32KK) nur ca. 4 %. Der Kontrollansatz, der ohne TNF inkubiert wurde, wies 2 % tote Zellen auf. Somit blockiert die R32K-Mutation den TNF-induzierten Zelltod weitgehend, aber nicht vollständig (vergleiche dagegen die vollständige Blockade der detektierbaren

TNF-Oberflächenbindung an KIT225-Zellen durch dieselbe Mutation). Die Mutationen R6K und R31K zeigten dagegen keinen Einfluss auf den TNF-induzierten Zelltod.

Einfluss der TNF-Mutationen auf die CD62L-Oberflächenexpression von Granulozyten

Als weiterer Funktionstest wurde der Einfluss der Mutationen auf das TNF-induzierte *Shedding* von CD62L auf Granulozyten wie in Abb. 5. 10 beschrieben untersucht.

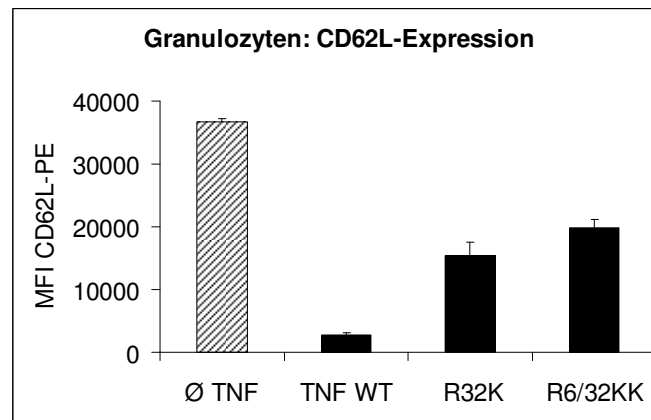


Abb. 5. 33 Einfluss der Mutationen im TNF auf die TNF-induzierte Abnahme der CD62L-Oberflächenexpression auf Granulozyten: Je 100 µL humanes Vollblut wurden mit 1 ng/mL (schwarze Balken) verschiedener TNF-Varianten (TNF WT; TNF(R32K); TNF(R6/32KK)) 1 h bei 37 °C unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. TNF WT und die TNF-Mutanten wurden wie in Abb. 5. 30 erhalten. Zellüberstände aus HEK293-Kontroll-Transfektanten wurden als Negativkontrolle eingesetzt (Ø TNF). Anschließend wurden die Proben mit einem monoklonalen, PE-konjugierten Maus-anti-CD62L-Ak (1:5) für 30 min bei 4°C gefärbt. Die Erythrozyten wurden unter gleichzeitiger Fixierung der Proben lysiert (Fix/Lyse Puffer von BD) und nach Waschen mit PBS wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die PBL-Subpopulationen wurden anhand ihrer *Scatter*-Eigenschaften (s. Abb. 5. 9) voneinander unterschieden und getrennt analysiert. Die Balkendiagramme zeigen die MFI-Werte für CD62L von Granulozyten für die einzelnen TNF-Ansätze. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Abb. 5. 33 zeigt die Wirkung der Mutanten auf das CD62L-*Shedding* von Granulozyten. Wildtyp TNF bewirkt eine starke Abspaltung von CD62L, die im Vergleich bei beiden TNF-Mutanten, bei denen R32 zu Lysin mutiert wurde, deutlich reduziert ist. Die Mutation hebt die Fähigkeit, das *Shedding* von CD62L zu induzieren, teilweise, aber nicht vollständig auf (vgl. schwarze mit gestreiftem Balken).

Die Mutation von R32 zu Lysin, welche die ADP-Ribosylierung an dieser Stelle unmöglich macht, sollte zur Klärung der Frage dienen, ob die Modifikation an dieser Stelle ausreicht, um die Hemmung der TNF-Wirkung durch ADP-Ribosylierung zu erklären, oder ob weitere Modifikationen an zusätzlichen Stellen mit zu dieser Wirkung beitragen. Für die Oberflächenbindung sowie für die Induktion des Zelltodes an KIT225-Zellen hatte jedoch diese (konservative) Mutation bereits zu einem völligen Wirkungsverlust des mutierten TNFs geführt. Dies war im Fall der Induktion des CD62L-*Sheddings* anders. Hier zeigten die beiden Mutanten R32K und R6/32KK einen zwar abgeschwächten, aber dennoch deutlich sichtbaren induzierenden Effekt.

Daher wurde in einem folgenden Experiment untersucht, ob die ADP-Ribosylierung dieser Mutanten zu einem zusätzlichen Wirkungsverlust führte. Dazu wurden Wildtyp TNF und die Mutanten TNF(R6K) und TNF(R6/32KK) aus den Überständen von entsprechenden HEK293-Transfektanten über Nacht mit 50 ng/mL löslicher ART1 und 1 mM NAD ADP-ribosyliert (s. Abschnitt 4.4.3). Zur Kontrolle wurden unmodifizierte Überstände eingesetzt.

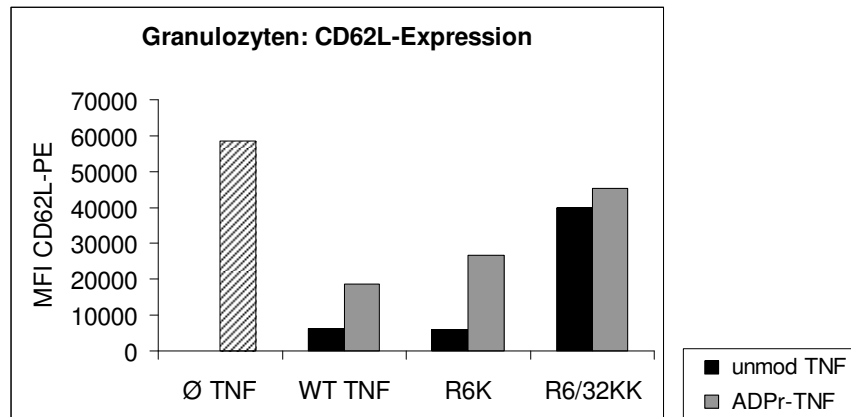


Abb. 5. 34 Einfluss der ADP-Ribosylierung der TNF-Mutanten auf die TNF-induzierte Abnahme der CD62L-Oberflächenexpression auf Granulozyten: Die PBLs wurden wie in Abb. 5. 33 mit verschiedenen TNF-Varianten aus HEK293-Zellüberständen behandelt, für CD62L angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Hier wurden TNF WT, TNF(R6K) und TNF(R6/32KK) eingesetzt (je 1 ng/mL), die durch 1h-Inkubation bei 4 °C mit 50 ng/mL ART1 und 1 mM NAD ADP-ribosyliert wurden (graue Balken). Parallel wurden die unmodifizierten TNF-Zellüberstände eingesetzt (schwarze Balken).

Die Ergebnisse der Abb. 5. 34 zeigen, dass die ADP-Ribosylierung von Wildtyp TNF und der R6K Mutante jeweils zu einer deutlichen Abschwächung des CD62L-*Sheddings* führen. Im Gegensatz dazu bewirkt die ADP-Ribosylierung der Doppelmutante R6/32KK keine nennenswerte zusätzliche Hemmung des CD62L-*Sheddings*. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die ADP-Ribosylierung von TNF an anderen Stellen als R6 und R32 keine Auswirkung auf das TNF-induzierte CD62L-*Shedding* hat, und dass, zumindest für die Induktion des CD62L-*Sheddings*, die Modifikation an der Stelle R32 notwendig und ausreichend für die Hemmung der TNF-Wirkung ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass das Arginin an Position 32 eine entscheidende Wirkung für die Funktion des TNFs hat. Selbst die sehr konservative Mutation von Arginin zu Lysin an dieser Position bewirkt einen fast völligen Verlust der messbaren Bindung an die Oberfläche von KIT225-Zellen, und ebenso eine fast vollständige Hemmung der Induktion des Zelltods in dieser Zelllinie. Nur in Bezug auf das TNF-induzierte *Shedding* von CD62L auf Granulozyten konnte eine noch messbare, wenn auch reduzierte, biologische Wirksamkeit der TNF(R6/32KK)-Mutante gezeigt werden. Die Ausschaltung von R6 als ADP-Ribosylierungsstelle durch Mutation zu Lysin hatte keinen Einfluss auf die Sensitivität des TNF gegenüber der ADP-Ribosylierung, und zeigte somit, dass die Modifikation an dieser Stelle für die

Wirksamkeit des TNF keine Bedeutung hat. Demgegenüber bewirkte die zusätzliche Ausschaltung von R32 als ADP-Ribosylierungsstelle in der R6/32KK-Doppelmutante einen fast vollständigen Verlust der Sensitivität der Mutante gegenüber der ADP-Ribosylierung, und zeigte damit, dass die Modifikation an dieser Position entscheidend für den Verlust der TNF-Wirkung ist.

5.2.4 Hinweise auf eine weitere ADP-Ribosylierungsstelle im TNF-Molekül

Wie die unter Abschnitt 5.2.2 durchgeführten TNF-Mutationsanalysen gezeigt hatten, kann neben den massenspektrometrisch identifizierten Ziel-Argininen R6 und R32 mindestens ein weiteres Arginin im TNF von ART1 ADP-ribosyliert werden. Durch den Einsatz weiterer TNF-Mutanten, die von Mareike Pilz aus unserem Institut im Rahmen ihrer Doktorarbeit hergestellt wurden, haben sich zufällig Hinweise auf die mögliche Identität eines zusätzlichen Ziel-Arginins ergeben.

Im Rahmen eines Versuches, bei dem überprüft werden sollte, ob die Konzentration von ADP-ribosyliertem TNF im ELISA bestimmt werden kann, wurden die beiden Antikörper eines TNF-spezifischen ELISAs (Immunotools) eingesetzt, um zellständiges TNF nach ADP-Ribosylierung durchflusszytometrisch nachzuweisen. Dazu wurden HEK293-Zellen mit ART1 und TNF ko-transfiziert und mit unterschiedlichen Konzentrationen NAD oder ohne NAD inkubiert. Die Zellen wurden jeweils mit den ELISA-Antikörpern („Coating“-Antikörper und biotinylierter „Detektions“-Antikörper, beide aus der Maus) und dem PE-konjugierten Sekundärantikörper bzw. PE-konjugiertem Streptavidin angefärbt.

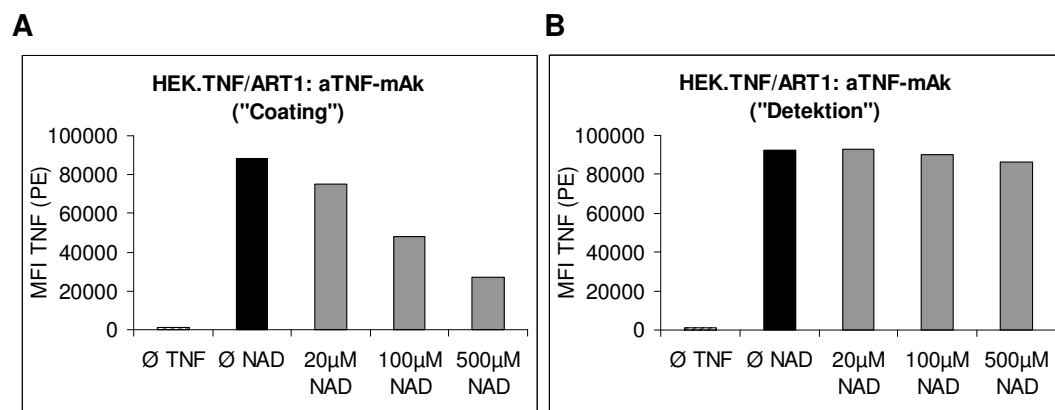


Abb. 5. 35 Erkennung von ADP-ribosyliertem TNF auf der HEK293-Oberfläche durch zwei verschiedene monoklonale anti-TNF-Antikörper: HEK293-Zellen wurden mittels des JetPEI™ Transfektions-Systems mit ART1 und WT TNF ko-transfiziert (je 2,5 µg DNA). 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. Je 10⁶ HEK293-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen NAD (20, 100, 500 µM; graue Balken) oder ohne NAD (schwarze Balken) für 30 min bei 37 °C inkubiert und gewaschen. Die Zellen wurden **A**) mit einem monoklonalen Maus-anti-TNF-Ak (1:100) und einem PE-konjugierten Esel-anti-Maus-Ak (1:100) bzw. **B**) mit einem monoklonalen biotinylierten Maus-anti-TNF-Ak und PE-konjugiertem Streptavidin

angefärbt. Untransfizierte Zellen wurden zur Kontrolle mit den Antikörpern gefärbt. Die Analyse schließt tote Zellen aus. Die Balkendiagramme zeigen die MFI-Werte von TNF.

Die Ergebnisse der Abb. 5. 35 zeigen, dass die Bindung des „Coating“-Antikörpers durch die ADP-Ribosylierung des TNF deutlich beeinträchtigt wurde (Diagramm A), während die Bindung der „Detektions“-Antikörpers keine Veränderung in der Oberflächenexpression des TNF nach und vor ADP-Ribosylierung des TNF aufwies (Abb. 5. 35, Diagramm B).

Beide ELISA-Antikörper wurden auch auf ihre Fähigkeit die TNF(R6/32KK)-Mutante auf der Oberfläche von HEK293.ART1/TNF-Transfektanten vor und nach ADP-Ribosylierung zu binden, getestet. Es zeigte sich, dass auch durch Wegnahme der beiden massenspektrometrisch identifizierten Ziel-Arginine (R6 und R32), der „Coating“-Antikörper noch sensitiv auf die ADP-Ribosylierung reagierte (Abb. 5. 36, Diagramm A), was das Vorhandensein weiterer ADP-Ribosylierungsstellen im TNF bestätigte.

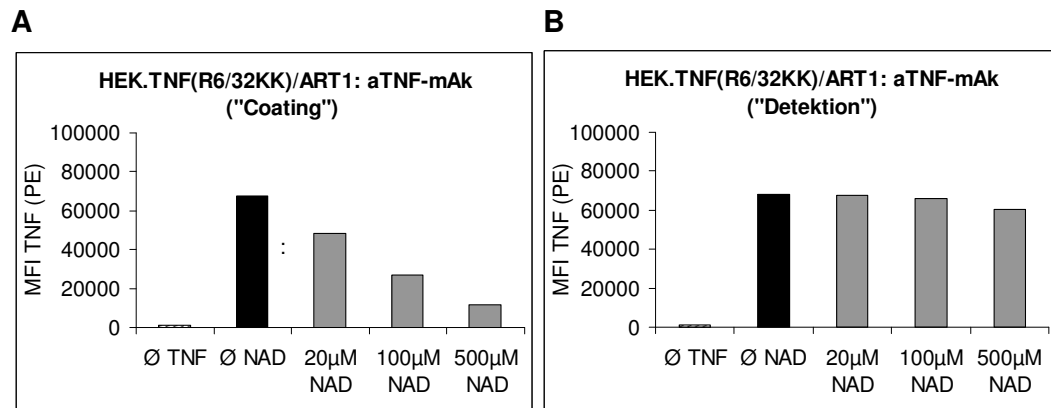


Abb. 5. 36 Erkennung von ADP-ribosylierter TNF(R6/32KK)-Mutante auf der HEK293-Oberfläche durch zwei verschiedene monoklonale anti-TNF-Antikörper: HEK293-Zellen wurden mit der TNF(R6/32KK)-Mutante und ART1 ko-transfiziert (je 2,5 µg DNA) und wie unter Abb. 5. 35 beschrieben behandelt.

Die beiden ELISA-Antikörper wurden auch auf ihre Erkennung verschiedener TNF-Mutanten untersucht. Dazu wurden die TNF-Einzelmutanten R6K, R31K, R32K, R44K, R131K und die Doppelmutante R6/32KK einzeln in HEK293-Zellen transfiziert und die Zellen wurden mit den beiden ELISA-Antikörpern und dem PE-konjugierten Sekundärantikörper bzw. PE-konjugiertem Streptavidin angefärbt. Zur Kontrolle wurden untransfizierte HEK293-Zellen und mit dem TNF WT transfizierte HEK293-Zellen untersucht.

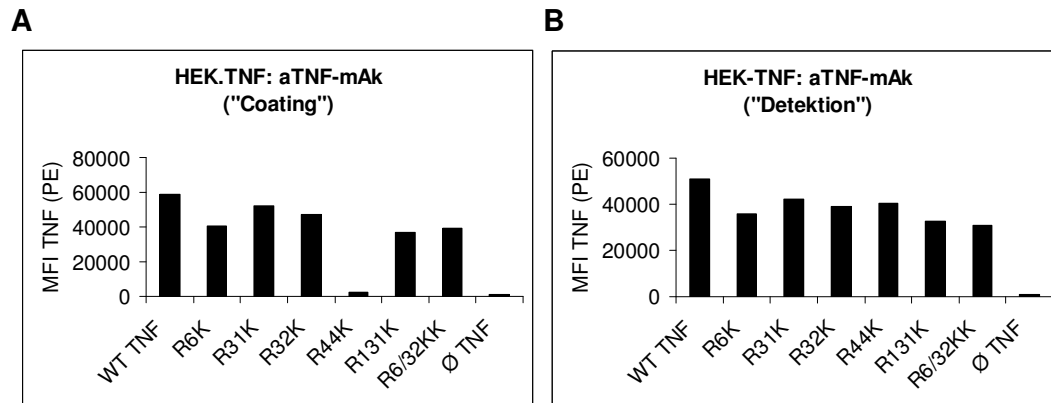


Abb. 5. 37 Erkennung verschiedener TNF-Mutanten auf der HEK293-Oberfläche durch zwei verschiedene monoklonale anti-TNF-Antikörper: HEK293-Zellen wurden mittels des JetPEI™ Transfektions-Systems mit den verschiedenen TNF-Mutanten oder TNF WT bzw. mit einem Kontrollkonstrukt (je 5 µg DNA) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. Je 10⁶ HEK293-Zellen wurden **A**) mit einem monoklonalen Maus-anti-TNF-Ak (1:100) und einem PE-konjugierten Esel-anti-Maus-Ak (1:100) bzw. **B**) mit einem monoklonalen biotinylierten Maus-anti-TNF-Ak und PE-konjugiertem Streptavidin angefärbt. Die Analyse schließt tote Zellen aus. Die Balkendiagramme zeigen die MFI-Werte von TNF.

Hierbei ergab sich, dass die Mutante TNF(R44K) nicht vom „Coating“-Antikörper erkannt wurde (Abb. 5. 37, Diagramm A), während die Anfärbung mit dem „Detektions“-Antikörper zeigte, dass diese Mutante auf der Oberfläche exprimiert wurde (Diagramm B). Alle anderen Mutanten wurden von beiden Antikörpern ähnlich gut erkannt.

Der „Coating“-Antikörper erkennt demzufolge im TNF ein Epitop in der Nähe vom Arginin 44. Zusammen mit den Ergebnissen zur Bindung des Antikörpers an ADP-ribosyliertes wildtyp TNF bzw. an die TNF(R6/32KK) Mutante ergibt sich die Hypothese, dass R44 (oder ein räumlich in der Nähe gelegenes Arginin wie R131) eine weitere ADP-Ribosylierungsstelle darstellt (s. Diskussion, Abschnitt 6.3).

6. Diskussion

Das Zytokin TNF spielt eine Schlüsselrolle in einer Vielzahl immunologischer Prozesse und ist von großem therapeutischem Interesse. Die Mechanismen, mit denen die Wirkungen von TNF reguliert werden sind Gegenstand intensiver Untersuchungen. Dazu gehören z.B. die regulierte Freisetzung von TNF von der Zelloberfläche, das *Shedding* der beiden TNFR, sowie die Regulation der mRNA-Stabilität [49, 63, 155]. Posttranslationale Modifikationen (PTMs), die eine entscheidende Rolle bei der Steuerung der biologischen Aktivität einer Vielzahl von Proteinen spielen, wurden für TNF bisher nur in der unprozessierten, membranständigen Form gezeigt: in der intrazellulären Domäne wird TNF mit bisher unbekannten Auswirkungen palmitoyliert und phosphoryliert [47, 48, 156]. Bisher gibt es keine Hinweise auf PTMs von TNF in löslicher Form.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Domäne des TNF, sowohl in löslicher als auch membranständiger Form, durch die Arginin-spezifische ART1 ADP-ribosyliert werden kann (Abb. 5. 1) und die funktionellen und strukturellen Auswirkungen dieser Modifikation wurden charakterisiert.

6.1 Der Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die TNFR-Bindung

Da der Einbau einer ADP-Ribose-Gruppe eine große lokale Veränderung in Bezug auf Masse und Ladung bedeutet, war es eine nahe liegende Hypothese, dass die ADP-Ribosylierung von TNF die Bindung an einen oder beiden der Rezeptoren beeinträchtigt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Bindungsstudien an verschiedenen experimentellen Systemen durchgeführt. Im Verlauf dieser Studien stellte sich heraus, dass die Auswirkungen der ADP-Ribosylierung auf die Bindung je nach dem Kontext der Interaktion zwischen TNF und seinen Rezeptoren sehr unterschiedlich sein konnten. Insgesamt wurde die Bindung in vier experimentellen Systemen untersucht, von denen zwei rekombinante TNFR-Fc-Fusionsproteine in unterschiedlichen Konfigurationen als Bindungspartner verwendeten, und zwei die Bindung an TNFRs auf der Oberfläche von Zellen untersuchten. Im Einzelnen wurden folgende Systeme untersucht:

1. lösliches TNF - immobilisiertes TNFR-Fc (*surface plasmon resonance*, SPR)
2. membranständiges TNF - lösliches TNFR-Fc
3. lösliches TNF - membranständige TNFRs (KIT-Zellen)
4. lösliches TNF - membranständige TNFRs (transfizierte HEK-Zellen)

6.1.1 Interaktion von TNF mit rekombinanten TNFR-Fc-Fusionsproteinen

Eine sensitive und quantitative Methode, die Bindung von Rezeptor und Ligand zu untersuchen, stellt die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (*surface-plasmon-resonance*; SPR) Spektroskopie dar. Diese Methode wurde eingesetzt mit dem Ziel, den Effekt der ADP-Ribosylierung auf die Bindung von TNF an seinen beiden Rezeptoren einzeln möglichst quantitativ erfassen zu können.

Die Bindungskurven für unmodifiziertes TNF zeigen für beide Rezeptoren eine ähnliche Kinetik der Assoziation (Steilheit des Anstiegs), aber für TNFR2 eine deutlich schnellere Dissoziation als für TNFR1 (schnellerer Abfall der Kurven nach der Bindung) (s. Abb. 5. 5). Anhand der unter Annahme eines 1:1-Bindungsmodell berechneten Werte für die Assoziationsraten (k_a) und Dissoziationsraten (k_d) wird dieser Effekt ebenso sichtbar (s. Tabelle 5. 1). Die Ergebnisse stehen im Einklang mit ähnlichen Untersuchungen von Shibata *et al.*, die vergleichbare Werte für die Assoziations- und Dissoziationskinetiken von TNF an beide TNFR angeführt hatten [157]. Nur für die Dissoziationsrate von TNF und dem TNFR1 weicht der hier bestimmte Wert deutlich von dem von Shibata *et al.* ermittelten Wert ab, wofür es bisher keine greifbare Erklärung gibt.

Die Bindungskurven für das ADP-ribosylierte TNF zeigen eine deutlich reduzierte Affinität zu beiden Rezeptoren im Vergleich zum unmodifiziertem TNF, damit bestätigten die SPR-Untersuchungen die Hypothese, dass die ADP-Ribosylierung die Bindung von TNF an seine Rezeptoren hemmt (Abb. 5. 5). Die berechneten Werte für die Dissoziationsgleichgewichtskonstante (K_D) zeigen, dass der Einfluss der ADP-Ribosylierung auf den TNFR2 (ca. 20-fache Abnahme der Affinität) stärker war als auf den TNFR1 (ca. sechsfache Abnahme der Affinität) (s. Tabelle 5. 1). In einer weiteren Biacore Messung wurden zwar unterschiedliche Absolutwerte für die Dissoziationskonstanten erhalten, das Verhältnis der K_D -Werte von unmodifiziertem vs. ADP-ribosyliertem TNF blieb aber für beide TNFR ähnlich, und bestätigte, dass die ADP-Ribosylierung in diesem System die Bindung an den TNFR2 stärker beeinflusst als an den TNFR1.

Die für das ADP-ribosylierte TNF erhaltenen Absolutwerte sind jedoch unter Vorbehalt zu betrachten, da unbekannt ist, wie vollständig die ADP-Ribosylierung war. Da es mindestens drei Modifikationsstellen im TNF gibt, ist es wahrscheinlich, dass die Probe eine Mischung aus gar nicht bis dreifach modifizierten TNF-Molekülen darstellt. Da darüber hinaus TNF unter physiologischen Bedingungen als Trimer vorkommt und an seinen Rezeptor bindet, ist es denkbar, dass die einzelnen Monomere dieses Trimers unterschiedlich stark ADP-ribosyliert sein können. Bei sehr niedrigen Konzentrationen (sub-nanomolar) zerfällt TNF in seine Monomere [46]. Es ist denkbar, dass auch die ADP-Ribosylierung die Monomerisierung bzw. Trimerisierung beeinflussen könnte. Dagegen liegen die TNFR-Fc-Fusionsproteine als Dimere vor, und es ist daher unklar, mit welcher Stöchiometrie die Bindung von TNF an seine Rezeptoren in diesem System gemessen wird. Ohne genaue Kenntnis der Stöchiometrie der Interaktion ist jedoch

weder eine zuverlässige Quantifizierung noch eine Aussage über die physiologische Relevanz der gemessenen Werte möglich.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse der SPR-Untersuchungen, dass die ADP-Ribosylierung die Bindung an beide TNF-Rezeptoren beeinflussen kann, dass aber die Hemmung der Bindung an TNFR2 stärker ist als an TNFR1.

Dieses Ergebnis wurde auch in einem anderen System bestätigt, bei dem die Bindung von TNF an TNFR-Fc-Fusionsproteine untersucht wurde. In diesem Fall wurden HEK293-Zellen mit TNF und ART1 ko-transfiziert, und durch Zugabe von NAD wurde das auf der Zelloberfläche befindliche TNF ADP-ribosyliert. Die Bindung der löslichen TNFR-Fc-Fusionsproteine an das membrangebundene TNF wurde gemessen. In diesem System führte die ADP-Ribosylierung von TNF zu einer Hemmung der Bindung an TNFR2-Fc, nicht jedoch an TNFR1-Fc (Abb. 5. 15).

Obwohl in diesem Experiment für die ADP-Ribosylierung eine hohe NAD-Konzentration (500 μ M) eingesetzt wurde, wurde unter diesen Bedingungen nur eine partielle Blockade der Bindung an TNFR2 und keine Blockade der Bindung an den TNFR1 erzielt. Dies steht im Gegensatz zu der Bindung von prä-ADP-ribosyliertem TNF an die immobilisierten TNFR-Fc-Proteine in der SPR (Abb. 5. 5). Der Unterschied kann daran liegen, dass die ADP-Ribosylierung auf der Zelloberfläche weniger effizient abläuft als die Modifikation in Lösung (s. Abschnitt 6.5).

Insgesamt zeigten die Bindungsstudien mit TNFR-Fc-Fusionsproteinen eine deutlich hemmende Wirkung der ADP-Ribosylierung auf die Bindung von TNF an TNFR2, und je nach Kontext eine schwächere oder keine Wirkung auf die Bindung an TNFR1. Da die Expression als rekombinante Fusionsproteine jedoch die Rezeptoren in eine unphysiologische Konformation zwingen, ist die Übertragbarkeit dieser Beobachtungen auf die Bindung von TNF an seine Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen unklar.

6.1.2 TNF-Oberflächenbindung an KIT225-Zellen

Wegen der Interpretationsprobleme aufgrund der unklaren stöchiometrischen Verhältnisse bei der Bindung von TNF an die TNFR-Fc-Fusionsproteine wurde die Bindung zusätzlich in einem „natürlichen“ System gemessen, in dem die TNF-Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen exprimiert wurden. Als Modellsystem wurde die humane T-Lymphomzelllinie KIT225 [148] eingesetzt. Diese Zelllinie exprimiert auf ihrer Oberfläche beide TNFRs, wobei die Expressionsdichte von TNFR2 sehr viel höher ist als die von TNFR1 (Abb. 5. 2). Nach Inkubation mit löslichem TNF konnte seine Bindung an die Zelloberfläche mit Hilfe eines polyklonalen Ziege-anti-TNF-Serums in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (Abb. 5. 3). Die in diesem System detektierbare Bindung ist fast ausschließlich auf Bindung an den TNFR2 zurückzuführen (Abb. 5. 16).

Die ADP-Ribosylierung von TNF bewirkte mit zunehmendem ADP-Ribosylierungsgrad eine sukzessive Abnahme der Oberflächenbindung (Abb. 5. 4). Diese Abnahme war nicht auf einen Verlust der Bindung des anti-TNF-Antiserums an TNF nach der ADP-Ribosylierung zurückzuführen, da dasselbe Antiserum ADP-ribosyliertes TNF auf der Oberfläche von mit TNFR2 transfizierten HEK293-Zellen erkannte (s. Abb. 5. 14, Diagramme C und D). Der Einfluss der ADP-Ribosylierung auf die (TNFR2-vermittelte) Bindung an KIT225-Zellen war größer, als auf die Bindung des TNFR2-Fc-Fusionsprotein an membranständig modifiziertes TNF (vgl. Abb. 5. 4 und Abb. 5. 15, Diagramm B). Zum einen könnte der Grund hierfür in einer weniger effizienten ADP-Ribosylierung des TNF auf der Zelloberfläche liegen. Zum anderen ist es wahrscheinlich, dass Unterschiede in der Konformation und/oder Stöchiometrie zwischen dem zwangsdimerisierten TNFR2-Fc-Fusionsprotein und dem endogen exprimierten TNFR2 auf den KIT225-Zellen den Bindungskontakt zum TNF verändern.

Insgesamt zeigen die Bindungsstudien auf KIT225-Zellen eine deutliche dosisabhängige Hemmung der Bindung von TNF an TNFR2 durch ADP-Ribosylierung.

6.1.3 TNF-Oberflächenbindung an TNFR-transfizierte HEK293-Zellen

Um ein differenziertes Bild über den Effekt der ADP-Ribosylierung auf die Bindung an die einzelnen TNF-Rezeptoren auf Zelloberflächen zu erhalten, wurde jeder der beiden Rezeptoren auf der Oberfläche von HEK293-Zellen exprimiert. Für die TNFRs wurden Expressionskonstrukte verwendet, bei denen die transmembran- und die zytoplasmatische Domänen durch entsprechende heterologe Domänen ersetzt worden waren, die keine Signale ins Zellinnere vermitteln konnten.

Nach Inkubation mit löslichem TNF (prä-ADP-ribosyliert oder unmodifiziert) wurde seine Bindung an die Zelloberfläche mit Hilfe des polyklonalen Ziege-anti-TNF-Serums in der Durchflusszytometrie detektiert. Erstaunlicherweise war die TNF-Bindung auf TNFR2-transfizierten HEK293-Zellen viel resistenter gegen die ADP-Ribosylierung (Abb. 5. 14, Diagramm C) als die Bindung auf die ebenfalls TNFR2-vermittelte Bindung an KIT225-Zellen (s. Abb. 5. 4). Bei letzteren bewirkte die ADP-Ribosylierung von TNF einen Rückgang der detektierbaren Bindung auf ca. 10% des Ausgangswertes. Im Vergleich dazu wurde die Bindung an HEK293.TNFR2-Zellen nur schwach (auf ca. 50 bzw. 60 % des Ausgangswertes) gehemmt (Abb. 5. 14, Diagramm F) (vgl. auch die Bindungsstudien mit der TNF(R32K)-Mutante, Abschnitt 5.2.3).

Die Gründe für diese Unterschiede sind unklar. Die Deletion der zytoplasmatischen Domäne im TNFR2 konnte als Ursache ausgeschlossen werden, da HEK293-Zellen, die mit dem nativen Voll-Längen-TNFR2-Expressionskonstrukt transfiziert waren, sich ähnlich verhielten (Abb. 5. 14, Diagramm D). Es ist eher zu vermuten, dass sich die Konformation des Rezeptors in den zwei verschiedenen Kontexten unterscheidet (nach Überexpression in HEK293 Nierenzellen oder endogen exprimiert in KIT225

Lymphomzellen). Die unterschiedlichen Zellsysteme könnten sich z.B. darin unterscheiden, ob und inwieweit die TNF-Rezeptoren in spezielle Membran-Mikrodomänen (sog. *lipid rafts*) rekrutiert sind. Für den TNFR1 wurde gezeigt, dass der Rezeptor in verschiedenen Zellarten unterschiedlich in *lipid rafts* rekrutiert wird, und dass die Rekrutierung für die Auslösung von TNF-Wirkungen wie die NF- κ B-Aktivierung oder den Zelltod notwendig ist [158].

Im Gegensatz zu den TNFR2-transfizierten HEK293-Zellen bewirkte bei TNFR1-transfizierten HEK293-Zellen erstaunlicherweise bereits die ADP-Ribosylierung von TNF mit niedrigen NAD-Konzentrationen eine starke Verminderung der TNF-Bindung (Abb. 5. 14, Diagramm F), obwohl die Bindung von TNFR1-Fc durch die ADP-Ribosylierung von membranständigem TNF auf HEK293-Zellen nicht beeinflusst wurde, die Bindung von TNFR2-Fc aber schon (vgl. Abb. 5. 15, Diagramme A und B). Damit wird in der ersten Studie die Bindung an TNFR1, in der zweiten die Bindung an TNFR2 stärker gehemmt. Es ist anzunehmen, dass diese gegensätzlichen Wirkungen auf die Rezeptorselektivität einerseits auf Unterschiede in der Geometrie der Rezeptor-Liganden-Interaktion in den beiden Situationen, sowie möglicherweise auf eine andere Auswahl der ART1-Ziel-Arginine bei löslicher vs. Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung zurückzuführen sind.

Werden zusätzlich die Daten der SPR-Untersuchungen hinzugezogen (s. oben) weisen die Ergebnisse insgesamt darauf hin, dass sich die unterschiedlichen Bindungsassays wahrscheinlich nicht miteinander vergleichen lassen. Die Assays unterscheiden sich sowohl bezüglich der Stöchiometrie als auch bezüglich der Konformation der TNFR. Auf der Zelloberfläche exprimierte TNFRs liegen bereits vor der TNF-Bindung durch ihre PLAD (*pre-ligand assembly domain*) in einem unbekannten stöchiometrischen Verhältnis prä-assoziiert vor [58], und binden ihren Liganden als Trimere. Die bei den SPR-Untersuchungen bzw. den Bindungsstudien auf HEK293.TNF/ART1-Transfektanten eingesetzten TNFR-Fc-Fusionsproteine liegen als Disulfid-Brücken-verknüpfte Dimere vor, und es ist unbekannt, mit welcher Stöchiometrie sie ihren Liganden binden. Es ist daher denkbar, dass in den verschiedenen Situationen jeweils unterschiedliche Seitenketten des TNF den Kontakt zu dem jeweiligen TNFR vermitteln, und dass daher die ADP-Ribosylierung einer bestimmten Seitenkette in den verschiedenen Rezeptor-Ligand-Konformationen unterschiedliche Auswirkungen hat.

6.1.4 Zusammenfassung der Bindungsstudien

In der Tabelle 6. 1 werden die Ergebnisse zur Bindung von ADP-ribosyliertem TNF und der TNF(R32K)-Mutante an den TNFR1 und den TNFR2 zusammengefasst. Die ADP-Ribosylierung hat in den meisten, aber nicht in allen untersuchten Konstellationen der Interaktion zwischen TNF und seinen Rezeptoren einen Einfluss auf die Bindungsstärke. Die Größe dieses Einflusses ist aber je nach Konstellation

unterschiedlich stark, und lässt sich auch nicht der Bindung an einen der beiden Rezeptoren zuordnen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Bindungsverhalten des TNF zu den TNFR wesentlich durch die Konformation und/oder die Stöchiometrie der TNFR beeinflusst wird, die sich aus der Versuchsanordnung (TNFR-Fc-Fusionsprotein, transfizierter Rezeptor, endogen exprimierter Rezeptor) oder der Zellart (KIT225 vs. HEK293) ergibt.

Tabelle 6. 1 Hemmender Effekt der ADP-Ribosylierung auf die Bindung von TNF an seine Rezeptoren in unterschiedlichen Systemen

Bindung an:	TNFR-Fc (SPR-Chip)	TNFR-Fc (löslich)	KIT225	HEK293. TNFR
TNFR1	+	Ø	nicht bestimmbar	+++
TNFR2	+++	+	+++	+

+++ starker Effekt + leichter Effekt Ø kein Effekt

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass konformationelle Veränderungen von TNF wie die ADP-Ribosylierung häufig keine eindeutige Rezeptorselektivität aufweisen, sondern dass ihre Wirkung vom Kontext der Begegnung zwischen TNF und seinen Rezeptoren abhängt. Diese Hypothese wird durch Bindungsstudien mit TNF-Mutanten weiter unterstützt (s. Abschnitt 6.4). Insbesondere legen die Ergebnisse nahe, dass Studien, die die Rezeptorselektivität von TNF-Mutanten vor allem anhand von SPR-Messungen an immobilisierten TNFR-Fc-Fusionsproteinen belegen, kritisch zu betrachten sind.

6.2 Die funktionellen Konsequenzen der ADP-Ribosylierung von TNF

Die im vorigen Abschnitt diskutierten Bindungsstudien haben gezeigt, dass die ADP-Ribosylierung die Affinität des TNF zu seinen Rezeptoren in unterschiedlichen Zellsystemen unterschiedlich stark beeinflussen kann. Ergänzend wurden Experimente durchgeführt, um den Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf seine biologischen Funktionen zu untersuchen. Dass das Einbringen der relativ großen ADP-Ribosegruppe in Zielproteine nicht ohne Auswirkung auf die Funktion der Proteine bleibt, wurde vielfach für andere Zielproteine der ARTs, wie beispielsweise für die Integrine LFA-1 und Integrin $\alpha 7$, das Defensin HNP-1 oder den purinergeren Membranrezeptor P2X7 gezeigt [128, 130, 136, 159]. Um eventuelle immun-modulatorische Funktionen der ADP-Ribosylierung von TNF aufzuklären, wurden unterschiedliche biologische

Wirkungen des TNF auf Zielzellen untersucht. Gegenüber den Bindungsassays bieten die Aktivitätsassays zusätzlich den experimentellen Vorteil, dass sie unabhängig von eventuellen Änderungen der Antikörper-Affinität zum TNF infolge der ADP-Ribosylierung sind.

6.2.1 Auswirkung der ADP-Ribosylierung auf TNF Effektorfunktionen

Der Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf seine biologische Wirkung wurde zunächst in Hinblick auf die TNF-vermittelte Zytotoxizität untersucht. Der TNF-induzierte Zelltod kann, wie in der Einleitung beschrieben, durch jeden einzelnen der beiden TNFR, als auch durch beide TNFR gemeinsam vermittelt werden. Da untransfizierte HEK293-Zellen keine Oberflächenbindung von TNF aufwiesen (Abb. 5. 14, Diagramm E), erschien diese Zelllinie zunächst geeignet, durch die Einbringung von TNFR1 oder TNFR2 den Einfluss der ADP-Ribosylierung auf die TNF-induzierte Zytotoxizität für die beiden TNFR differenziert zu untersuchen. Jedoch konnte weder in den mit TNFR1 oder TNFR2 einzeln transfizierten, noch in den mit beiden TNFR kointransfizierten HEK293-Zellen der Zelltod durch Inkubation mit rekombinantem TNF ausgelöst werden (nicht gezeigt). Obwohl TNF ursprünglich durch seine Fähigkeit, in Tumorzellen den Zelltod auszulösen, identifiziert wurde [2], wirkt es nur auf wenige Tumorzelllinien zytotoxisch. Die meisten Zelllinien sind insensitive bezüglich des TNF-induzierten Zelltodes, obwohl die TNFRs auf diesen Zellen exprimiert werden [2, 160]. Wie in der Einleitung beschrieben, überlagert in den meisten Fällen die TNF-induzierte NF- κ B-Aktivierung, die zur Proteinsynthese verschiedener anti-apoptotischer und anti-nekrotischer Faktoren führt, den TNF-induzierten Zelltod.

Untersuchungen an KIT225-Zellen zeigten, dass diese Zelllinie sensitiv auf den TNF-induzierten Zelltod reagierte (Abb. 5. 6), obwohl eine andere Arbeitsgruppe gegenteilige Befunde für die KIT225-Zellen publiziert hatte [161]. Bei der T-Lymphomzelllinie KIT225 handelt es sich um eine IL-2-wachstumsabhängige Zelllinie [148]. Eigene Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass der TNF-vermittelte Zelltod nur in IL-2 freiem Zellkulturmedium effektiv induziert wurde (nicht gezeigt), dagegen hatten Higuchi *et al.* die TNF-Zytotoxizitäts-Analysen unter Anwesenheit von IL-2 durchgeführt. Da der Entzug von IL-2 bei KIT225-Zellen zu einem veränderten Status im Zellzyklus führt [162], und die Anfälligkeit für die TNF-vermittelte Zytotoxizität durch den Zellstatus beeinflusst wird [163], könnten die Unterschiede in den Ergebnissen bezüglich des TNF-induzierten Zelltodes von KIT225-Zellen damit erklärt werden.

Die Prä-ADP-Ribosylierung von TNF durch ART1 zeigte einen eindeutigen, schützenden Effekt vor dem TNF-induzierten Zelltod auf die KIT225-Zellen (Abb. 5. 7). Bereits die ADP-Ribosylierung von TNF mit niedriger NAD-Konzentration (4 μ M)

zeigte eine deutlich reduzierte Zytotoxizität des TNF, die mit steigendem Modifikationsgrad weiter reduziert wurde und bei hoher NAD-Konzentration (500 μ M) zu einer beinahe vollständigen Aufhebung des zytotoxischen Effekts des TNF führte.

Einfluss der ADP-Ribosylierung auf die TNF-induzierte Aktivierung peripherer Blutleukozyten

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF auf die Aktivierung peripherer Blutleukozyten (PBL) untersucht. Besonders die TNF-induzierte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten ist für die Entstehung autoimmunologischer Gefäßentzündungen (Vaskulitiden) von klinischer Relevanz. Granulozyten werden bereits durch niedrige TNF-Konzentrationen aktiviert (sog. *Priming*) und exprimieren Auto-Antigene, die im unstimulierten Zustand der Granulozyten in intrazellulären Vesikeln gespeichert sind, auf der Zelloberfläche. Die Bindung dieser Auto-Antigene, wie z.B. der Proteinase-3, durch im Serum vorhandene Auto-Antikörper (ANCA = *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*) führt zur vollen Aktivierung der Zellen und der Freisetzung von Entzündungsmediatoren [164].

Eine der wesentlichen pro-inflammatorischen Wirkungen des TNF ist die Veränderung des Expressionsmusters von Adhäsionsmolekülen auf Blut- und Endothelzellen [6]. So wird nach Aktivierung auf neutrophilen Granulozyten u.a. das L-Selektin CD62L von der Zelloberfläche gespalten („*Shedding*“ von CD62L), und CD11b (die alpha-Kette des alphaM/beta2-Integrins Mac-1) heraufreguliert, was zur festen Bindung ans Endothel führt und das Eindringen der Zellen an den Ort der Entzündung erleichtert [150, 165]. Für Granulozyten konnte das *Shedding* von CD62L und die Hochregulierung von CD11b nach Stimulation mit TNF durchflusszytometrisch gezeigt werden (Abb. 5. 9 und Abb. 5. 12, schwarze Balken). Sowohl das CD62L-*Shedding* als auch die Hochregulation von CD11b wurden auf Granulozyten durch die ADP-Ribosylierung des TNF deutlich reduziert (Abb. 5. 10 und Abb. 5. 12, graue Balken).

Als weiteren Parameter für die Aktivierung von Granulozyten wurde die Veränderung in der Morphologie von Granulozyten nach Stimulation mit TNF untersucht [149]. TNF bewirkt bei Granulozyten eine Zunahme an Größe (ablesbar als Zunahme des *Forward-Scatter*) bei gleichzeitiger Abnahme der Granularität (ablesbar als Abnahme des *Side-Scatter*), die vermutlich durch eine Degranulation der Granulozyten verursacht wird (Abb. 5. 11, schwarzer Balken). Auch diese Wirkung von TNF wurde durch die ART1-katalysierte ADP-Ribosylierung von TNF in Abhängigkeit vom ADP-Ribosylierungsgrad gehemmt (Abb. 5. 11, graue Balken).

Einfluss der ADP-Ribosylierung auf die TNF-induzierte NF- κ B-Aktivierung

Um die Wirkung der ADP-Ribosylierung auf die TNF-vermittelte Signalübertragung auf molekularer Ebene darzustellen, wurde die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch TNF untersucht. Wie in der Einleitung beschrieben (Abschnitte 2.1.4 und 2.1.5), führt die Bindung von TNF an seine Rezeptoren über eine Signalkaskade zur Phosphorylierung und dem daraus resultierenden Abbau des NF- κ B inhibitorischen Proteins I κ B, was die Translokation des NF- κ B in den Zellkern und die Transkription seiner Zielgene ermöglicht. Die Aktivierung von NF- κ B lässt sich im Western-Blot durch den Nachweis von phosphoryliertem I κ B sowie des Abbaus des I κ B-Proteins mithilfe spezifischer anti-I κ B-Antikörper verfolgen (Abb. 5. 13 A und B; Banden „U“). Die ADP-Ribosylierung von TNF zeigte auch hier einen deutlich hemmenden Einfluss sowohl auf die Phosphorylierung als auch auf den Abbau des I κ B-Proteins in den KIT225-Zellen (Abb. 5. 13 A und B; Banden „A“). Somit wurde schließlich auch die direkte Blockierung des für eine Vielzahl der Effekte (besonders der pro-inflammatorischen) von TNF verantwortlichen NF- κ B-Signaltransduktionsweges durch die ART1-katalysierte ADP-Ribosylierung von TNF gezeigt.

6.2.2 Charakterisierung der Effektorfunktionen mit Hilfe TNFR-spezifischer Antikörper

Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß jeder der beiden Rezeptoren an der Auslösung eines bestimmten TNF-induzierten Effektes beteiligt war, wurden TNFR-spezifische Antikörper eingesetzt. Dafür wurden ein kommerziell erhältlicher monoklonaler Antikörper gegen TNFR1 (Klon H398), der von der Firma als „inhibitorisch“ bezeichnet wurde, sowie ein funktionell noch nicht näher charakterisiertes polyklonales anti-TNFR2 Kaninchenserum, das in unserer eigenen Arbeitsgruppe durch genetische Immunisierung hergestellt worden war, verwendet.

Für KIT225-Zellen konnte die Oberflächenexpression beider TNFR gezeigt werden (s. Abb. 5. 2), während auf Granulozyten nur die Expression von TNFR2 nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 5. 8). Da bekannt ist, dass der TNFR1 ubiquitär auf beinahe allen Zellen schwach exprimiert wird [21], lag die Antikörperbindung für den TNFR1 auf Granulozyten vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze.

Die Prä-Inkubation von KIT225-Zellen mit den beiden TNFR-spezifischen Antikörpern zeigte, dass beide TNFR einen Beitrag zu dem TNF-induzierten Zelltod leisteten, da jeder der Antikörper eine Verringerung in der TNF-induzierten Zytotoxizität hervorrief (Abb. 5. 17, schwarze Balken). Die Ergebnisse wurden jedoch dadurch kompliziert, dass beide eingesetzte Antikörper neben ihren blockierenden offenbar auch agonistische Wirkungen vermitteln konnten. So führte die Inkubation der Zellen mit dem anti-TNFR1-Antikörper auch ohne Gabe von TNF zu einem leichten Anstieg in der Anzahl toter Zellen (teil-agonistische Wirkung) (Abb. 5. 17, gestreifte Balken). Der Antikörper

konnte aber dennoch den durch Ko-Inkubation mit TNF induzierten Zelltod vollständig blockieren (schwarze Balken). Die Prä-Inkubation mit dem anti-TNFR2-Antiserum zeigte keine vollständige, aber dennoch eine deutliche Reduktion der zytotoxischen Wirkung von TNF auf die KIT225-Zellen (antagonistische Wirkung). Die Ergebnisse zeigen, dass die TNF-induzierte Zytotoxizität in KIT225-Zellen hauptsächlich durch die Aktivierung des TNFR1 vermittelt wird, der TNFR2 aber einen kooperativen Effekt ausübt (s. Einleitung, Abb. 2. 4).

Für die Aktivierung von Granulozyten zeigte sich, dass sowohl der anti-TNFR1-Antikörper, als auch das anti-TNFR2-Antiserum auch ohne zusätzliche Gabe von TNF eine starke agonistische Wirkung auf die Induktion des CD62L-*Sheddings* auf Granulozyten hatte (Abb. 5. 18, gestreifte Balken). Die Ko-Inkubation beider anti-TNFR-Antikörper wies eine synergistisch-agonistische Wirkung auf, die zum vollständigen Verlust der CD62L-Zelloberflächenexpression führte. Die Ergebnisse dieses Versuches weisen also darauf hin, dass auch an der TNF-induzierten Aktivierung der Granulozyten beide TNFR beteiligt sind.

Ähnlich wie bei der CD62L-Expression zeigte der anti-TNFR1-Antikörper auch für die Änderung der Granulozyten-Morphologie eine starke agonistische, aber keine antagonistische Wirkung. Im Gegensatz dazu wies das anti-TNFR2-Antiserum eine starke blockierende, aber keine agonistische Wirkung auf (Abb. 5. 19). Die Ko-Inkubation mit beiden anti-TNFR-Antikörpern wies jedoch wie bei der CD62L-Expression eine synergistische agonistische Wirkung auf, die über die Wirkung des TNF selbst hinausging. Die Ergebnisse deuten also darauf hin, dass auch an der Wirkung von TNF auf die Granulozyten-Morphologie beide Rezeptoren beteiligt sind.

Insgesamt zeigten die Prä-Inkubationen mit den Rezeptor-spezifischen Antikörpern für jede der drei untersuchten Wirkungen von TNF (Zelltod, CD62L-*Shedding*, Formveränderung von Granulozyten) eine Beteiligung beider Rezeptoren auf. Die Art der Beteiligung der beiden Rezeptoren schien dabei jedoch unterschiedlich zu sein (Tabelle 6. 2). Grob gesehen können zwei unterschiedliche „Muster“ ausgemacht werden. Auf den Zelltod in KIT225-Zellen wirkten beide Antikörper vorwiegend antagonistisch mit einem kleinen agonistischen Anteil (Abb. 5. 17, „Muster1“). Umgekehrt verhielt es sich bei den Effekten auf primäre Granulozyten. Hier überwogen die agonistischen Wirkungen der Rezeptor-spezifischen Antikörper bei weitem (Abb. 5. 18, „Muster2“).

In dieser Hinsicht spiegeln die Wirkungen der Rezeptor-spezifischen Antikörper die fundamentale Zweiteilung der TNF-Effekte in (*death domain*-vermittelte) pro-apoptotische und (NF- κ B-vermittelte) anti-apoptotisch/pro-inflammatorische Effekte wider, und untermauern, dass beide Rezeptoren an beiden Wirkungen beteiligt sind. Jedoch auch innerhalb der pro-inflammatorischen Wirkungen auf Granulozyten gibt es feine Unterschiede in der Wirkung der Antikörper. Das anti-TNFR2-Serum wirkt auf das CD62L-*Shedding* stark agonistisch, auf die Veränderung der Morphologie jedoch

nur antagonistisch. Einen Überblick über die verschiedenen untersuchten Effekte der anti-TNFR-Antikörper gibt Tabelle 6. 2.

Tabelle 6. 2 agonistische, antagonistische und synergistische Wirkungen der anti-TNFR-Antikörper auf verschiedene Effekte

	Zelltod		CD62L		Morphologie	
	agon.	antagon.	agon.	antagon.	agon.	antagon.
anti-TNFR1	+	++	+++	Ø	+++	Ø
anti-TNFR2	Ø	++	+++	(+)	Ø	++
beide	Ø	++	synerg.	Ø	synerg.	Ø

+++ starke Wirkung	++ mittlere Wirkung	+ leichte Wirkung	Ø keine Wirkung
--------------------	---------------------	-------------------	-----------------

6.2.3 Zusammenfassung des Abschnitts 6.2

Für alle untersuchten Effekte des TNF konnte deutlich gezeigt werden, dass die ART1-katalysierte Modifikation von TNF seine biologischen Wirkungen auf Zielzellen hemmte.

Es ist naheliegend, dass sich die Hemmung der TNF-Effekte durch ADP-Ribosylierung auf eine Hemmung der Bindung an einen oder beide TNF-Rezeptoren zurückführen lässt. Dazu sind mehrere Modelle vorstellbar. TNF liegt unter physiologischen Bedingungen als nicht-kovalent verknüpft Trimer vor. Denkbar wäre, dass die ADP-Ribosylierung zu einer Monomerisierung des TNF und damit zu einem Verlust seiner biologischen Aktivität führen könnte. WB-Analysen von ethenoADP-ribosylierten TNF-Proben, welche unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden, weisen aber darauf hin, dass die ADP-Ribosylierung nicht zu einer Ent-Trimerisierung des TNF führt, da sich auch TNF-Trimere mit dem ethenoAdenosinspezifischen 1G4-Antikörper im WB nachweisen lassen (nicht gezeigt). Wahrscheinlicher ist es daher, dass die große und zweifach-geladenen ADP-Ribosegruppe zu einer sterischen Hinderung der Rezeptorbindung führt.

Obwohl die ADP-Ribosylierung einen hemmenden Effekt auf alle durch TNF vermittelten Funktionen hatte, war die Stärke der Wirkung auf einzelne Effektorfunktionen unterschiedlich. Wird der Einfluss der ADP-Ribosylierung auf den Zelltod von KIT225-Zellen mit dem Einfluss auf die Aktivierung von Granulozyten verglichen, so wird deutlich dass die ADP-Ribosylierung den Zelltod wesentlich stärker hemmte, während die Wirkung auf das CD62L-*Shedding* und auf die Änderung der Granulozyten-Morphologie relativ schwach war (s. Abb. 6. 1).

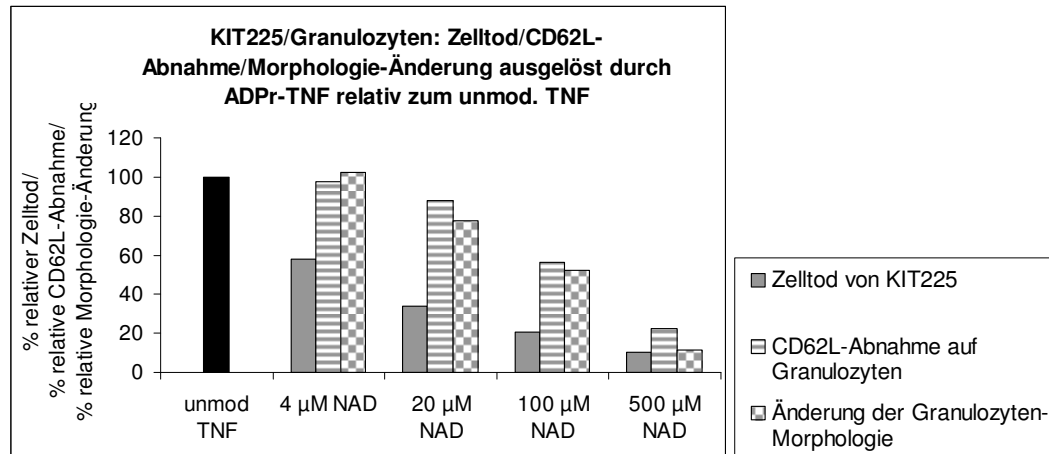


Abb. 6. 1 Vergleich zwischen dem Einfluss der ADP-Ribosylierung von TNF relativ zum unmodifiziertem TNF auf den TNF-induzierten Zelltod in KIT225-Zellen und auf die TNF-induzierte Aktivierung/Morphologie-Änderung von Granulozyten: Das Balkendiagramm zeigt den relativen Effekt von ADP-ribosyliertem zu unmodifiziertem TNF für den TNF-induzierten Zelltod von KIT225-Zellen der Abb. 5. 7 (1 ng/mL TNF, graue Balken), dem TNF-induzierten CD62L-*Shedding* auf Granulozyten der Abb. 5. 10 (333 pg/mL TNF, gestreifte Balken) und der Änderung der Granulozyten-Morphologie der Abb. 5. 11 (333 pg/mL TNF, karierte Balken). Die % PI-positiver Zellen bzw. die MFI-Werte für CD62L bzw. die % Granulozyten mit veränderter Gestalt für die unmodifizierten TNF-Ansätze wurden dabei jeweils nach Abzug der Basalwerte (Ansätze ohne TNF) auf 100 % gesetzt. (schwarzer Balken).

Dieser Unterschied geht parallel mit der Einteilung der TNF-Funktionen in zwei verschiedene “Muster”, die durch die agonistischen bzw. antagonistischen Effekte der anti-TNFR-Antikörper sichtbar wurden. Diese lassen darauf schließen, dass die Konformation der Rezeptoren, die durch die Bindung eines Liganden bewirkt wird, unterschiedliche Folgen für unterschiedliche Wege der Signaltransduktion hat. Die Bindung des gleichen Liganden (in diesem Fall die Antikörper) bewirkt für den einen Signalpfad eine Hemmung und führt für den zweiten zur Induktion. Diese differenzielle Wirkung zeigt sich auch für die ADP-Ribosylierung. Besonders bei niedrigen NAD-Konzentrationen (niedriger Grad an ADP-Ribosylierung) ist die Wirkung auf Effekte, die das “Muster 1” (vorwiegend antagonistische Effekte der Antikörper) aufweisen, stark (Zelltod), während die Wirkung auf Effekte, die das “Muster 2” (vorwiegend agonistische Effekte der beiden Antikörper) aufweisen, schwach ist (Granulozyten-Aktivierung). Der Effekt der ADP-Ribosylierung auf die NF- κ B-Aktivierung konnte noch nicht in dieses Muster eingeordnet werden, da im Rahmen dieser Arbeit weder eine Dosis-Wirkungsbeziehung zur NAD-Konzentration hergestellt, noch die (ant)agonistischen Effekte der anti-TNFR-Antikörper untersucht werden konnten.

6.3 Strukturelle Konsequenzen der ADP-Ribosylierung von TNF durch ART1

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die Auswirkungen der ART1-katalysierten ADP-Ribosylierung von TNF auf die Bindung an seine Rezeptoren und auf seine Funktionen diskutiert. In diesem Abschnitt sollen die strukturellen Auswirkungen der Modifikation im Zusammenhang mit bereits verfügbaren Erkenntnissen über für die Rezeptorbindung relevante Aminosäure-Reste diskutiert werden.

6.3.1 Identifikation der Ziel-Arginine im TNF

Wie in der Einleitung beschrieben überträgt ART1, wie andere eukaryotische mono-ADP-Ribosyltransferasen, die ADP-Ribosegruppe von NAD spezifisch auf Argininreste. Das lösliche TNF-Molekül besteht aus 157 Aminosäuren, von denen neun Arginine sind. Die dreidimensionale Struktur des trimeren TNF zeigt, dass alle Aminosäuren mit Ausnahme des Arginin 82 auf der Oberfläche des TNF exponiert und somit zugänglich für die ART1 sind (Abb. 6. 2, Oberflächendarstellungen A-C). Damit sind im TNF-Molekül acht potentielle ADP-Ribosylierungsstellen für die ART1-katalysierte Reaktion verfügbar.

Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrische Analyse von chromatographisch (HPLC) fraktionierten Peptiden, die durch proteolytischen Verdau ADP-ribosylierter Proben erhalten werden, ist eine geeignete Methode, ADP-Ribosylierungsstellen in Proteinen zu identifizieren [109, 136, 166]. In den anfänglichen MS-Untersuchungen stellte sich heraus, dass sich die Identifizierung ADP-ribosylierter Peptide selbst aus wenig komplexen Mischungen als schwierig gestaltete. Daher wurden eigene Voruntersuchungen mit einem ADP-ribosylierten Modell-Peptid (Heptamer, „Kemptide“ von Promega) angestellt. Diese zeigten auf, dass die ADP-Ribosegruppe unter CID (*collision induced dissociation*)-Bedingungen von der Seitenketten abgespalten wird, dass aber der Nachweis des für die ADP-Ribosegruppe spezifischen Fragmentierungsmusters („Fingerabdruck“) die Identifikation von ADP-ribosylierten Peptiden möglich macht (s. Tabelle 5. 2). Diese Vorgehensweise wurde von Hengel *et al.* zeitgleich mit unseren Untersuchungen veröffentlicht [153]. Die mit Hilfe dieser Methode durchgeführten massenspektrometrischen Analysen des ADP-ribosylierten rekombinanten TNF führten zur positiven Identifikation der beiden Argininreste R6 und R32 als ADP-Ribosylierungsstellen im TNF, wobei die Existenz weiterer ADP-Ribosylierungsstellen dadurch nicht ausgeschlossen werden kann.

Mutationsanalysen

Um die aus den massenspektrometrischen Analysen erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen, wurden die identifizierten Argininreste (R6 und R32) durch zielgerichtete Mutagenese zu Lysin mutiert. Da Lysin keine Ziel-Aminosäure von ARTs darstellt, sollten die Akzeptorstellen der ADP-Ribosylierung auf diese Weise ausgeschaltet werden. Der Austausch zu Lysin wurde gewählt, weil er eine sehr konservative Mutation darstellt (die beiden Aminosäuren besitzen die gleiche Ladung und unterscheiden sich in nur wenigen Atomen voneinander). Dadurch sollte der Effekt der Mutation auf die TNF-Struktur und damit die Rezeptorbindung möglichst gering gehalten werden. Die Analyse der Mutanten konnte die Ziel-Arginine bestätigen: die Mutation beider Reste (R6/32KK) verminderte das Ausmaß der ADP-Ribosylierung deutlich (Abb. 5. 29). Gleichzeitig deuteten die Mutationsanalysen jedoch darauf hin, dass es noch mindestens eine weitere ADP-Ribosylierungsstelle im TNF geben könnte, da selbst in der R6/R32KK Doppelmutante keine vollständige Unterdrückung der ADP-Ribosylierung stattfand (Abb. 5. 29). Obwohl diese ADP-Ribosylierungsstelle noch nicht eindeutig identifiziert werden konnte, so konnten bereits Hinweise auf ihre Lage gewonnen werden (s.u.).

Weitere ADP-Ribosylierungsstellen

Einen Hinweis auf die Identität einer weiteren ADP-Ribosylierungsstelle(n) im TNF lieferte einer der im ELISA-Kit verwendeten monoklonalen anti-TNF-Antikörper („*Coating*“-Antikörper). Dieser Antikörper verlor die Fähigkeit, membranständiges TNF auf der Oberfläche von mit TNF und ART1 ko-transfizierten HEK293-Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten NAD-Konzentration zu erkennen (Abb. 5. 35, Diagramm A). Dieser Antikörper reagierte ähnlich sensitiv auf die ADP-Ribosylierung der R6/32KK TNF-Mutante, bei der die beiden bekannten ADP-Ribosylierungsstellen mutiert worden waren (Abb. 5. 36, Diagramm A). Dies bedeutete, dass die ADP-Ribosylierung eines anderen Argininrestes für den Verlust der Bindung verantwortlich sein musste. Es zeigte sich ferner, dass derselbe Antikörper die R44K-Mutante selektiv nicht erkannte (Abb. 5. 37, Diagramm A).

Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass sich eine ADP-Ribosylierungsstelle im TNF in der Nähe des Epitops befindet, das von dem *Coating*-Antikörper erkannt wird, nämlich in der Gegend um R44. Die Analyse der 3D-Struktur von TNF zeigt, dass sich in der direkten Nachbarschaft zum Arginin 44 ein weiteres Arginin in der Position 131 befindet (s. Abb. 6. 2; braun dargestellte Reste). Damit stellen die Argininreste R44 und R131 potentielle ADP-Ribosylierungsstellen dar.

6.3.2 Die an der TNFR-Bindung beteiligten Aminosäure-Reste im TNF

Mit der Identifikation der Ziel-Arginine im TNF ergibt sich die Möglichkeit, die beobachteten Auswirkungen der ADP-Ribosylierung auf die Funktion von TNF mit seiner Struktur in Beziehung zu setzen. Die Kristallstruktur des TNF-Trimers wurde bereits 1989 gelöst (pdb-Kode: 1TNF) [43]. Bisher gibt es keine öffentlich zugängliche Struktur von TNF in Komplex mit einem seiner beiden Rezeptoren, jedoch wurde die Kristallstruktur von TNFR1 in Komplex mit Lymphotoxin (pdb-Kode: 1TNR) publiziert [59]. Lymphotoxin ist ein Mitglied der TNF-Ligandenfamilie mit ca. 30 % Sequenzhomologie zu TNF [30]. Aus dieser Struktur lassen sich Modelle für die Bindung von TNF an seine Rezeptoren ableiten. Die beiden TNF-Rezeptoren weisen in ihren extrazellulären Liganden-Bindungsdomänen mit jeweils vier Cystein-reichen Domänen (CRDs) untereinander große Ähnlichkeiten auf. Es wird davon ausgegangen, dass beide TNF-Rezeptoren das trimere TNF in den lateralen Vertiefungen, die an der Grenze zwischen zwei TNF-Monomeren entstehen, binden [167] (s. Abb. 2. 2).

Die 3D-Struktur von TNF zeigt, dass sich die zwei in dieser Arbeit identifizierten Ziel-Arginine R6 und R32 in der Nähe der Monomer-Interaktionsfläche und damit in der Nähe der vermuteten TNFR-Bindungsstelle befinden (Abb. 6. 2, Darstellung A-E, rot hervorgehobene AS). Aufgrund der N-terminalen flexiblen Position des Arginins 6 ist jedoch die genaue Orientierung dieses Restes nicht bestimmbar (das R6 stellt den ersten Aminosäure-Rest dar, der in der Kristallstruktur aufgelöst wurde). Weiterhin sind in Abb. 6. 2 die potentiellen ADP-Ribosylierungsstellen R44 und R131 (s. oben) braun hervorgehoben. Diese beiden Aminosäure-Reste befinden sich relativ mittig im TNF-Molekül.

Zusätzliche Informationen über die Bindung von TNF an seine Rezeptoren wurden aus Studien mit TNF-Mutanten erhalten. Als Assaysystem wurde bei diesen Untersuchungen in aller Regel die Bindung an TNFR-Fc-Fusionsproteine verwendet. Eine Reihe verschiedener Einzel-Mutationen im TNF weisen darauf hin, dass die Kontakte zu den TNFRs vornehmlich durch die Aminosäurereste in Nähe der Positionen 30, 80 und 140 des TNF hergestellt werden [106, 168-170]. Kürzlich hatten Mukai *et al.* aufgrund dieser vorhergesagten Bindungsstellen randomisierte Mutationen des TNF in diesen Bereichen eingeführt, und mithilfe der Phagen-Display-Technologie eine Reihe von TNF-Mutanten isoliert, die in ihrer Bindung eine Spezifität entweder für TNFR1 oder TNFR2 aufwiesen [171]. Es zeigte sich, dass die TNFR1-selektiven TNF-Varianten Mutationen in der Nähe des Aminosäure-Restes 30 aufwiesen, während die Reste in der Nähe der Position 140 konserviert waren. Für die TNFR2-selektiven Mutanten ergab sich ein umgekehrtes Bild (konservierte Reste in Nähe der Position 30; mutierte Reste in Nähe der Position 140). In der Abb. 6. 2 (Darstellung F und G) wurden die Aminosäure-Reste, die nach diesen Untersuchungen an der selektiven Bindung zu einem der beiden TNFRs beteiligt sind, in der Kristallstruktur von TNF farbig hervorgehoben (grün: an der Bindung zu TNFR2 beteiligte AS; blau: an der Bindung zu TNFR1 beteiligte AS).

Interessanterweise gehört R32 zu den Resten, dessen Mutation zu einer deutlich verminderten Bindung vor allem an TNFR2-Fc führt. Die von Fu *et al.* durchgeführten Modell-Strukturanalysen zur Bindung von TNF an jeden der beiden TNFRs sagen vorher, dass R32 konservierte Wasserstoffbrücken-Bindungen mit spezifischen Serin-Resten in beiden TNF-Rezeptoren eingeht, und dass die Eliminierung dieser Wechselwirkungen zu einer reduzierten Bindung an beide TNFR führt [167]. Verschiedene Mutationen des R32 wurden in der Literatur beschrieben. Die Substitution zu Tryptophan (R32W) bewirkt eine selektive Abnahme der Bindung an TNFR2-Fc, aber Mutationen zu anderen Aminosäuren, inklusive der in dieser Arbeit beschriebenen R32K-Mutante, beeinflussten auf die Bindung an beide Rezeptoren [106, 170, 172-174]. Diese Daten sind im Einklang mit der in dieser Arbeit gemachten Beobachtung, dass die ADP-Ribosylierung von TNF an der Stelle R32 die Bindung insbesondere an TNFR2, aber auch an TNFR1 beeinflusst.

In der Abb. 6. 2 wurde zusätzlich das Tyrosin 87 (Y87) in orange hervorgehoben. Mutationen dieses Restes führten zu einer beinahe vollständigen Blockade der Bindung zu beiden TNFRs, er scheint also für die Bindung an beide TNFRs essentiell zu sein [169]. Die Abbildung zeigt, dass sich die an der TNFR-Bindung beteiligten Aminosäure-Reste allesamt in der Nähe der TNF-Monomer-Interaktionsflächen befinden. Außerdem wird deutlich, dass, trotz der allgemeinen Ähnlichkeit der Bindung von TNF zu seinen beiden Rezeptoren [167], unterschiedliche Aminosäure-Reste am Kontakt zu jedem der beiden Rezeptoren beteiligt sind [171].

Es bleibt anzufügen, dass auch Mutationen von TNF-Aminosäure-Resten, die außerhalb der lateralen Vertiefungen liegen und von denen daher angenommen wurde, dass sie nicht an der Rezeptorbindung beteiligt sind, die Affinitäten zu den Rezeptoren deutlich beeinflussen können. So wurde gezeigt, dass die Mutation des Serin 133 zu Glycin oder Threonin eine sehr starke Hemmung der Bindung an die TNFRs zur Folge hatte [169]. Somit könnte auch die potentielle ADP-Ribosylierung der Arginine R44 oder R131 einen Einfluss auf die Rezeptorbindung nehmen.

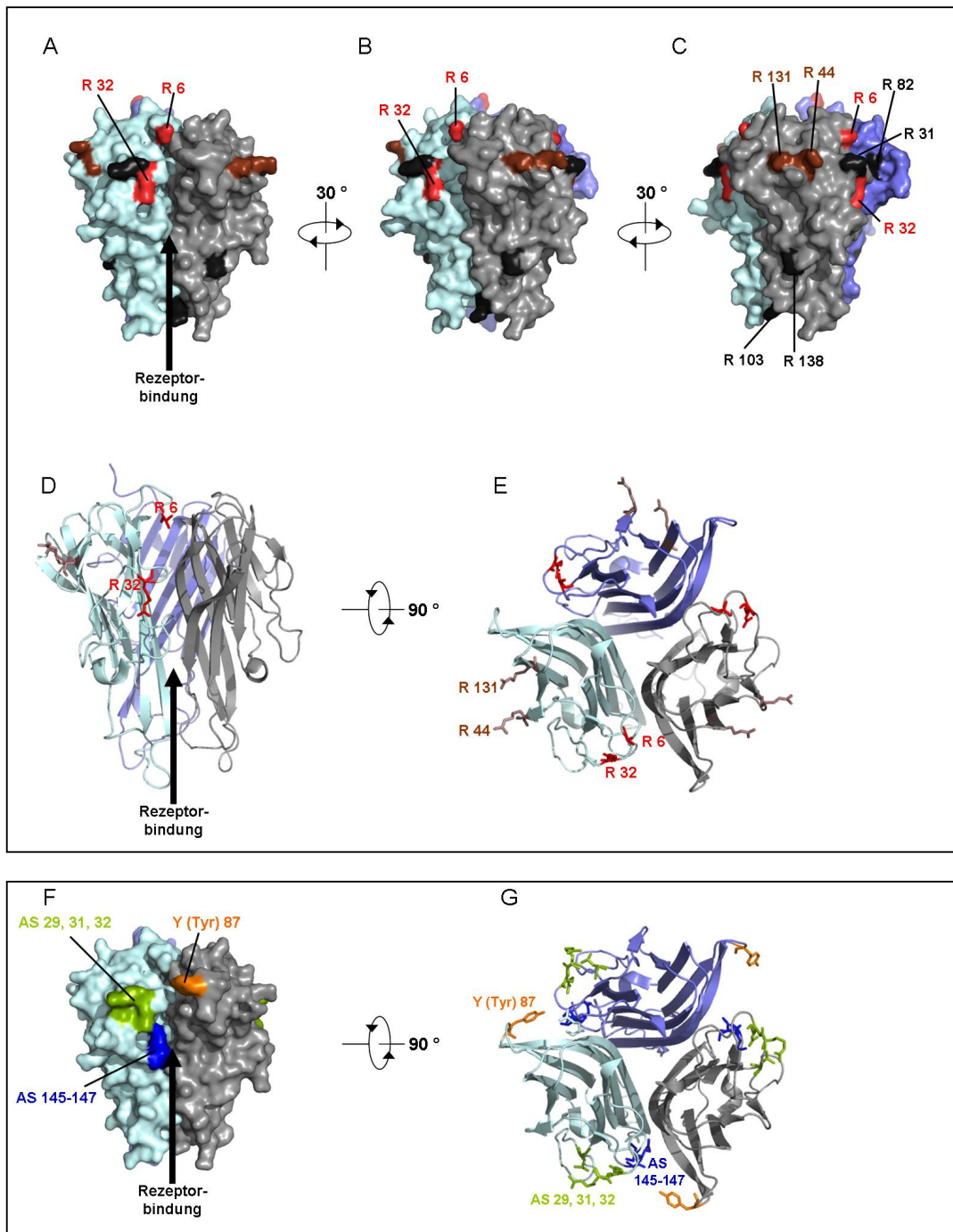


Abb. 6. 2 Kristallstruktur von humanem TNF: Dargestellt sind unterschiedliche Ansichten des TNF-Trimers (pdb 1TNF) [43]. Die ersten fünf Aminosäure-Reste (AS 1-5) wurden in der Kristallstruktur nicht aufgelöst. Zu beachten ist die variable Lage von R6 in den drei TNF-Monomeren aufgrund der endständigen Flexibilität dieses Arginins. Die abgebildeten Strukturen wurden mit Hilfe des Pymol Programms erstellt. Die einzelnen TNF-Monomere sind unterschiedlich farbig dargestellt. Die vorhergesagte TNFR-Bindung entlang der lateralen Vertiefungen, die zwischen zwei TNF-Monomeren entstehen, wurde durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. A-C) Oberflächendarstellung des TNF-Trimers, jeweils um 30 ° im Uhrzeigersinn längs der Y-Achse rotiert. Der N-Terminus befindet sich oben. Die beiden identifizierten ADP-Ribosylierungsstellen (R6, R32) sind rot hervorgehoben, die zwei potentiellen ADP-Ribosylierungsstellen (R44 und R131; s. Text) braun. Die restlichen im TNF vorhandenen Argininreste (bis auf R2, welches nicht aufgelöst wurde) wurden in schwarz dargestellt. D) *Cartoon*-Darstellung der in A) gezeigten Orientierung mit den in rot und braun

dargestellten identifizierten bzw. potentiellen ADP-Ribosylierungsstellen. E) wie in D), aber um 90 ° entlang der X-Achse nach vorne gedreht (Aufsicht). F, G) In der Oberflächen- (F) bzw. *Cartoon*-Darstellung (G; im Verhältnis zu F um 90 ° entlang der X-Achse gedreht) sind die an der TNFR-Bindung beteiligten, durch Mutationsanalysen bekannten Aminosäure-Reste (AS) farblich hervorgehoben. Mutationen der in blau dargestellten Aminosäuren (AS 145-147) führen zu TNFR2-spezifischen TNF-Varianten, der Austausch grün hervorgehobener Reste (AS 29, 31, 32) führt zu TNFR1-spezifischen TNF-Mutanten [171]. Das orange markierte Tyrosin (Y87) ist für die Bindung beider TNFR essentiell [169].

6.3.3 Zusammenfassung des Abschnitts 6.3

Durch massenspektrometrische Untersuchungen von in Lösung ADP-ribosyliertem TNF wurden die Argininreste R6 und R32 als ADP-Ribosylierungsstellen im TNF identifiziert. Die Mutation dieser beiden Arginine zu Lysin reduzierte die Modifikation (bei membranständiger ADP-Ribosylierung von TNF) deutlich, verhinderte sie aber nicht völlig. Dies weist darauf hin, dass zumindest in membranständig ADP-ribosyliertem TNF noch weitere Argininreste modifiziert werden können. Erste Hinweise auf die Lage einer zusätzlichen ADP-Ribosylierungsstelle wurden durch das Bindungsverhalten eines Antikörpers erhalten. Dieser erkennt ein Epitop, das den Rest R44 umschließt, reagiert jedoch noch sensitiv auf die ADP-Ribosylierung der R6/32KK-Mutante, bei der die beiden Zielarginine R6 und R32 nicht modifiziert werden können. Insgesamt sind die in dieser Arbeit erhobenen Daten im Einklang mit publizierten Beobachtungen, die eine wichtige Rolle des R32 für die Bindung des TNF an beide Rezeptoren aufzeigen.

Zu bestimmen bleibt, ob alle ADP-Ribosylierungsstellen im TNF gleichermaßen modifiziert werden. Für andere ADP-ribosylierte Proteine wurde gezeigt, dass vor allem bei niedrigen NAD Konzentrationen bestimmte Argininreste bevorzugt modifiziert werden [122, 175, 176]. Möglich ist auch, dass die Auswahl der Ziel-Arginine im TNF von der Topologie der Modifikation abhängt. Denkbar ist, dass, bedingt durch den fixierten Abstand zur Zellmembran die zellständige ART1 in ebenfalls zellständigem TNF andere Ziel-Arginine erkennt als die lösliche ART1 in löslichem TNF.

6.4 Struktur-Funktions-Untersuchungen durch Mutationen der Ziel-Arginine

Um die Bedeutung der ADP-Ribosylierung an den beiden Modifikationsstellen, R6 und R32, auf die Wirkungen von TNF zu untersuchen, wurden TNF-Mutanten, bei denen diese Ziel-Arginine gegen Lysin ausgetauscht waren, eingesetzt. Dabei sollte durch die konservative Mutation von Arginin zu Lysin die Struktur des Zytokins weitestgehend erhalten bleiben, die ADP-Ribosylierung an der mutierten Stelle jedoch verhindert werden.

6.4.1 Die Mutation von R6

Die Mutation des Ziel-Arginins R6 zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp in Bezug auf die TNF-Oberflächenbindung an KIT225-Zellen (Abb. 5. 30). Die ADP-Ribosylierung führte bei der R6K-Mutante in gleicher Weise wie beim Wildtyp zu einer Hemmung der Bindung an KIT225-Zellen (nicht gezeigt). Auch in Hinblick auf die biologischen Funktionen von TNF verhielt sich die R6K-Mutante wie der Wildtyp. Die Mutation selber hatte keinen Einfluss auf den TNF-vermittelten Zelltod (Abb. 5. 32) oder die Induktion des CD62L-*Sheddings* (Abb. 5. 34), und in Bezug auf letztere Funktion zeigte auch die ADP-Ribosylierung dieser Mutante die gleiche Sensitivität gegenüber der Modifikation wie der Wildtyp (Abb. 5. 34).

Daher ist anzunehmen, dass die Modifikation an R6 für die Effekte der ADP-Ribosylierung auf Bindung sowie Effektorfunktionen von TNF keine Bedeutung hat.

6.4.2 Die Mutation von R32

Einfluss der R32K Mutation auf die Bindung von TNF an seine Rezeptoren

Erstaunlicherweise bewirkte bereits die konservative Mutation von R32 zu Lysin, im Gegensatz zu der Mutation von R6, eine vollständige Hemmung der TNF-Oberflächenbindung an KIT225-Zellen (s. Abb. 5. 30). Dies unterstreicht die Bedeutung der Interaktion von R32 mit dem TNFR2 in diesem Zellsystem, und steht im Einklang mit von anderen Arbeitsgruppen publizierten Daten zu Mutationen dieses Argininrestes [106, 173]. Da die R32K-Mutante nicht an den TNFR2 auf den KIT225-Zellen gebunden hat, konnte in diesem System nicht untersucht werden, ob die ADP-Ribosylierung dieser Mutante zu einer weiteren Abnahme der Bindung führt, d.h. ob die ADP-Ribosylierung an anderen Stellen einen Einfluss auf die Bindung ausübt.

Interessanterweise zeigte die R32K-Mutante im Vergleich zum wildtyp TNF überhaupt keine Reduktion der Bindung an TNFR2, wenn dieser auf transfizierten HEK293-Zellen exprimiert wurde (s. Abb. 5. 31, Diagramm B). Dies unterstreicht noch einmal, dass die Geometrie der Interaktion von TNF mit seinen Rezeptoren in unterschiedlichen Zellsystemen (z.B. KIT225 vs. HEK293) verschieden sein kann, vermutlich aufgrund unterschiedlicher Rezeptor-Konformationen. Die R32K-Mutation zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Bindung von TNF an HEK293.TNFR1-Transfektanten (s. Abb. 5. 31, Diagramm A). Ob die Mutation die Bindung an endogen exprimierten TNFR1 auf anderen Zellen beeinflusst, konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden, da wir über kein geeignetes Zellmodell verfügten.

Insgesamt spiegelt die R32K-Mutante in Bezug auf die Bindung an KIT225-Zellen ziemlich genau die Wirkungen der ADP-Ribosylierung wider, während Mutation und ADP-Ribosylierung unterschiedliche Auswirkungen auf die Bindung von TNF an transfizierte HEK293.TNFR-Zellen haben (Tabelle 6. 3).

Tabelle 6. 3 Hemmender Effekt der ADP-Ribosylierung und der R32K-Mutation auf die Bindung von TNF an seine Rezeptoren in unterschiedlichen Zell-Systemen

Bindung von:	ADPr-TNF		TNF(R32K)	
auf:	KIT225	HEK293. TNFR	KIT225	HEK293. TNFR
TNFR1	nicht bestimmbar	+ + +	nicht bestimmbar	Ø
TNFR2	+ + +	+	+++	Ø

+ + + starker Effekt + leichter Effekt Ø kein Effekt

Einfluss der R32K Mutation auf TNF-vermittelte Funktionen

Während die R6K Mutation keinen Einfluss auf die Induktion des Zelltodes in KIT225-Zellen hatte, zeigten die beiden Mutanten, in denen R32 mutiert war (R32K und R6/32KK), im Vergleich zum Wildtyp eine starke Verminderung der Fähigkeit, den Zelltod auszulösen (Abb. 5. 32). Es ist aus den vorliegenden Ergebnissen nicht möglich, mit Sicherheit zu sagen, ob die Wirkung der R32K-Mutation auf die Auslösung des Zelltods sich über einen Einfluss auf die Bindung an TNFR1 oder TNFR2 vermittelt.

Da alleine die Mutation von R32K zu einem fast völligen Funktionsverlust von TNF in diesem System geführt hatte, wurde keine ADP-Ribosylierung dieser Mutante mehr durchgeführt, um eventuelle zusätzliche Effekte durch Modifikation an anderen Stellen zu detektieren.

Auch in Bezug auf das von TNF induzierte CD62L-*Shedding* zeigte die R32K-Mutante im Vergleich zum Wildtyp einen deutlichen Funktionsverlust (s. Abb. 5. 33). Anders als im Fall des TNF-induzierten Zelltodes war dieser aber nur partiell. Daher wurde untersucht, ob eine ADP-Ribosylierung der R32K Mutante die Induktion des CD62L-*Sheddings* noch zusätzlich hemmen könnte. Während die Wirkung von Wildtyp-TNF und der R6K-Mutante gleichermaßen durch ADP-Ribosylierung gehemmt wurde, führte die zusätzliche Einführung der R32K Mutation in die R6K Mutante (R6/32KK) zum Verlust der Sensitivität gegenüber der ADP-Ribosylierung (Abb. 5. 34). Daraus kann geschlossen werden, dass für die Hemmung des TNF-induzierten *Sheddings* von CD62L die ADP-Ribosylierung an der Stelle R32 funktionell relevant ist, während die Modifikation an der Stelle R6 keine Bedeutung hat.

6.4.3 Zusammenfassung des Abschnitts 6.4

Die Bindungsstudien mit der R32K-Mutante zeigen, dass dem Arginin 32, das als Zielamino-säure der ADP-Ribosylierung identifiziert wurde, eine besondere Rolle für die Interaktion TNF - TNFR2 in dem den TNFR2 endogen exprimierenden KIT225-Zellsystem zukommt. Bereits die konservative Mutation dieses Argininrestes zu Lysin

blockiert die Bindung an TNFR2. Zumindestens für das CD62L-Shedding konnte diese ADP-Ribosylierungsstelle als die funktionell relevante identifiziert werden.

6.5 Topologische Aspekte der ADP-Ribosylierung von TNF durch ART1

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die ADP-Ribosylierung von TNF durch ART1 in unterschiedlichen topologischen Konstellationen geschehen kann, die unterschiedliche biologische Konsequenzen nach sich ziehen können. Zwei mögliche Szenarien sind dabei zu unterscheiden:

1. lösliches TNF wird von löslicher ART1 modifiziert („endokrine Wirkung“)
2. lösliches oder membranständiges TNF wird von membranständiger ART1 auf der Oberfläche der Zielzelle modifiziert („autokrine Wirkung“). Das modifizierte membranständige TNF kann entweder von der Zelle abgegeben werden, oder seine Wirkungen als membranständiges Zytokin entfalten.

Das erste Szenario wurde durch die Prä-ADP-Ribosylierung von TNF durch Inkubation mit NAD und löslicher ART1 simuliert, so wie es in den meisten Versuchen durchgeführt wurde. Das zweite Szenario wurde durch die Versuche repräsentiert, in denen die Wirkung von TNF auf ART1-exprimierende KIT225-Zellen untersucht wurde.

In beiden Szenarien führte die ADP-Ribosylierung von TNF durch ART1 zu einer deutlichen Reduktion der Oberflächenbindung von TNF an KIT225-Zellen in Abhängigkeit von der zur ADP-Ribosylierung eingesetzten NAD-Konzentration (Abb. 5. 4 und Abb. 5. 20). In Abb. 5. 4 ist die Wirkung von löslich prä-ADP-ribosyliertem TNF, in Abb. 5. 20 die Wirkung von unmodifiziertem TNF auf stabil mit ART1 transfizierten KIT225-Zellen in Gegenwart und Abwesenheit von exogen zugesetztem NAD dargestellt.

Ein Vergleich der beiden Szenarien zeigt, dass der blockierende Einfluss der ADP-Ribosylierung auf die TNF-Oberflächenbindung für die prä-ADP-ribosylierten Proben größer war als für die Ansätze, in denen das TNF erst auf der Oberfläche der Zielzelle modifiziert wurde. (Abb. 5. 20, Diagramm A bzw. Abb. 5. 4). Dies könnte daran liegen, dass bei gleicher NAD-Konzentration die Modifikation in Lösung einen höheren ADP-Ribosylierungsgrad erzielte als die Modifikation auf der Zellmembran (vgl. in Abb. 5. 1, Western-Blot A, Spuren L und Z).

Auch der TNF-induzierte Zelltod von KIT225-Zellen zeigte Unterschiede in seiner Sensitivität gegenüber der ADP-Ribosylierung in den beiden Szenarien. In beiden Fällen wurden die KIT225-Zellen in Abhängigkeit von der zur ADP-Ribosylierung eingesetzten NAD-Konzentration vor dem TNF-induzierten Zelltod geschützt (vgl. Abb. 5. 7 und Abb. 5. 21). Dabei zeigte sich, dass bei niedrigen NAD-Konzentrationen

der schützende Effekt der ADP-Ribosylierung bei prä-ADP-ribosyliertem TNF größer war als bei an der Zelloberfläche modifiziertem. Bei höheren NAD-Konzentrationen wurde dieser Effekt jedoch ausgeglichen.

Interessanterweise zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Szenarien in Bezug auf die TNF-induzierte Aktivierung von NF- κ B. Diese wurde durch die Modifikation von TNF durch ART1 auf der Oberfläche von KIT225-Zellen überhaupt nicht beeinflusst (Abb. 5. 22), während die prä-ADP-Ribosylierung von TNF die Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges eindeutig reduzierte (Abb. 5. 13). Diese Diskrepanz könnte durch zeitliche Aspekte erklärt werden. Die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges erfolgt in einem Zeitfenster von Minuten nach Inkubation mit TNF. Im Falle der ADP-Ribosylierung auf der Zelloberfläche träfe das TNF zunächst im unmodifizierten Zustand auf die ART1-transfizierten KIT225-Zellen, wo es direkt an seine Rezeptoren binden und den NF- κ B-Signaltransduktionsweg sofort aktivieren könnte. Dagegen wäre die Bindung des prä-ADP-ribosylierten TNF an seine Rezeptoren von vornherein blockiert. Dass die zytotoxische Wirkung des TNF auch durch Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung gehemmt wurde (s. oben), könnte damit erklärt werden, dass die Induktion des Zelltods eine länger dauernde Interaktion von TNF mit seinen Rezeptoren erfordert [68], in deren Verlauf die Modifikation durch ART1 auf der Zielzelle wirksam werden könnte.

6.5.1 Zusammenfassung des Abschnitts 6.5

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die biologischen Konsequenzen unterschiedlich sind, je nachdem, ob die ADP-Ribosylierung zeitlich vor („endokrines“ Szenario) oder zeitgleich mit („autokrines“ Szenario) dem Auftreffen von TNF auf seine Zielzellen stattfindet. Während im ersten Fall alle Effekte stark beeinflusst werden, werden im zweiten Fall die kurzzeitigen Wirkungen (z.B. Oberflächenbindung und NF- κ B-Aktivierung) wenig oder gar nicht gehemmt, die langfristigen (z.B. TNF-vermittelte Zytotoxizität) jedoch gleich stark oder stärker.

Ob die ADP-Ribosylierung des TNF allein oder zusätzlich die ADP-Ribosylierung der TNFR (s. Abb. 5. 23), oder auch die Modifikation weiterer bisher unbekannter Faktoren auf der Zelloberfläche an der Hemmung des TNF-induzierten Zelltodes beteiligt sind, bleibt zu bestimmen.

6.6 Zusammenfassung und Ausblick

Das pleiotrope Zytokin TNF spielt eine zentrale Rolle bei zahlreichen inflammatorischen Prozessen im Körper, wie die eindrucksvollen klinischen Erfolge der anti-TNF-Therapie bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis belegen. Über die Regulationsmechanismen seiner Wirkungen ist bisher wenig

bekannt. Die in dieser Arbeit beschriebene ADP-Ribosylierung von TNF durch ART1 stellt einen bisher unbekannten, aber potenziell bedeutsamen Regulationsmechanismus durch posttranslationale Modifikation von TNF dar.

Ob und in welchem (patho)physiologischen Szenario die ADP-Ribosylierung für die Regulation der TNF-Funktion *in vivo* eine Bedeutung hat, kann durch die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente nicht beantwortet werden. Denkbar ist, dass dieser Mechanismus im Rahmen von Gewebeschädigungen und Entzündungsprozessen zum tragen kommen könnte. Unter diesen Bedingungen werden sowohl TNF und NAD von Zellen freigesetzt [5, 129], als auch ART1 möglicherweise verstärkt an der Oberfläche exprimiert [135]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei NAD-Konzentrationen, die unter entzündlichen Bedingungen physiologisch relevant sind (unterer mikromolarer Bereich), die ADP-Ribosylierung von TNF eine deutliche Hemmung der zytotoxischen Wirkung von TNF bewirkt, aber keinen Einfluss auf die (pro-inflammatorische) Aktivierung von primären Granulozyten hat.

In dieser Arbeit wurden zwei mögliche topologische Konstellationen beschrieben, in denen die ADP-Ribosylierung von TNF wirksam werden könnte (Abb. 6. 3). In dem einen Szenario könnte freigesetzte ART1 durch Modifikation von löslichem TNF die Fernwirkungen dieses Zytokins auf Zielzellen beeinflussen („endokrine“ Wirkung). In dem anderen würde eine Zelle sich durch Expression von ART1 vor der zytotoxischen Wirkung von TNF schützen („autokrine“ Wirkung).

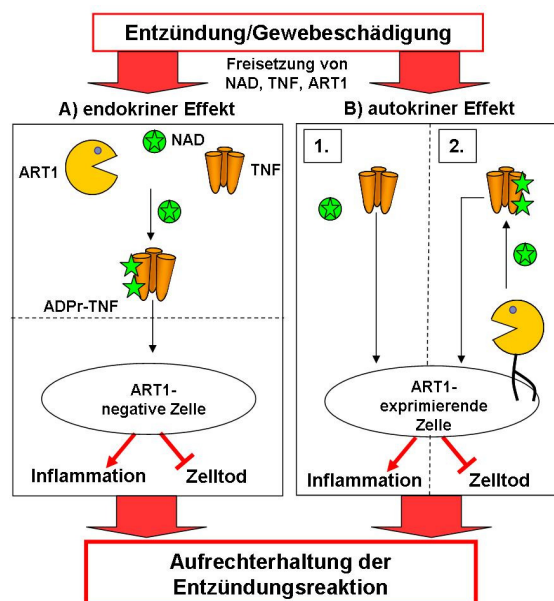


Abb. 6. 3 Hypothetische Szenarien der ADP-Ribosylierung von TNF und der Auswirkungen auf seine Funktionen: s. oben stehenden Text

Die Frage, ob eines dieser beiden Szenarien *in vivo* eine Rolle für die Regulation der TNF-Wirkung hat, wird hypothetisch bleiben, solange ADP-ribosyliertes TNF nicht aus menschlichen Körperflüssigkeiten oder Gewebeprobe *in vivo* isoliert oder nachgewiesen wurde. Gegenwärtig ist der Nachweis ADP-ribosylierter Proteine in

komplexen Proben noch schwierig. Methodische Fortschritte vor allem bei der Massenspektrometrie, wie der Nachweis des ADP-Ribose „Fingerabdrucks“ ([153] und diese Arbeit) und die Anreicherung von ADP-ribosylierten Peptiden durch Bindung an Titan-Dioxid-Matrices [177], sowie die Entwicklung spezifischer Antikörper gegen ADP-ribosylierte Proteine [178] lassen dieses Ziel jedoch für die Zukunft als realistisch erscheinen [122].

7. Literatur

1. Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik. 2002. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
2. Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3666-3670.
3. Aggarwal, B. B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3:745-756.
4. Locksley, R. M., N. Killeen, and M. J. Lenardo. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487-501.
5. Baud, V., and M. Karin. 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11:372-377.
6. Bradley, J. R. 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214:149-160.
7. Sedgwick, J. D., D. S. Riminton, J. G. Cyster, and H. Korner. 2000. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol Today* 21:110-113.
8. Munro, J. M., J. S. Pober, and R. S. Cotran. 1989. Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of Papio anubis. *Am J Pathol* 135:121-133.
9. Clauss, M., C. Sunderkotter, B. Sveinbjornsson, S. Hippenstiel, A. Willuweit, M. Marino, E. Haas, R. Seljelid, P. Scheurich, N. Suttorp, M. Grell, and W. Risau. 2001. A permissive role for tumor necrosis factor in vascular endothelial growth factor-induced vascular permeability. *Blood* 97:1321-1329.
10. Mark, K. S., W. J. Trickler, and D. W. Miller. 2001. Tumor necrosis factor- α induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 297:1051-1058.
11. Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak, and B. R. Bloom. 1995. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 2:561-572.
12. Hultgren, O., H. P. Eugster, J. D. Sedgwick, H. Korner, and A. Tarkowski. 1998. TNF/lymphotoxin- α double-mutant mice resist septic arthritis but display increased mortality in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 161:5937-5942.
13. Kato, K., A. Nakane, T. Minagawa, N. Kasai, K. Yamamoto, N. Sato, and N. Tsuruoka. 1989. Human tumor necrosis factor increases the resistance against *Listeria* infection in mice. *Med Microbiol Immunol* 178:337-346.
14. Bean, A. G., D. R. Roach, H. Briscoe, M. P. France, H. Korner, J. D. Sedgwick, and W. J. Britton. 1999. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol* 162:3504-3511.

15. Roach, D. R., A. G. Bean, C. Demangel, M. P. France, H. Briscoe, and W. J. Britton. 2002. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 168:4620-4627.
16. Bekker, L. G., S. Freeman, P. J. Murray, B. Ryffel, and G. Kaplan. 2001. TNF-alpha controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways. *J Immunol* 166:6728-6734.
17. Ehlers, S. 2003. Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. *Ann Rheum Dis* 62 Suppl 2:ii37-42.
18. Kollias, G., E. Douni, G. Kassiotis, and D. Kontoyiannis. 1999. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 169:175-194.
19. Cope, A. P. 1998. Regulation of autoimmunity by proinflammatory cytokines. *Curr Opin Immunol* 10:669-676.
20. Pasparakis, M., L. Alexopoulou, V. Episkopou, and G. Kollias. 1996. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 184:1397-1411.
21. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10:45-65.
22. Feldmann, M., R. N. Maini, J. Bondeson, P. Taylor, B. M. Foxwell, and F. M. Brennan. 2001. Cytokine blockade in rheumatoid arthritis. *Adv Exp Med Biol* 490:119-127.
23. Mackay, F., J. L. Browning, P. Lawton, S. A. Shah, M. Comiskey, A. K. Bhan, E. Mizoguchi, C. Terhorst, and S. J. Simpson. 1998. Both the lymphotoxin and tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis. *Gastroenterology* 115:1464-1475.
24. Sandborn, W. J. 1999. Severe Ulcerative Colitis. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2:113-118.
25. Chaudhari, U., P. Romano, L. D. Mulcahy, L. T. Dooley, D. G. Baker, and A. B. Gottlieb. 2001. Efficacy and safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: a randomised trial. *Lancet* 357:1842-1847.
26. Hehlhans, T., and K. Pfeffer. 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115:1-20.
27. Bradham, C. A., J. Plumpe, M. P. Manns, D. A. Brenner, and C. Trautwein. 1998. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol* 275:G387-392.
28. Balkwill, F. 2006. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 25:409-416.
29. Wajant, H. 2009. The role of TNF in cancer. *Results Probl Cell Differ* 49:1-15.
30. Pennica, D., G. E. Nedwin, J. S. Hayflick, P. H. Seeburg, R. Derynck, M. A. Palladino, W. J. Kohr, B. B. Aggarwal, and D. V. Goeddel. 1984. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312:724-729.

31. Gray, P. W., B. B. Aggarwal, C. V. Benton, T. S. Bringman, W. J. Henzel, J. A. Jarrett, D. W. Leung, B. Moffat, P. Ng, L. P. Svedersky, and et al. 1984. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* 312:721-724.
32. Bodmer, J. L., P. Schneider, and J. Tschopp. 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 27:19-26.
33. Bazan, J. F. 1993. Emerging families of cytokines and receptors. *Curr Biol* 3:603-606.
34. Fesik, S. W. 2000. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 103:273-282.
35. Vilcek, J., and T. H. Lee. 1991. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 266:7313-7316.
36. Kriegler, M., C. Perez, K. DeFay, I. Albert, and S. D. Lu. 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53:45-53.
37. Tang, P., M. C. Hung, and J. Klostergaard. 1996. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 35:8216-8225.
38. Perez, C., I. Albert, K. DeFay, N. Zachariades, L. Gooding, and M. Kriegler. 1990. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* 63:251-258.
39. Idriss, H. T., and J. H. Naismith. 2000. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 50:184-195.
40. Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March, and D. P. Cerretti. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385:729-733.
41. Moss, M. L., S. L. Jin, M. E. Milla, D. M. Bickett, W. Burkhart, H. L. Carter, W. J. Chen, W. C. Clay, J. R. Didsbury, D. Hassler, C. R. Hoffman, T. A. Kost, M. H. Lambert, M. A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L. K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J. L. Su, J. D. Becherer, and et al. 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385:733-736.
42. Huovila, A. P., A. J. Turner, M. Peltto-Huikko, I. Karkkainen, and R. M. Ortiz. 2005. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci* 30:413-422.
43. Eck, M. J., and S. R. Sprang. 1989. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 264:17595-17605.
44. Jones, E. Y., D. I. Stuart, and N. P. Walker. 1989. Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 338:225-228.
45. Smith, R. A., and C. Baglioni. 1987. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 262:6951-6954.
46. Corti, A., G. Fassina, F. Marcucci, E. Barbanti, and G. Cassani. 1992. Oligomeric tumour necrosis factor alpha slowly converts into inactive forms at bioactive levels. *Biochem J* 284 (Pt 3):905-910.
47. Utsumi, T., T. Takeshige, K. Tanaka, K. Takami, Y. Kira, J. Klostergaard, and R. Ishisaka. 2001. Transmembrane TNF (pro-TNF) is palmitoylated. *FEBS Lett* 500:1-6.

48. Watts, A. D., N. H. Hunt, Y. Wanigasekara, G. Bloomfield, D. Wallach, B. D. Roufogalis, and G. Chaudhri. 1999. A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'. *Embo J* 18:2119-2126.
49. Horiuchi, T., H. Mitoma, S. I. Harashima, H. Tsukamoto, and T. Shimoda. 2010. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)*.
50. Aggarwal, B. B., T. E. Eessalu, and P. E. Hass. 1985. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature* 318:665-667.
51. Loetscher, H., M. Steinmetz, and W. Lesslauer. 1991. Tumor necrosis factor: receptors and inhibitors. *Cancer Cells* 3:221-226.
52. Grell, M., H. Wajant, G. Zimmermann, and P. Scheurich. 1998. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:570-575.
53. Grell, M., E. Douni, H. Wajant, M. Lohden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, W. Lesslauer, G. Kollias, K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83:793-802.
54. Smith, C. A., T. Farrah, and R. G. Goodwin. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76:959-962.
55. Naismith, J. H., and S. R. Sprang. 1998. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci* 23:74-79.
56. Dembic, Z., H. Loetscher, U. Gubler, Y. C. Pan, H. W. Lahm, R. Gentz, M. Brockhaus, and W. Lesslauer. 1990. Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine* 2:231-237.
57. Fiers, W. 1991. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett* 285:199-212.
58. Chan, F. K., H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui, and M. J. Lenardo. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288:2351-2354.
59. Banner, D. W., A. D'Arcy, W. Janes, R. Gentz, H. J. Schoenfeld, C. Broger, H. Loetscher, and W. Lesslauer. 1993. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73:431-445.
60. Naismith, J. H., T. Q. Devine, T. Kohno, and S. R. Sprang. 1996. Structures of the extracellular domain of the type I tumor necrosis factor receptor. *Structure* 4:1251-1262.
61. Moss, M. L., and J. W. Bartsch. 2004. Therapeutic benefits from targeting of ADAM family members. *Biochemistry* 43:7227-7235.
62. Peschon, J. J., J. L. Slack, P. Reddy, K. L. Stocking, S. W. Sunnarborg, D. C. Lee, W. E. Russell, B. J. Castner, R. S. Johnson, J. N. Fitzner, R. W. Boyce, N. Nelson, C. J. Kozlosky, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, D. P. Cerretti, R. J. Paxton, C. J. March, and R. A. Black. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282:1281-1284.
63. Bazzoni, F., and B. Beutler. 1996. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 334:1717-1725.

64. Jiang, Y., J. D. Woronicz, W. Liu, and D. V. Goeddel. 1999. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283:543-546.
65. Hsu, H., J. Xiong, and D. V. Goeddel. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81:495-504.
66. Verma, I. M., J. K. Stevenson, E. M. Schwarz, D. Van Antwerp, and S. Miyamoto. 1995. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 9:2723-2735.
67. Hayden, M. S., and S. Ghosh. 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132:344-362.
68. Micheau, O., and J. Tschopp. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114:181-190.
69. Legler, D. F., O. Micheau, M. A. Doucey, J. Tschopp, and C. Bron. 2003. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Immunity* 18:655-664.
70. Simons, K., and G. van Meer. 1988. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27:6197-6202.
71. Brown, K., S. Gerstberger, L. Carlson, G. Franzoso, and U. Siebenlist. 1995. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 267:1485-1488.
72. Karin, M., and Y. Ben-Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663.
73. Karin, M. 1998. Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses. *Ann N Y Acad Sci* 851:139-146.
74. Davis, R. J. 1999. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Soc Symp* 64:1-12.
75. English, J., G. Pearson, J. Wilsbacher, J. Swantek, M. Karandikar, S. Xu, and M. H. Cobb. 1999. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* 253:255-270.
76. Guo, Y. L., K. Baysal, B. Kang, L. J. Yang, and J. R. Williamson. 1998. Correlation between sustained c-Jun N-terminal protein kinase activation and apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha in rat mesangial cells. *J Biol Chem* 273:4027-4034.
77. Deng, Y., X. Ren, L. Yang, Y. Lin, and X. Wu. 2003. A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* 115:61-70.
78. Chang, L., H. Kamata, G. Solinas, J. L. Luo, S. Maeda, K. Venuprasad, Y. C. Liu, and M. Karin. 2006. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 124:601-613.
79. Shen, H. M., and Z. G. Liu. 2006. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 40:928-939.
80. Ventura, J. J., P. Cogswell, R. A. Flavell, A. S. Baldwin, Jr., and R. J. Davis. 2004. JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species. *Genes Dev* 18:2905-2915.
81. Fiers, W., R. Beyaert, W. Declercq, and P. Vandenabeele. 1999. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18:7719-7730.
82. Ravichandran, K. S., and U. Lorenz. 2007. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol* 7:964-974.

83. Hsu, H., H. B. Shu, M. G. Pan, and D. V. Goeddel. 1996. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84:299-308.
84. Wang, J., H. J. Chun, W. Wong, D. M. Spencer, and M. J. Lenardo. 2001. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13884-13888.
85. Salvesen, G. S., and V. M. Dixit. 1999. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10964-10967.
86. Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15:2922-2933.
87. Schneider-Brachert, W., V. Tchikov, J. Neumeyer, M. Jakob, S. Winoto-Morbach, J. Held-Feindt, M. Heinrich, O. Merkel, M. Ehrenschröder, D. Adam, R. Mentlein, D. Kabelitz, and S. Schütze. 2004. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity* 21:415-428.
88. Morgan, M. J., Y. S. Kim, and Z. G. Liu. 2008. TNF α and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell Res* 18:343-349.
89. Wiegmann, K., S. Schütze, T. Machleidt, D. Witte, and M. Kronke. 1994. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 78:1005-1015.
90. Carpentier, I., B. Coornaert, and R. Beyaert. 2004. Function and regulation of tumor necrosis factor type 2. *Curr Med Chem* 11:2205-2212.
91. Mukhopadhyay, A., J. Suttles, R. D. Stout, and B. B. Aggarwal. 2001. Genetic deletion of the tumor necrosis factor receptor p60 or p80 abrogates ligand-mediated activation of nuclear factor- κ B and of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J Biol Chem* 276:31906-31912.
92. Kim, E. Y., and H. S. Teh. 2001. TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. *J Immunol* 167:6812-6820.
93. Zheng, L., G. Fisher, R. E. Miller, J. Peschon, D. H. Lynch, and M. J. Lenardo. 1995. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377:348-351.
94. Aspölte, R. M., M. M. Eibl, and H. M. Wolf. 2003. Regulation of TCR-mediated T cell activation by TNF-RII. *J Leukoc Biol* 74:572-582.
95. Grell, M., F. M. Becke, H. Wajant, D. N. Mannel, and P. Scheurich. 1998. TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur J Immunol* 28:257-263.
96. Barton, A., S. John, W. E. Ollier, A. Silman, and J. Worthington. 2001. Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians. *Arthritis Rheum* 44:61-65.
97. Komata, T., N. Tsuchiya, M. Matsushita, K. Hagiwara, and K. Tokunaga. 1999. Association of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 53:527-533.
98. Sashio, H., K. Tamura, R. Ito, Y. Yamamoto, H. Bamba, T. Kosaka, S. Fukui, K. Sawada, Y. Fukuda, K. Tamura, M. Satomi, T. Shimoyama, and J. Furuyama. 2002. Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively. *Immunogenetics* 53:1020-1027.

99. Thommesen, L., and A. Laegreid. 2005. Distinct differences between TNF receptor 1- and TNF receptor 2-mediated activation of NFkappaB. *J Biochem Mol Biol* 38:281-289.
100. McFarlane, S. M., G. Pashmi, M. C. Connell, A. F. Littlejohn, S. J. Tucker, P. Vandenabeele, and D. J. MacEwan. 2002. Differential activation of nuclear factor-kappaB by tumour necrosis factor receptor subtypes. TNFR1 predominates whereas TNFR2 activates transcription poorly. *FEBS Lett* 515:119-126.
101. Grell, M., G. Zimmermann, E. Gottfried, C. M. Chen, U. Grunwald, D. C. Huang, Y. H. Wu Lee, H. Durkop, H. Engelmann, P. Scheurich, H. Wajant, and A. Strasser. 1999. Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *Embo J* 18:3034-3043.
102. Tartaglia, L. A., D. Pennica, and D. V. Goeddel. 1993. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem* 268:18542-18548.
103. Li, X., Y. Yang, and J. D. Ashwell. 2002. TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 416:345-347.
104. Fotin-Mleczek, M., F. Henkler, D. Samel, M. Reichwein, A. Hausser, I. Parmryd, P. Scheurich, J. A. Schmid, and H. Wajant. 2002. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J Cell Sci* 115:2757-2770.
105. Bigda, J., I. Beletsky, C. Brakebusch, Y. Varfolomeev, H. Engelmann, J. Bigda, H. Holtmann, and D. Wallach. 1994. Dual role of the p75 tumor necrosis factor (TNF) receptor in TNF cytotoxicity. *J Exp Med* 180:445-460.
106. Van Ostade, X., P. Vandenabeele, J. Tavernier, and W. Fiers. 1994. Human tumor necrosis factor mutants with preferential binding to and activity on either the R55 or R75 receptor. *Eur J Biochem* 220:771-779.
107. Jacobson, M. K., and E. L. Jacobson. 1989. ADP-ribose Transfer Reactions: Mechanisms and Biological Significance. In *Springer Verlag* New York.
108. Haag, F., and F. Koch-Nolte. 1997. ADP-Ribosylation in Animal Tissues: Structure, Function and Biology of Mono(ADP-Ribosyl)transferases and Related Enzymes. In *Plenum Press*, New York.
109. Margarit, S. M., W. Davidson, L. Frego, and C. E. Stebbins. 2006. A steric antagonism of actin polymerization by a salmonella virulence protein. *Structure* 14:1219-1229.
110. Koch-Nolte, F., and F. Haag. 1997. Mono(ADP-ribosyl)transferases and related enzymes in animal tissues. Emerging gene families. *Adv Exp Med Biol* 419:1-13.
111. Ludden, P. W. 1994. Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in procaryotes. *Mol Cell Biochem* 138:123-129.
112. Koch-Nolte, F., S. Kernstock, C. Mueller-Dieckmann, M. S. Weiss, and F. Haag. 2008. Mammalian ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolases. *Front Biosci* 13:6716-6729.
113. Zolkiewska, A., and J. Moss. 1995. Processing of ADP-ribosylated integrin alpha 7 in skeletal muscle myotubes. *J Biol Chem* 270:9227-9233.
114. Honjo, T., Y. Nishizuka, and O. Hayaishi. 1968. Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J Biol Chem* 243:3553-3555.

115. Aktories, K., and J. T. Barbieri. 2005. Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol* 3:397-410.
116. Corda, D., and M. Di Girolamo. 2003. Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *Embo J* 22:1953-1958.
117. Zolkiewska, A., M. S. Nightingale, and J. Moss. 1992. Molecular characterization of NAD:arginine ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11352-11356.
118. Glowacki, G., R. Braren, K. Firner, M. Nissen, M. Kuhl, P. Reche, F. Bazan, M. Cetkovic-Cvrlje, E. Leiter, F. Haag, and F. Koch-Nolte. 2002. The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Sci* 11:1657-1670.
119. Haag, F., F. Koch-Nolte, M. Kuhl, S. Lorenzen, and H. G. Thiele. 1994. Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species. *J Mol Biol* 243:537-546.
120. Braren, R., G. Glowacki, M. Nissen, F. Haag, and F. Koch-Nolte. 1998. Molecular characterization and expression of the gene for mouse NAD⁺:arginine ecto-mono(ADP-ribosyl)transferase, Art1. *Biochem J* 336 (Pt 3):561-568.
121. Glowacki, G., R. Braren, M. Cetkovic-Cvrlje, E. H. Leiter, F. Haag, and F. Koch-Nolte. 2001. Structure, chromosomal localization, and expression of the gene for mouse ecto-mono(ADP-ribosyl)transferase ART5. *Gene* 275:267-277.
122. Laing, S., M. Unger, F. Koch-Nolte, and F. Haag. 2010. ADP-ribosylation of arginine. *Amino Acids*.
123. Kahl, S., M. Nissen, R. Girisch, T. Duffy, E. H. Leiter, F. Haag, and F. Koch-Nolte. 2000. Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. *J Immunol* 165:4463-4469.
124. Haag, F., F. Koch-Nolte, A. Gerber, J. Schroder, and H. G. Thiele. 1997. Rat T cell differentiation alloantigens RT6.1 and RT6.2 are NAD(+)-metabolizing ecto-enzymes that differ in their enzymatic activities. *Transplant Proc* 29:1699-1700.
125. Surprenant, A., F. Rassendren, E. Kawashima, R. A. North, and G. Buell. 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272:735-738.
126. Rassendren, F., G. N. Buell, C. Virginio, G. Collo, R. A. North, and A. Surprenant. 1997. The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* 272:5482-5486.
127. Di Virgilio, F., P. Chiozzi, S. Falzoni, D. Ferrari, J. M. Sanz, V. Venketaraman, and O. R. Baricordi. 1998. Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ* 5:191-199.
128. Seman, M., S. Adriouch, F. Scheuplein, C. Krebs, D. Freese, G. Glowacki, P. Deterre, F. Haag, and F. Koch-Nolte. 2003. NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* 19:571-582.
129. Adriouch, S., S. Hubert, S. Pechberty, F. Koch-Nolte, F. Haag, and M. Seman. 2007. NAD⁺ released during inflammation participates in T cell homeostasis by inducing ART2-mediated death of naive T cells in vivo. *J Immunol* 179:186-194.

130. Nemoto, E., Y. Yu, and G. Dennert. 1996. Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function-associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells. *J Immunol* 157:3341-3349.
131. Okamoto, S., O. Azhipa, Y. Yu, E. Russo, and G. Dennert. 1998. Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function. *J Immunol* 160:4190-4198.
132. Okazaki, I. J., A. Zolkiewska, M. S. Nightingale, and J. Moss. 1994. Immunological and structural conservation of mammalian skeletal muscle glycosylphosphatidylinositol-linked ADP-ribosyltransferases. *Biochemistry* 33:12828-12836.
133. Koch-Nolte, F., M. Kuhl, F. Haag, M. Cetkovic-Cvrlje, E. H. Leiter, and H. G. Thiele. 1996. Assignment of the human and mouse genes for muscle ecto mono (ADPribosyl)transferase to a conserved linkage group on human chromosome 11p15 and mouse chromosome 7. *Genomics* 36:215-216.
134. Balducci, E., K. Horiba, J. Usuki, M. Park, V. J. Ferrans, and J. Moss. 1999. Selective expression of RT6 superfamily in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:337-346.
135. Kefalas, P., B. Saxty, M. Yadollahi-Farsani, and J. MacDermot. 1999. Chemotaxin-dependent translocation of immunoreactive ADP-ribosyltransferase-1 to the surface of human neutrophil polymorphs. *Eur J Biochem* 259:866-871.
136. Paone, G., A. Wada, L. A. Stevens, A. Matin, T. Hirayama, R. L. Levine, and J. Moss. 2002. ADP ribosylation of human neutrophil peptide-1 regulates its biological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8231-8235.
137. Jones, E. M., and A. Baird. 1997. Cell-surface ADP-ribosylation of fibroblast growth factor-2 by an arginine-specific ADP-ribosyltransferase. *Biochem J* 323 (Pt 1):173-177.
138. Saxty, B. A., M. Yadollahi-Farsani, P. D. Upton, S. R. Johnstone, and J. MacDermot. 2001. Inactivation of platelet-derived growth factor-BB following modification by ADP-ribosyltransferase. *Br J Pharmacol* 133:1219-1226.
139. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
140. Burnette, W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203.
141. Engvall, E., and P. Perlmann. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871-874.
142. Hutchison, C. A., 3rd, S. Phillips, M. H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke, and M. Smith. 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J Biol Chem* 253:6551-6560.
143. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
144. Koch, F., H. G. Thiele, and M. G. Low. 1986. Release of the rat T cell alloantigen RT-6.2 from cell membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Exp Med* 164:1338-1343.

145. Krebs, C., W. Koestner, M. Nissen, V. Welge, I. Parusel, F. Malavasi, E. H. Leiter, R. M. Santella, F. Haag, and F. Koch-Nolte. 2003. Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine. *Anal Biochem* 314:108-115.
146. Videm, V., and E. Strand. 2004. Changes in neutrophil surface-receptor expression after stimulation with FMLP, endotoxin, interleukin-8 and activated complement compared to degranulation. *Scand J Immunol* 59:25-33.
147. Mullett, W. M., E. P. Lai, and J. M. Yeung. 2000. Surface plasmon resonance-based immunoassays. *Methods* 22:77-91.
148. Hori, T., T. Uchiyama, M. Tsudo, H. Umadome, H. Ohno, S. Fukuhara, K. Kita, and H. Uchino. 1987. Establishment of an interleukin 2-dependent human T cell line from a patient with T cell chronic lymphocytic leukemia who is not infected with human T cell leukemia/lymphoma virus. *Blood* 70:1069-1072.
149. Cole, A. T., N. M. Garlick, A. M. Galvin, C. J. Hawkey, and R. A. Robins. 1995. A flow cytometric method to measure shape change of human neutrophils. *Clin Sci (Lond)* 89:549-554.
150. Smith, C. W. 1993. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Semin Hematol* 30:45-53; discussion 54-45.
151. Kharadia, S. V., and D. J. Graves. 1987. Relationship of phosphorylation and ADP-ribosylation using a synthetic peptide as a model substrate. *J Biol Chem* 262:17379-17383.
152. Matsuura, R., Y. Tanigawa, M. Tsuchiya, K. Mishima, Y. Yoshimura, and M. Shimoyama. 1988. Preferential ADP-ribosylation of arginine-3 in synthetic heptapeptide Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly. *Biochem J* 253:923-926.
153. Hengel, S. M., S. A. Shaffer, B. L. Nunn, and D. R. Goodlett. 2009. Tandem mass spectrometry investigation of ADP-ribosylated kemptide. *J Am Soc Mass Spectrom* 20:477-483.
154. Plumb, R. S., K. A. Johnson, P. Rainville, B. W. Smith, I. D. Wilson, J. M. Castro-Perez, and J. K. Nicholson. 2006. UPLC/MS(E); a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20:1989-1994.
155. Carballo, E., W. S. Lai, and P. J. Blackshear. 1998. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- α production by tristetraprolin. *Science* 281:1001-1005.
156. Pocsik, E., E. Duda, and D. Wallach. 1995. Phosphorylation of the 26 kDa TNF precursor in monocytic cells and in transfected HeLa cells. *J Inflamm* 45:152-160.
157. Shibata, H., Y. Yoshioka, A. Ohkawa, K. Minowa, Y. Mukai, Y. Abe, M. Taniai, T. Nomura, H. Kayamuro, H. Nabeshi, T. Sugita, S. Imai, K. Nagano, T. Yoshikawa, T. Fujita, S. Nakagawa, A. Yamamoto, T. Ohta, T. Hayakawa, T. Mayumi, P. Vandenabeele, B. B. Aggarwal, T. Nakamura, Y. Yamagata, S. Tsunoda, H. Kamada, and Y. Tsutsumi. 2008. Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor- α antagonist. *J Biol Chem* 283:998-1007.
158. Muppidi, J. R., J. Tschopp, and R. M. Siegel. 2004. Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity* 21:461-465.
159. Zolkiewska, A., and J. Moss. 1993. Integrin α 7 as substrate for a glycosylphosphatidylinositol-anchored ADP-ribosyltransferase on the surface of skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 268:25273-25276.

160. Spriggs, D. R., K. Imamura, C. Rodriguez, E. Sariban, and D. W. Kufe. 1988. Tumor necrosis factor expression in human epithelial tumor cell lines. *J Clin Invest* 81:455-460.
161. Higuchi, M., T. Horiuchi, T. Sawabe, S. Yoshizawa, K. Nagasawa, and Y. Niho. 1999. Establishment and characterization of a Fas-resistant T cell line. *Acta Haematol* 102:22-30.
162. Flores, I., D. R. Jones, and I. Merida. 2000. Changes in the balance between mitogenic and antimitogenic lipid second messengers during proliferation, cell arrest, and apoptosis in T-lymphocytes. *Faseb J* 14:1873-1875.
163. Darzynkiewicz, Z., B. Williamson, E. A. Carswell, and L. J. Old. 1984. Cell cycle-specific effects of tumor necrosis factor. *Cancer Res* 44:83-90.
164. Falk, R. J., R. S. Terrell, L. A. Charles, and J. C. Jennette. 1990. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4115-4119.
165. Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7:678-689.
166. Zhou, H., T. W. Huiatt, R. M. Robson, S. W. Sernett, and D. J. Graves. 1996. Characterization of ADP-ribosylation sites on desmin and restoration of desmin intermediate filament assembly by de-ADP-ribosylation. *Arch Biochem Biophys* 334:214-222.
167. Fu, Z. Q., R. W. Harrison, C. Reed, J. Wu, Y. N. Xue, M. J. Chen, and I. T. Weber. 1995. Model complexes of tumor necrosis factor-alpha with receptors R1 and R2. *Protein Eng* 8:1233-1241.
168. Yamagishi, J., H. Kawashima, N. Matsuo, M. Ohue, M. Yamayoshi, T. Fukui, H. Kotani, R. Furuta, K. Nakano, and M. Yamada. 1990. Mutational analysis of structure--activity relationships in human tumor necrosis factor-alpha. *Protein Eng* 3:713-719.
169. Zhang, X. M., I. Weber, and M. J. Chen. 1992. Site-directed mutational analysis of human tumor necrosis factor-alpha receptor binding site and structure-functional relationship. *J Biol Chem* 267:24069-24075.
170. Loetscher, H., D. Stueber, D. Banner, F. Mackay, and W. Lesslauer. 1993. Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. *J Biol Chem* 268:26350-26357.
171. Mukai, Y., H. Shibata, T. Nakamura, Y. Yoshioka, Y. Abe, T. Nomura, M. Taniai, T. Ohta, S. Ikemizu, S. Nakagawa, S. Tsunoda, H. Kamada, Y. Yamagata, and Y. Tsutsumi. 2009. Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant. *J Mol Biol* 385:1221-1229.
172. Van Ostade, X., P. Vandenabeele, B. Everaerd, H. Loetscher, R. Gentz, M. Brockhaus, W. Lesslauer, J. Tavernier, P. Brouckaert, and W. Fiers. 1993. Human TNF mutants with selective activity on the p55 receptor. *Nature* 361:266-269.
173. Barbara, J. A., W. B. Smith, J. R. Gamble, X. Van Ostade, P. Vandenabeele, J. Tavernier, W. Fiers, M. A. Vadas, and A. F. Lopez. 1994. Dissociation of TNF-alpha cytotoxic and proinflammatory activities by p55 receptor- and p75 receptor-selective TNF-alpha mutants. *Embo J* 13:843-850.

174. Vercammen, D., P. Vandenabeele, W. Declercq, M. Van de Craen, J. Grooten, and W. Fiers. 1995. Cytotoxicity in L929 murine fibrosarcoma cells after triggering of transfected human p75 tumour necrosis factor (TNF) receptor is mediated by endogenous murine TNF. *Cytokine* 7:463-470.
175. Ganesan, A. K., D. W. Frank, R. P. Misra, G. Schmidt, and J. T. Barbieri. 1998. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S ADP-ribosylates Ras at multiple sites. *J Biol Chem* 273:7332-7337.
176. Paone, G., L. A. Stevens, R. L. Levine, C. Bourgeois, W. K. Steagall, B. R. Gochuico, and J. Moss. 2006. ADP-ribosyltransferase-specific modification of human neutrophil peptide-1. *J Biol Chem* 281:17054-17060.
177. Lang, A. E., G. Schmidt, A. Schlosser, T. D. Hey, I. M. Larrinua, J. J. Sheets, H. G. Mannherz, and K. Aktories. 2010. *Photobacterium luminescens* toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. *Science* 327:1139-1142.
178. Osago, H., M. Terashima, N. Hara, K. Yamada, and M. Tsuchiya. 2008. A new detection method for arginine-specific ADP-ribosylation of protein -- a combinational use of anti-ADP-ribosylarginine antibody and ADP-ribosylarginine hydrolase. *J Biochem Biophys Methods* 70:1014-1019.

8. Anhang

8.1 Massenspektrometrische Daten

Ergebnisse der LC/MS-Untersuchungen von V8-verdaulichem rekombinantem, unmodifiziertem bzw. ADP-ribosyliertem TNF (ART1-katalysierte ADP-Ribosylierung).

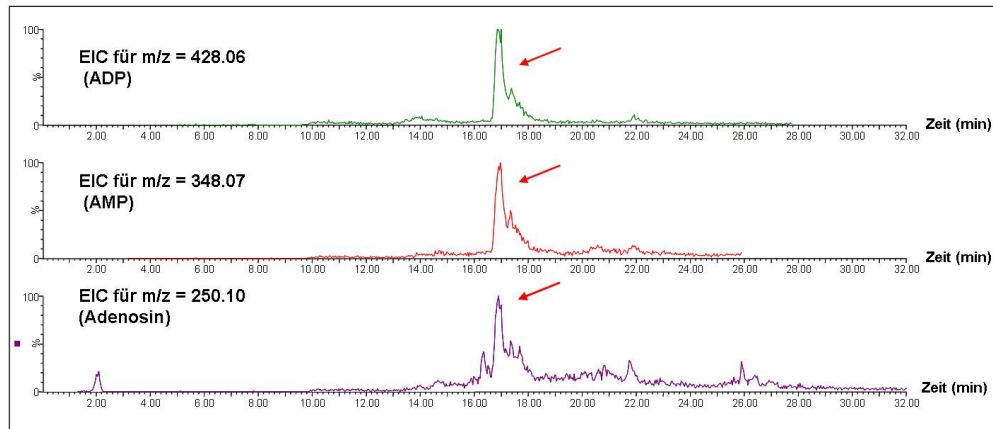


Abb. A1 extrahierte LC/MS^E-Chromatogramme der Massen der ADP-Ribosegruppe zugeordneten Fragmente: Nach V8-Verdau (5 ng/ μ LV8, μ N, 37 °C) von ADP-ribosyliertem TNF wurden die Peptidfragmente über eine UPLC-Säule aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Dargestellt sind die aus dem fragmentierten Ionen-Chromatogramm extrahierten Ionen-Chromatogramme (EIC = *extraxted ion current*) für die Massen der ADP-Ribose-Fragmente ADP, AMP und Adenosin (s. Tabelle 5. 2). Die roten Pfeile weisen auf die Elutionszeit hin (ca. 17 min), bei der alle drei Massen eluiert wurden. Die unmodifizierte TNF-Probe wurde nicht gezeigt.

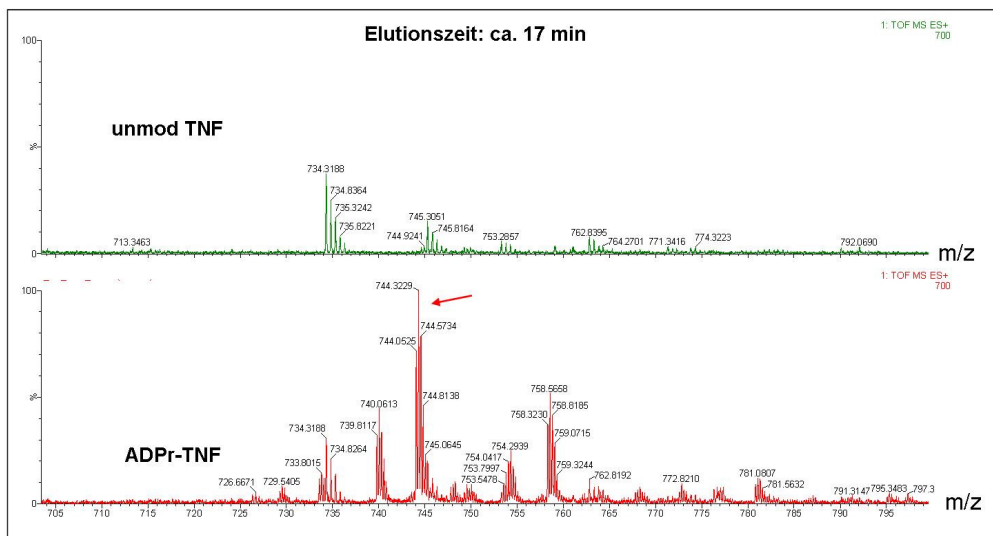


Abb. A2 Kombinierte LC/MS-Spektren (Elutionszeit ca. 17 min) der unmodifizierten und ADP-ribosylierten TNF-Proben: Nur Ausschnitte der MS-Spektren, die bei niedriger Fragmentierungsenergie, aufgenommen wurden, wurden dargestellt. In der ADP-ribosylierten TNF-Probe (unteres Spektrum) wurde ein Signal mit $m/z = 744,74$ (4x geladenes Vorläufer-Ion) detektiert (roter Pfeil), das in der unmodifizierten TNF-Probe nicht erscheint (oberes Spektrum).

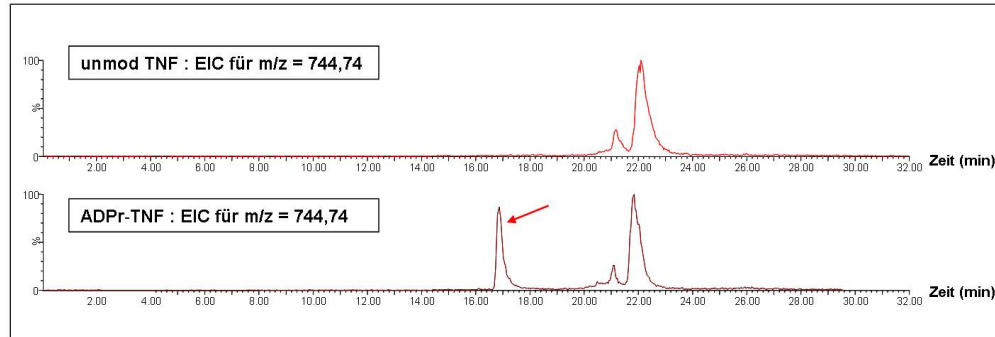


Abb. A3 Extrahierte LC/MS-Chromatogramme von Vorläufer-Ionen mit $m/z = 744 \pm 3$ von unmodifiziertem TNF (oberes Chromatogramm) und ADP-ribosyliertem TNF (unteres Chromatogramm): In der ADP-ribosylierten TNF-Probe (unten) wurde ein Signal bei ca. 17 min detektiert (roter Pfeil), das in der unmodifizierten TNF-Probe nicht erscheint (oben). EIC = *extraxted ion current*

Ergebnisse der LC/MS-Untersuchungen von V8/Trypsin-doppeltverdaulichem rekombinantem, unmodifiziertem bzw. ADP-ribosyliertem TNF (ART2-katalysierte ADP-Ribosylierung).

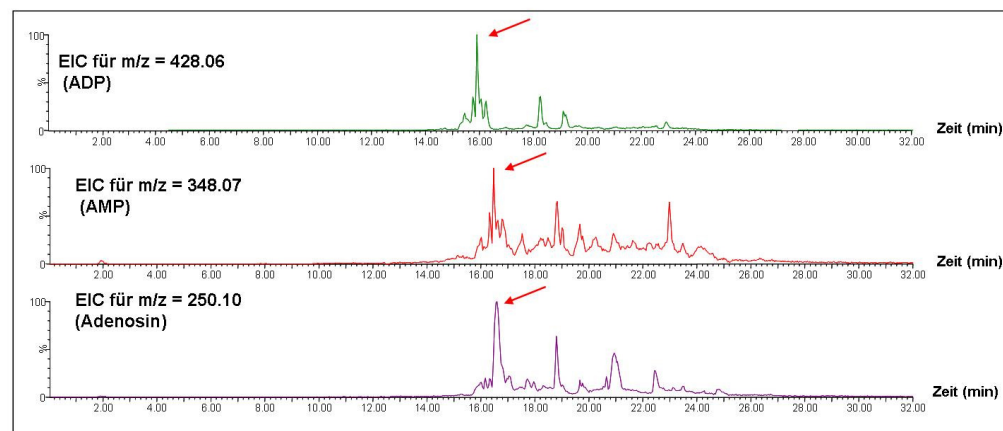


Abb. A4 extrahierte LC/MS^E-Chromatogramme der Massen der ADP-Ribosegruppe zugeordneten Fragmente: Nach V8/Trypsin-Doppeilverdau (je 5 ng/ μ LV8 und Trypsin, $\bar{u}$ N, 37 °C) von ADP-ribosyliertem TNF wurden die Peptidfragmente über eine UPLC-Säule aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Dargestellt sind die aus dem fragmentierten Ionen-Chromatogramm extrahierten Ionen-Chromatogramme (EIC = *extraxted ion current*) für die Massen der ADP-Ribose-Fragmente ADP, AMP und Adenosin (s. Tabelle 5. 2). Die roten Pfeile weisen auf die Elutionszeit hin (ca. 16,5 min), bei der alle drei Massen eluiert wurden. Die unmodifizierte TNF-Probe wurde nicht gezeigt.

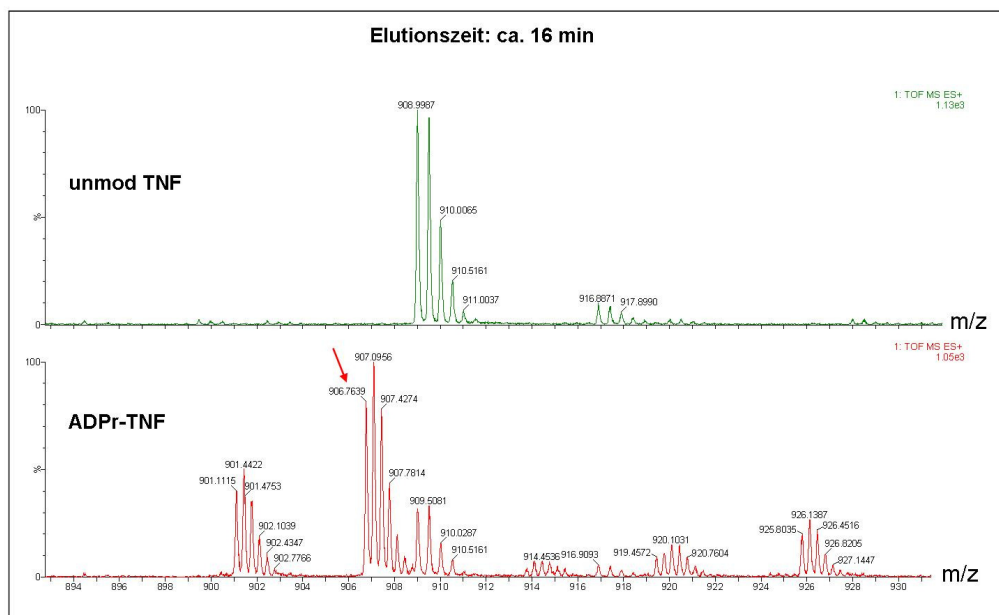


Abb. A5 Kombinierte LC/MS-Spektren (Elutionszeit ca. 16,5 min) der unmodifizierten und ADP-ribosylierten TNF-Proben: Nur Ausschnitte der MS-Spektren, die bei niedriger Fragmentierungsenergie, aufgenommen wurden, wurden dargestellt. In der ADP-ribosylierten TNF-Probe (unteres Spektrum) wurde ein Signal mit m/z = 906,72 (3x geladenes Vorläufer-Ion) detektiert (roter Pfeil), das in der unmodifizierten TNF-Probe nicht erscheint (oberes Spektrum).

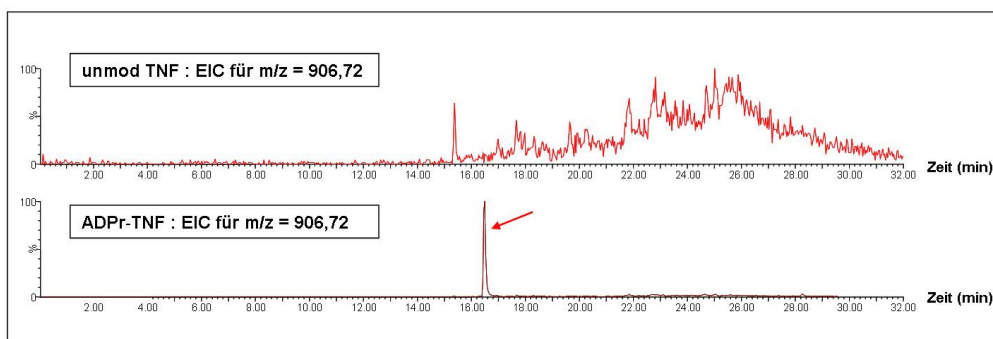


Abb. A6 Extrahierte LC/MS-Chromatogramme von Vorläufer-Ionen mit m/z = 906,72 $\pm$ 3 von unmodifiziertem TNF (oberes Chromatogramm) und ADP-ribosyliertem TNF (unteres Chromatogramm): In der ADP-ribosylierten TNF-Probe (unten) wurde ein Signal bei ca. 16,5 min detektiert (roter Pfeil), das in der unmodifizierten TNF-Probe nicht erscheint (oben). EIC = *extraxted ion current*

8.2 Abkürzungen und Anglizismen

3D	Dreidimensional
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADPR	ADP-Ribose
ADPr	ADP-ribosyliert
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
Ak	Antikörper
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ANCA	<i>anti-neutrophil cytoplasmic antibodies</i>
Arg	Arginin
ARH	ADP-Ribosylhydrolase
ART	ADP-Ribosyltransferase
ATF2	<i>Activating transcription factor 2</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Caspase	<i>CysteinyI-aspartate-specific proteinase</i>
cD	zytoplasmatische Domäne (<i>cytoplasmatic domain</i>)
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene (<i>Cluster of Differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cFLIP	<i>cellular FLICE inhibitory protein</i>
CID	Mechanismus, der in der Massenspektrometrie angewandt wird, um Molekül-Ionen in der Gasphase zu fragmentieren (<i>collision induced dissociation</i>)
Coating	Beschichtung
Cox-2	Cyclo-Oxygenase 2
CRD	Cystein-reiche Domänen

CSF	<i>colony-stimulating factor</i>
CT	Cholera-Toxin aus <i>Vibrio cholerae</i>
Da	Dalton
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Zellkulturmedium (<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphate
DT	Diphtherie-Toxin aus <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF2	Elongationsfaktor 2
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EIC	extrahiertes Ionen-Chromatogramm (<i>extracted ion current</i>)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNAD	ethenoNAD
ERK	<i>extracellular regulated kinase</i>
ExoS	Exoenzym S aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EZR	Extrazellularraum
Fab	Antigen-bindendes Fragment
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
Fc	Fragment mit konstanten Teilen eines Antikörpers
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FGF-2	<i>Fibroblast-growth factor-2</i>
FITC	Fluoresceinthiocyanat
FL	<i>full length</i>

FSC	Vorwärtsstreuung (<i>forward scatter</i>)
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GZL	Gesamtzelllysat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
<i>High-Affinity-Rezeptor</i>	hochaffiner Rezeptor
hIL-15	humanes Interleukin-15
HNP-1	<i>human neutrophil peptide 1</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IKK	<i>inhibitor of κB kinase</i>
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
I κ B	<i>inhibitor of κBs</i>
JNK	<i>c-Jun NH2-terminal kinase</i>
k.o.	<i>knockout</i>
ka	Assoziationsrate
K _D	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
kd	Dissoziationsrate
kDa	kilo Dalton
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LC	Flüssigkeitschromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
<i>Leader-Sequenz</i>	Leitsequenz
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
<i>lipid rafts</i>	cholesterinreiche Mikrodomänen in Zellmembranen werden <i>lipid rafts</i> genannt
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobakterium Tuberculosis</i>
m/z	Masse zu Ladung-Verhältnis

MAP2K	MAPK Kinase
MAP3K	MAPK Kinase Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MES	2-Morpholinoehansulfonsäure
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
mTNF	membranständiges TNF
MWOC	molekulare Ausschlussgrenze (<i>molecular weight cut off</i>)
NAD	β-Nikotinamidadenindinukleotid
NADase	NAD-Glykohydrolase
NC	Nitrocellulose
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NICD	NAD induzierter Zelltod (<i>NAD induced cell death</i>)
NK	Natürliche Killerzellen
nSMase	neutrale Sphingomyelinase
NP-40	Nonyl-Phenoxypolyethoxyethanol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribosylpolymerase
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pdb	Datenbank für 3D-Strukturdaten von Proteinen und Nukleinsäuren (<i>Protein Data Bank</i>)
PDGF-BB	<i>platelet-derived growth factor-BB</i>
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd

pH	pH-Wert: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration an H_3O^+ -Ionen
PI	Propidiumiodid
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PLAD	<i>pre-ligand binding assembly domain</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat, ein Phorbolester
PMN	Polymorphnukleäre Zellen
<i>Priming</i>	Als <i>Priming</i> wird die Voraktivierung von Zellen bezeichnet, die dadurch leichter/besser auf weitere Stimulation ansprechen
PRR	Rezeptor des angeborenen Immunsystems, der konservierte Strukturen von Pathogenen erkennt (<i>pattern recognition receptor</i>)
PTM	Posttranslationale Modifikation
RHD	<i>Rel homology domain</i>
rhTNF	rekombinantes humanes TNF
RIP1	<i>receptor interacting protein 1</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
Rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RPMI	Zellkulturmedium benannt nach <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Response Units</i>
Rzpd	Ressourcenzentrum Primärdatenbank
S	Svedberg sedimentation coefficient
SA	Streptavidin
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>second messenger</i>	sekundärer Botenstoff
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
<i>Shedding</i>	als <i>Shedding</i> wird die Enzym-katalysierte Abspaltung von Zelloberflächenmolekülen bezeichnet
SMase	Sphingomyelinase
SPR	Oberflächen-Plasmon-Resonanz (<i>surface-plasmon-resonance</i>)

SpvB	<i>Salmonella enterica</i> SpvB Toxin
SSC	Seitwärtsstreuung (<i>side scatter</i>)
sTNF	lösliches (<i>soluble</i>) TNF
TACE	<i>TNF-α converting enzyme</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tBid	<i>truncated</i> Bid
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
T _H 1	T-Helferzellen1
THD	TNF-Homologie-Domäne
TIM	TRAF-interagierendes Motiv
TM	Transmembran
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TRADD	<i>TNFR-associated death domain protein</i>
TRAF	<i>TNF-receptor associated factor</i>
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
üN	über Nacht
UPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit gesteigerter Leistung (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>)
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp

8.3 Einbuchstaben-Bezeichnungen der Aminosäuren

Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Asparaginsäure	D
Cystein	C
Glutamin	Q
Glutaminsäure	E
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V