

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Immunologie

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Fleischer

Die posttranslationale Modifikation des humanen Tumor-Nekrose-Faktor durch ADP-Ribose

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Mareike Pilz
aus Hamburg

Hamburg 2015

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 11.01.2016

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Friedrich Haag
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Thomas Braulke

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Die Tumor Nekrose Faktor (TNF)-/ TNF-Rezeptor (R)- Superfamilie	6
1.1.1 Die Interaktionen der TNF-/ TNFR-Superfamilie	7
1.2 Tumor-Nekrose-Faktor	10
1.2.1 Die Rolle von TNF im Immunsystem	10
1.2.2 Die klinische Relevanz von TNF	11
1.3 ADP-Ribosylierung	12
1.3.1 ADP-Ribosyltransferasen	13
1.3.2 Die Familie der Mono-ADP-Ribosyltransferasen	14
1.3.3 Die humane ADP-Ribosyltransferase 1 (hART1)	16
1.3.4 Nachweis der ADP-Ribosylierung	18
1.4 TNF und hART1	20
1.4.1 Zielsetzung der Arbeit	21
2. Materialien	22
2.1 Laborgeräte	22
2.2 Verbrauchsmaterialien	23
2.3 Zelllinien	24
2.4 Bakterienstämme	24
2.5 Antikörper	24
2.6 Chemikalien	25
2.7 Enzyme	26
2.8 Primer	27
2.9 Plasmide	27
2.10 Puffer und Lösungen	28
2.10.1 Zellkulturmedien und Lösungen	28
2.10.2 Bakterienkulturmedien	28
2.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot	29
2.11 Reagenzsysteme (Kits)	30
3. Methoden	31
3.1 Methoden der Zellbiologie	31
3.1.1 Kultivierung von HEK293-Zellen	31
3.1.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	31
3.2 Proteinbiochemische und Immunologische Methoden	32
3.2.1 "Fluorescence Activated Cell Sorting" (FACS)-Analysen	32
3.2.2 Immunpräzipitation	33
3.2.3 Herstellung von Zelllysaten	33
3.2.4 SDS-PAGE	34
3.2.5 Western Blot-Analysen	34

3.2.6	Silberfärbung	35
3.2.7	Immunodetektion	35
3.2.8	Chemilumineszenz-Detektion und Autoradiographie	35
3.3	Methoden der Molekularbiologie	36
3.3.1	PCR-Primer Design und Zielgerichtete Mutagenese	36
3.3.2	Agarosegel-Elektrophorese	37
3.3.3	Restriktionsenzymatischer Verdau von DNA-Fragmenten	37
3.3.4	Ligation von DNA-Fragmenten	38
3.3.5	Transformation von Bakterien und Plasmidpräparation	38
3.3.6	DNA-Sequenzierung nach Sanger	38
3.4	ADP-Ribosylierungen	39
3.4.1	Nachweis der etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen im FACS und im Western Blot	40
3.4.2	ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen mittels radioaktiv markiertem NAD ⁺	41
4.	Ergebnisse	43
4.1	Expression von hART1 und TNF auf HEK293-Zellen	43
4.1.1	Expression und Detektion von TNF auf HEK293-Zellen	43
	<i>Nachweis der Expression mittels FACS</i>	43
	<i>Nachweis der Expression mittels Western Blot</i>	44
4.1.2	Expression und Aktivität von hART1 auf HEK293-Zellen	47
	<i>Nachweis der Expression mittels FACS</i>	47
	<i>Nachweis der GPI-Verankerung der hART1 nach transienter Transfektion</i>	48
4.2.	Analyse von TNF als Zielprotein der hART1 auf HEK293-Zellen	49
4.2.1	Nachweis der ADP-Ribosyltransferase-Aktivität von hART1 auf HEK 293-Zellen	49
	<i>Nachweis der etheno-ADP-Ribosylierung von Oberflächenproteinen mittels FACS</i>	49
4.3.	Analyse von ADP-Ribosylierungsstellen im sezernierten Teil des TNF	51
4.3.1	Identifikation der ADP-Ribosylierungsstelle von TNF durch zielgerichtete Mutagenese	52
4.3.1.1	Zielgerichtete Mutagenese nicht konservierter Arginine im TNF	52
4.3.1.2	Expression und Detektion der TNF-Einzelmutanten auf HEK293-Zellen	53
	<i>Nachweis der Expression mittels FACS</i>	53
4.3.1.3	ADP-Ribosylierung von TNF durch die hART1	55
	<i>Nachweis der ADP-Ribosylierung von TNF auf HEK293-Zellen mittels radioaktiv markiertem NAD</i>	55
4.3.2	Analyse von ADP-Ribosylierungsstellen im membranständigen „Stiel“ des TNF	60
4.3.2.1	Klonierung von TNF in den pGFP.HA Vektor und in	

	<i>in vitro</i> -Mutagenese von Argininen des Stielbereichs	60
4.3.2.2	Expression und Detektion der TNF-Einzelmutanten auf HEK293-Zellen	62
	<i>Nachweis der Expression mittels FACS</i>	62
4.3.2.3	ADP-Ribosylierung von TNF durch die hART1	63
	<i>Nachweis der ADP-Ribosylierung von TNF auf HEK293-Zellen mittels radioaktiv markiertem NAD</i>	63
	<i>Nachweis der ADP-Ribosylierung von TNF auf HEK293-Zellen mit dem 1G4-Antikörper</i>	67
5.	Diskussion	70
5.1	TNF als Zielprotein der hART1 auf HEK293-Zellen	70
5.2	Lokalisation der ADP-Ribosylierungsstellen im TNF	71
5.3	Zusammenfassung und Ausblick	73
6.	Zusammenfassung	76
6.1	Abstract	77
7.	Anhang	78
7.1	Abkürzungen und Anglizismen	78
7.2	Einbuchstaben-Bezeichnungen der Aminosäuren	82
8.	Literaturverzeichnis	83
9.	Danksagung	90
10.	Lebenslauf	91
11.	Eidesstattliche Versicherung	93

1. Einleitung

1.1 Die TNF-/ TNFR-Superfamilie

Die uns heute bekannten Mitglieder der TNF-Superfamilie bilden eine Gruppe von membrangebundenen oder freien Liganden, der eine korrespondierende Familie aus spezifischen Zelloberflächenrezeptoren (TNF-Rezeptoren (TNFR)) gegenübersteht. Typische Sequenz und Strukturhomologien in den Ektodomänen kennzeichnen die Familienzugehörigkeit. Aktuell zählt die TNF-/ TNFR-Superfamilie mehr als 40 Mitglieder [Zhang 2004; Hehlhans & Pfeffer 2005]. Diese werden größtenteils von Immunzellen exprimiert und übernehmen eine essentielle Rolle bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Ihre Aktivität ist in Säugetieren bei einer Vielzahl biologisch-immunologischer Funktionen notwendig. Dazu zählen unter anderem die effektive Abwehr pathogener Keime und die Regulation der Immunantwort, sowie die Organogenese und Homöostase sekundär lymphatischer Organe und die Differenzierung lymphoider und natürlicher Killerzellen [Locksley et al.2001; Kuprash et al. 2002; Ware 2005].

Die Liganden der TNF-Superfamilie sind Typ II-Transmembranproteine. Zu den bekanntesten Vertretern gehören TNF, Lymphotoxin (LT)- α (Synonym: TNF- β), LT- β und Fas Ligand. Sie besitzen eine gemeinsame konservierte C-terminale Domäne, welche als „TNF-homology domain“ (THD) bezeichnet wird. Mit ihr wird die Rezeptorbindung vermittelt [Berg et al. 2007]. Die Liganden bilden trimere Komplexe durch Selbstassoziation über nicht-kovalente Bindungen [Eck et al. 1988; Idriss & Naismith 2000]. In der Regel handelt es sich um Homotrimere, wobei TNF- β sowohl mit dem membranständigen LT- β an der Oberfläche aktivierter lymphozytärer Zellen heterotrimere Komplexe bildet, als auch als TNF- β -Homotrimer primär sezerniert wird [Browning et al.1993]. Die Proteine sind nur in trimerer Konformation biologisch aktiv. Ihre Bioaktivität hängt auch davon ab, ob sie als membrangebundene oder lösliche Form interagieren. Zum Beispiel kommt es bei der Bindung der freigesetzten Formen von TNF, „Cluster of differentiation“-95-ligand (CD95L) und CD40L an TNFR2, CD95 und CD40 nur zu einer schwachen Aktivierung des Rezeptors [Berg et al. 2007]. Die Mitglieder der TNFR-Superfamilie sind Typ I-Transmembranproteine. Sie tragen charakteristisch eine bis zu sechs cysteinreichen Domänen (CRDs) zur

Ausbildung intrazellulärer Disulfidbrücken [Naismith & Sprang 1998]. Die Rezeptoren bilden, wie ihre Liganden, Trimere. Einige Vertreter der TNFR-Superfamilie, wie TNFR1, TNFR2 oder CD40, assoziieren Liganden-unabhängig.

1.1.1 Die Interaktionen der TNF-/TNFR-Superfamilie

Die Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor sind nicht auf ein einzelnes Paar beschränkt. Zum Beispiel steht TNF in membrangebundener und löslicher Form mit dem primär sezernierten Homotrimer TNF- β in Konkurrenz um seine beiden Rezeptoren [Stauber & Aggarwal 1989].

Man kann die Mitglieder der TNFR-Superfamilie aufgrund ihrer intrazellulären Domänen in drei Hauptgruppen unterteilen [Hehlgans & Pfeffer 2005]. Die Rezeptoren der ersten Gruppe, zum Beispiel TNFR1 oder CD95 (FAS), tragen in ihrer zytoplasmatischen Domäne sogenannte Todesdomänen („Death domain“ = DD) und können Apoptose induzieren. Zur zweiten Gruppe gehören unter anderem TNFR2, LT- β -Rezeptor (LT β R) und „Herpes virus entry mediator“ (HVEM). Diese tragen intrazelluläre „TRAF interacting motifs“ (TIM)-Domänen und aktivieren verschiedene Signalwege. Die Rezeptoren der dritten Gruppe, in die zum Beispiel Decoyrezeptor (DcR) 1 und 3 oder Osteoprotegerin (OPG) eingeordnet werden, tragen keine funktionalen intrazellulären Signalmotive und können keine Signale in das Zellinnere weiterleiten.

Die Aktivierung der Rezeptoren der TNFR-Superfamilie führt zu einer Anlagerung verschiedenster Adaptermoleküle, die wiederum zahlreiche Signalwege aktivieren können. Die Rekrutierung von Adaptermolekülen mit Todesdomäne wie „Fas-associated death domain protein“ (FADD) und „TNFR-associated protein with death domain“ (TRADD) kann zur Aktivierung apoptotischer Signaltransduktionskaskaden führen, während die Rekrutierung von Proteinen der „TNFR-associated factor“ (TRAF)-Familie zur Aktivierung antiapoptotischer, proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie Nuclear factor kappa B (NF κ B) führt [Dempsey et al. 2003].

1.2 Tumor-Nekrose-Faktor

Die namentliche Identifizierung des Proteins nahm 1975 seinen Anfang, als Carswell und Kollegen im Serum von Lipopolysaccharid (LPS)-stimulierten Mäusen einen von Makrophagen und Lymphozyten produzierten Faktor

entdeckten, der zur Nekrose von Tumorzellen im Tierversuch führte. Aufgrund dieser Wirkung erhielt der Faktor seinen Namen „Tumor-Nekrose-Faktor“ [Carswell et al. 1975].

Ein Jahrzehnt später erfolgte die Klonierung der komplementären DNA (cDNA) und die rekombinante Produktion von TNF in *E.coli* [Pennica et al. 1984; Aggarwal et al. 1985]. Zu gleicher Zeit konnte ein Faktor namens Kachektin aus Mäusemakrophagen isoliert werden [Beutler et al. 1985b]. Die Namensgebung erfolgte aufgrund seiner Eigenschaft eine katabole Stoffwechsellage zu verstärken und somit eine Kachexie zu begünstigen. Die Sequenzierung der beiden Faktoren bewies, dass Kachektin mit TNF identisch war [Beutler et al. 1985a]. Ausserdem wurde eine starke Homologie zu LT- α festgestellt, die den ersten Anhalt für eine mögliche Gen-Superfamilie gab, die uns heute als TNF-/ TNFR-Superfamilie bekannt ist [Pennica et al. 1984].

Zahlreiche Publikationen folgten, die weitere zentrale Eigenschaften von TNF aufdeckten. Die systemische Verabreichung von LPS und TNF im Tierversuch zeigte, dass TNF als endogener Mediator des endotoxischen Schocks fungiert [Beutler et al. 1985c; Tracey et al. 1986]. Ausserdem besitzt TNF eine starke proinflammatorische Wirkung, die unter anderem zur Induktion weiterer Entzündungsmediatoren wie Prostaglandin (PG) E₂ und Kollagenase führt und die Adhärenz neutrophiler Granulozyten verstärkt [Dayer et al. 1985; Gamble et al. 1985]. Die wichtigsten Produzenten von TNF sind aktivierte Makrophagen und Monozyten, insbesondere nach LPS-Stimulation [Higuchi et al. 1990; Beutler et al. 1985b]. TNF wird zusätzlich von Mastzellen und Lymphozyten [Giroir et al. 1992a], sowie von Parenchymzellen nicht-hämatopoetischer Gewebe wie Niere, Darm und Herz ausgeschüttet [Baud et al. 1989; Calabrese et al. 2004; Giroir et al. 1992b]. Die Gen-Expression von TNF wird durch LPS, andere bakterielle Produkte, virale Komponenten und TNF selbst stimuliert. Das humane TNF-Gen ist zusammen mit TNF- β (LT- α) auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 im Bereich des Haupthistokompatibilitätskomplexes lokalisiert. Es zählt etwa 3000 Basenpaare und wird durch drei Introns unterbrochen [Nedwin et al. 1985; Carroll et al. 1987]. Das membranständige TNF weist 233 Aminosäuren auf und hat ein Molekulargewicht von 25,6 kDa [Kriegler et al. 1988].

TNF liegt, wie die Mehrheit der TNF-Ligandenfamilie, in biologisch aktiver Form als Homotrimer vor [Smith & Baglioni 1987]. Die dreidimensionale Struktur des

Trimers gleicht einer Pyramide [Eck et al. 1988; Eck & Sprang 1989; Reed et al. 1997]. Sowohl die C- als auch die N-Termini der Monomere befinden sich nahe der Basis der Pyramide. Die Rezeptorbindungsstellen befinden sich an den Kontaktstellen der Monomere ebenfalls an der Basis des Trimers [Eck & Sprang 1989; Banner et al. 1993; Zhang G. 2004]. Ein TNF-Trimer kann bis zu drei Rezeptormoleküle binden [Loetscher et al. 1991].

Das Membranintegrierte TNF-Trimer kann proteolytisch durch Metalloproteasen der α -Disintegrin und Metalloproteinase (ADAM)-Familie, wie Metalloprotease „TNF- α -converting enzyme“ (TACE), beim Menschen zwischen Aminosäure 76 und 77 proteolytisch von der Zelloberfläche freigesetzt werden (s. Abb. 1.1) [Gearing et al. 1994; Black et al. 1997].

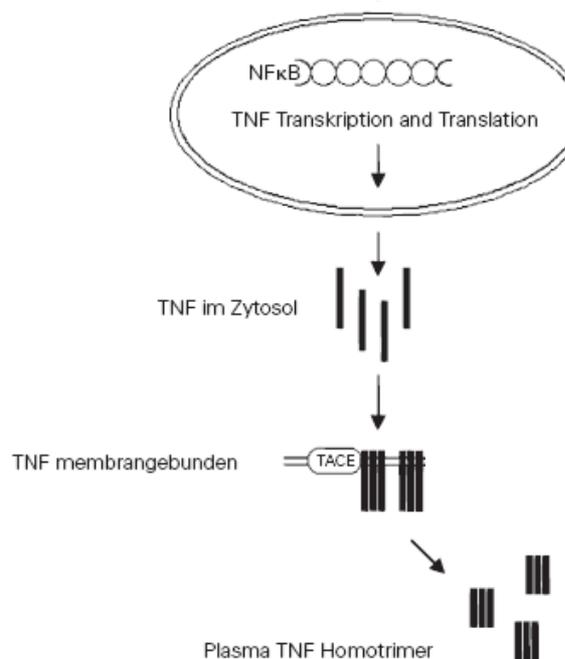


Abb.1.1: Freisetzung von TNF [modifiziert nach Genth-Zotz et al. 2001]. Die Stimulation der Zelle führt intrazellulär zur Aktivierung von MAP-Kinasen und zur Freisetzung von NF κ B. Nach der Transkription und Translation von TNF-Monomeren werden diese in die Zellmembran eingebaut und liegen dort als trimere Proteine vor. Durch TACE werden die TNF-Homotrimere proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten und in den extrazellulären Raum freigesetzt.

Nach der Abspaltung von der Membran beträgt das Molekulargewicht eines TNF-Homotrimers 51 kDa. Im unteren nanomolaren Bereich dissoziiert die trimere Form in seine TNF-Monomere und verliert dabei ihre Bioaktivität. Ein TNF-Monomer besteht typischerweise aus antiparallelen β -Faltblättern mit sogenannter „jelly roll“-Topologie [Eck & Sprang 1989; Zhang G. 2004]. Das abgespaltene

TNF-Monomer zählt 157 Aminosäuren und sein Molekulargewicht beträgt 17 kDa.

1.2.1 Die Rolle von TNF im Immunsystem

Das Spektrum des pleiotropen Zytokins umfasst eine Vielzahl zellulärer Antworten, die je nach Zelltyp und Aktivierungsstatus der jeweiligen Zelle variieren und zu gegensätzlichen Konsequenzen führen können. Dabei greift das Zytokin sowohl in die angeborene als auch in die adaptive Immunantwort ein. Neben der Apoptoseinduktion hat TNF Einfluss auf die Leukozytenwanderung, Zelldifferenzierung und Zellproliferation und unterstützt die Abwehr pathogener Keime und die Reifung lymphatischer Organe [Vassalli P. 1992]. Im Tierversuch zeigten TNF-defiziente Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren einen Defekt in der Reifung und Differenzierung von B-Zellen und in der Bildung von B-Zell-Follikeln und Keimzentren in der Milz [Pasparakis et al. 1996], sowie eine verspätete, unkontrollierte Entzündungsreaktion nach Injektion pathogener Bakterien [Marino et al. 1997].

In der Akutphase der Entzündung bewirkt TNF die Einwanderung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten. Die Granulozyten werden zur Adhärenz an Gefäßendothelzellen, sowie zu einer vermehrten Sensitivität gegenüber anderen Zytokinen stimuliert. Seine Effekte vermittelt TNF über die Induktion der Expression zahlreicher Zytokine wie Interleukin (IL) 1a und b, IL6, IL8, Interferon (IFN)- β und TNF selbst, sowie von Zelladhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktoren und Akute-Phase-Proteinen [Vilcek & Lee 1991]. Außerdem fungiert TNF über die Freisetzung von Prostaglandinen (PG) als endogenes Pyrogen [Dayer et al. 1985; Dinarello et al. 1986]. Zusammen mit LT- α wird TNF eine essentielle Rolle in der Abwehr intrazellulärer Erreger zugeschrieben. TNF reguliert die initiale Chemokinfreisetzung und die Rekrutierung und Formation von akkumulierten Makrophagen und Lymphozyten zu funktionsfähigen Granulomen, welche den Organismus vor der Ausbreitung von Mykobakterien schützen [Flynn et al. 1995; Roach et al. 2001; Roach et al. 2002]. Weiterhin steigert TNF im Zusammenspiel mit IFN γ die phagozytische Aktivität von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten [Kisich et al. 2002]. Sogar an den physiologischen Vorgängen des ovariellen Zyklus scheint TNF bei verschiedenen Säugetieren beteiligt zu sein [Okuda & Sakumoto 2003].

1.2.2 Die klinische Relevanz von TNF

Während die initiale TNF-Produktion zu einer adäquaten inflammatorischen Antwort führt, können aus seiner systemischen Freisetzung signifikante pathologische Veränderungen resultieren. Hohe TNF-Dosen, wie sie z.B. beim Endotoxin-induzierten septischen Schock vorkommen, sind extrem toxisch und rufen bei intravenöser Verabreichung eine akute Schocksymptomatik hervor. Es kommt zur Hypotension, metabolischen Azidose, hämorrhagischen Infarkten der Organe, intravaskulären Thrombosen und im Extremfall zum akuten Lungenversagen und kardiovaskulären Kollaps [Tracey et al. 1986; Beutler & Cerami 1988; Kumar et al. 1996]. Hingegen führt die chronische Exposition von TNF in niedrigen Konzentrationen zur Kachexie, d.h. einer katabolen Stoffwechsellage mit starkem Gewichtsverlust, die bei Tumor- und AIDS-Patienten auftritt [Tracey et al. 1988].

Die inadäquate Ausschüttung des Zytokins wird mit einer Vielzahl von Krankheitsbildern assoziiert, wie z.B. der akuten „Graft versus Host Disease“ (GvHD) [Piguet et al. 1987], allergischen Reaktionen, Asthma und zahlreichen entzündlichen Erkrankungen wie beispielsweise der Multiplen Sklerose, Guillain-Barre-Syndrom, Psoriasis und der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn [Aggarwal B.B. 2003; Lin et al. 2008]. In der Pathologie der Rheumatoiden Arthritis und anderer rheumatologischer Erkrankungen spielt TNF eine wesentliche Rolle. TNF verstärkt z.B. die IL-1-Produktion, was zur Aktivierung synovialer Fibroblasten und zur konsekutiven entzündlichen Zerstörung des Gelenkkörpers führt [Feldmann M. 2002]. In der Pathogenese diverser kardialer Krankheitsbilder ist TNF ebenfalls involviert. Hierzu zählen der Myokardinfarkt [Irwin et al. 1999], die chronischen Herzinsuffizienz [Levine et al. 1990; Torre-Amione et al. 1996] und die Myokarditis [Smith & Allen 1992; Calabrese et al. 2004].

Aufgrund seiner systemischen Nebenwirkungen ist der Einsatz von TNF als Therapeutikum in der Onkologie sehr limitiert. Hingegen gehört der Einsatz von Anti-TNF-Therapeutika, den sogenannten „TNF-Biologicals“, zum klinischen Alltag in der Rheumatologie und bei Autoimmunerkrankungen. Die bekanntesten Präparate sind der chimere Anti-TNF-Antikörper „Infliximab“, der voll humane Anti-TNF-Antikörper „Adalimumab“ und der rekombinante lösliche TNFR2 „Etanercept“ [Feldmann M. 2002; Nash & Florin 2005]. „Infliximab“ besteht aus

einer humanen Fc-Region und einer murinen Fv-Region. „Etanercept“ ist ein Fusionsprotein, bestehend aus der Fc-Region eines humanen Immunglobulin G (IgG) und einem Teil der humanen extrazellulären Domäne des TNFR 2. Die Therapeutika kommen in erster Linie als zweite oder dritte Wahl bei therapieresistenten Patienten zum Einsatz. Vor allem „Infliximab“ wird bei der klinischen Behandlung der rheumatoiden Arthritis und der chronisch entzündlichen Darmerkrankung M. Crohn erfolgreich eingesetzt. Erfolge konnten außerdem bei schweren Fällen von Asthma, ankylosierender Spondylitis, Wegener´s Granulomatose und Psoriasis verzeichnet werden [Feldmann M. 2008; Lin et al. 2008; Son & Cha 2010].

1.3 ADP-Ribosylierung

Bei der Mono-Adenosindiphosphat (mADP)-Ribosylierung handelt es sich ähnlich der Protein-Phosphorylierung um eine post-translationale und reversible Proteinmodifikation, die die Funktion des Zielproteins reguliert. Sie kommt bei Bakterien und eukaryontischen Zellen vor. Die Mono-ADP-Ribosyltransferasen (mARTs) katalysieren hierbei die Übertragung einer einzelnen ADP-Ribose-Gruppe von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) auf eine guanidinhaltige, spezifische Aminosäure des Zielproteins unter Freisetzung von Nikotinamid [Moss et al. 1999; Corda & Di Girolamo 2003; Seman et al. 2004]. Einige mARTs besitzen ebenfalls die Eigenschaft eine einzelne ADP-Ribose-Gruppe von NAD auf H₂O übertragen zu können (NAD-Glykohydrolase (NADase)-Aktivität). Die mADP-Ribosylierung ist reversibel. Die sogenannte de-mono-ADP-Ribosylierung wird von ADP-Ribosylhydrolasen (ARHs) katalysiert (Abb. 1.2). Die ARHs setzen die ADP-Ribose-Gruppe frei, in dem sie die glykosidische Bindung der ADP-Ribose-Gruppe und der spezifischen Aminosäure des ADP-Ribosylierten Proteins hydrolytisch aufspalten [Moss et al. 1997].

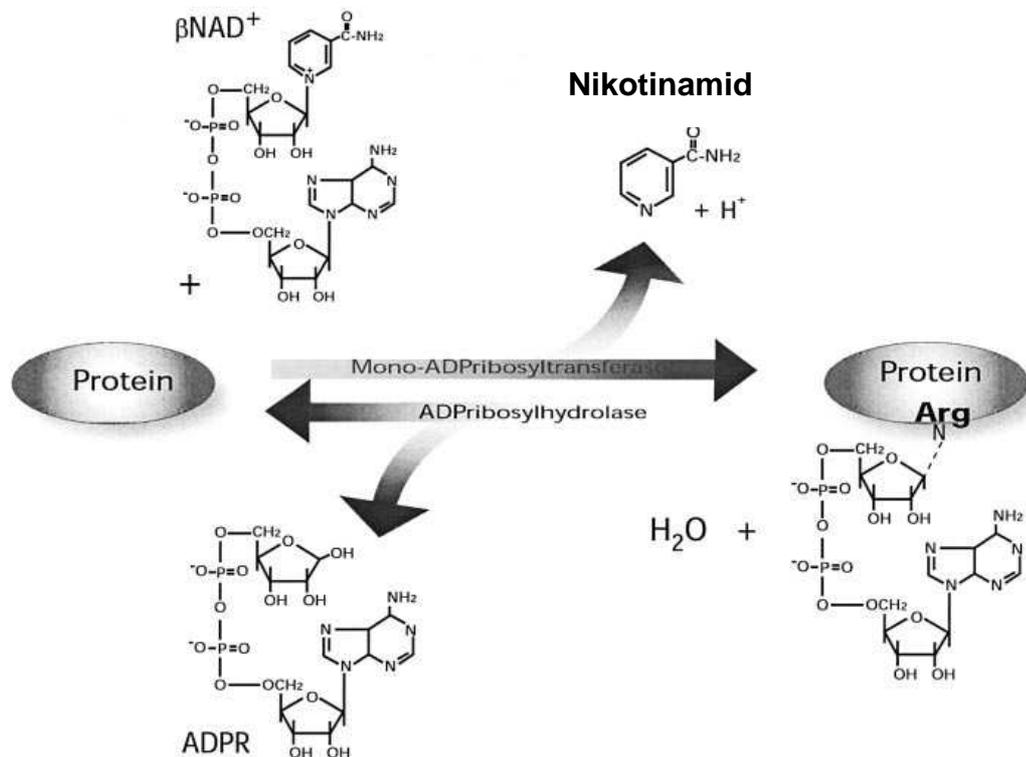


Abb.1.2: Schematische Darstellung der reversiblen mono-ADP-Ribosylierung [Corda & Di Girolamo 2003]. Die mono-ADP-Ribosylierung wird von einer Arginin-spezifischen mono-ADP-Ribosyltransferase katalysiert. Hierbei wird eine ADP-Ribose-Gruppe von NAD auf das Zielprotein unter Freisetzung von Nikotinamid übertragen. Die ADP-Ribosylhydrolase katalysiert die de-mono-ADP-Ribosylierung, in dem sie die ADP-Ribose-Gruppe unter Freisetzung von H_2O vom Protein abspaltet. Andere Aminosäuregruppen, die bei dieser Reaktion modifiziert werden können sind Cystein, Diphtamid und Asparagin.

Bei der Poly-ADP-Ribosylierung wird statt einer einzelnen ADP-Ribose-Gruppe ein verzweigtes Homopolymer aus bis zu 400 ADP-Ribose-Gruppen am Zielprotein erzeugt. Diese Modifikation wird von Poly-ADP-Ribose-Polymerasen (PARPs) katalysiert [Hassa & Hottiger 2008].

1.3.1 ADP-Ribosyltransferasen

Als die ersten ARTs wurden sezernierte Toxine humanpathogener Bakterien entdeckt. Zu den bekanntesten Vertretern der prokaryontischen ARTs zählen Cholera-, Pertussis- und Diphterietoxin. Die bakteriellen Toxine können per mADP-Ribosylierung eines oder mehrere spezifische Zielproteine modifizieren und so die Zellfunktion modulieren. Die ADP-Ribosylierung führt meist zur Inaktivierung des Zielproteins. Beispielsweise inhibieren das Diphterie-Toxin (DT) des *Corynebacterium diphtheria* und Exotoxin A (ETA) des *Pseudomonas aeruginosa* die Proteinsynthese der Wirtszelle über die Inaktivierung des

eukaryontischen Elongationsfaktors (eEF) 2 per ADP-Ribosylierung [Honjo et al. 1968; Collier R.J. 2001]. Zu den weiteren Zielproteinen der bakteriellen ARTs zählen heterotrimere G-Proteine, Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Proteine der Rho- und Ras-Familie und Aktin. Über die Modifikation dieser intrazellulären Proteine nehmen die prokaryontischen mARTs unter anderem Einfluss auf die Zytoskelett-Organisation und induzieren Apoptose [Richard et al. 1999; Kaufman et al. 2000; Aktories & Barbieri 2005].

1.3.2 Die Familie der Mono-ADP-Ribosyltransferasen

Nach der Entdeckung bakterieller ARTs konnte eine ADP-Ribosyltransferase-Aktivität ebenfalls in verschiedenen Geweben von Säugetieren nachgewiesen werden [Okazaki & Moss 1999]. Während die bakteriellen ARTs typischerweise sezerniert werden, kommen eukaryontische ARTs in der Regel als Ektoenzyme vor [Glowacki et al. 2002]. Hingegen sind die Mitglieder der Poly-ADP-Ribosyltransferasen (PARPs) intrazellulär lokalisiert und werden durch genotoxischen Stress, wie DNA-Schäden, aktiviert. Die Aktivierung der PARPs führt zur Poly-ADP-Ribosylierung nukleärer Proteine [Ame et al. 2004; Hassa et al. 2006].

Als erstes Familienmitglied der mARTs konnte die ART1 aus dem Skelettmuskel des Kaninchens kloniert und isoliert werden [Zolkiewska et al. 1992]. Desweiteren erfolgte die Klonierung aus humanen Skelettmuskelzellen und murinen Lymphomazellen [Okazaki et al. 1994; Okazaki et al. 1996]. Seitdem wurden weitere Mitglieder der eukaryontischen mARTs entdeckt. Die meisten davon übertragen die ADP-Ribose-Gruppe spezifisch auf Arginin. Bei der Maus konnten bisher sechs Vertreter (ART1, 2.1, 2.2, 3, 4, 5) und beim Menschen vier Vertreter (ART1, 3, 4, 5) der ART-Familie identifiziert werden (Abb. 1.3) [Glowacki et al. 2002]. Das ART2-Gen wird bei Primaten nicht exprimiert. Man stellte fest, dass drei vorzeitige Stopp-Codons aufgrund von *nonsense*-Mutationen zur funktionellen Inaktivierung des ART2-Gens führen. Hingegen werden bei der Maus zwei funktionelle Kopien der ART2 (2.1 und 2.2) exprimiert, die beide enzymatisch aktiv sind [Haag et al. 1994; Koch-Nolte et al. 1996].

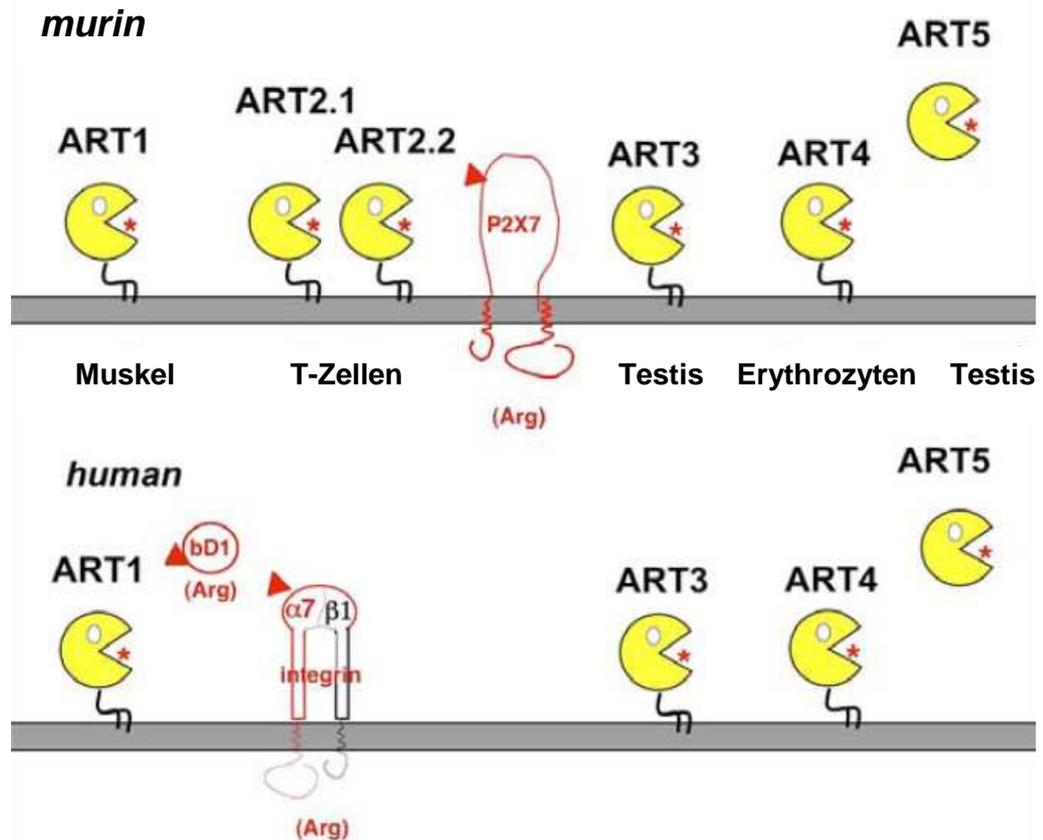


Abb.1.3: Schematische Darstellung der ART-Familie [modifiziert nach Koch-Nolte et al. 2005]. Bisher wurden vier membranständige GPI-verankerte mARTs (ART1-4) und eine sezernierte mART (ART5) bei Vertebraten identifiziert. Die mARTs werden gewebespezifisch exprimiert. Der murinen ART2 gilt besonderes Interesse, aufgrund ihrer Fähigkeit den zytolytischen Purinrezeptor P2X7 per ADP-Ribosylierung zu aktivieren. Interessanterweise werden bei der Maus zwei funktionelle Kopien des ART2-Gens (2.1 und 2.2) exprimiert, während drei vorzeitige Stopp-Codons aufgrund von *nonsense*-Mutationen zur funktionellen Inaktivierung des orthologen humanen ART2-Gens führen. In Anlehnung an die 3DStruktur der Ratten-ART2 wird die ART durch einen „Pacman“ symbolisiert.

Die mARTs werden gewebespezifisch exprimiert und sind mit Ausnahme der ART5, die sezerniert wird, Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) verankerte, membranständige Ektoenzyme [Okazaki & Moss 1998]. Der Hauptfokus der enzymatischen Aktivität liegt daher auf extrazellulären Oberflächenproteinen. Versuche mit rekombinanten ARTs konnten eine Arginin-spezifische ADP-Ribosyltransferase Aktivität für alle humanen und murinen ARTs bestätigen, die ein bestimmtes Motiv (R-S-EXE) in ihrer katalytischen Domäne tragen. Bei der humanen ART3 und 4 konnte dieses Motiv und eine Arginin-spezifische enzymatische Aktivität allerdings nicht nachgewiesen werden [Glowacki et al. 2002]. Die GPI-Verankerung der ARTs kann hydrolytisch in Anwesenheit der Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) gelöst werden

[Donnelly et al. 1996]. *In vitro*-Studien zeigten, dass die murine ART2.2 von Metalloproteinasen, wie TACE, proteolytisch von der Zelloberfläche freigesetzt wird und in dieser Form ebenfalls enzymatisch aktiv ist [Kahl et al. 2000].

Die murine ART2 wird von T-Lymphozyten exprimiert und aktiviert per ADP-Ribosylierung in der Anwesenheit von NAD den zytolytischen Purinorezeptor P2X7 auf murinen T-Zellen. Die Modifikation des P2X7-Rezeptors gilt als Musterbeispiel für einen NAD- und ART-abhängigen immunregulatorischen Mechanismus. Das ART-Substrat NAD kommt unter normalen physiologischen Bedingungen nur intrazellulär in hoher Konzentration vor, jedoch wird es bei Entzündungen und Gewebeverletzungen von beschädigten Zellen vermehrt freigesetzt. ART-exprimierende Zellen reagieren folglich über die extrazelluläre NAD-Konzentration auf Verletzungen des Gewebes [Koch-Nolte et al. 2005]. Die Aktivierung des Rezeptors induziert unter anderem die Öffnung des nicht-selektiven Kation-Kanals P2X7, die Bildung großer Membranporen, die Exposition von Phosphatidylserin an der Außenseite der Plasmamembran und DNA-Fragmentation. Als letzte Konsequenz kommt es bei dauerhafter Aktivierung zur ART-vermittelten NAD-induzierten Apoptose, dem sogenannten „NAD induzierten Zelltod“ (NICD) [Seman et al. 2003].

1.3.3 Die humane ADP-Ribosyltransferase 1

Die humane ART1 (hART1), auch CD296 genannt, ist eine Arginin-spezifische ADP-Ribosyltransferase. Sie wird hauptsächlich auf Skelett- und Herzmuskelzellen exprimiert, konnte aber auch auf neutrophilen Granulozyten, T-Lymphomazelllinien und Epithelzellen nachgewiesen werden [Zolkiewska & Moss 1993; Balducci et al. 1999; Glowacki et al. 2002; Koch-Nolte et al. 2005]. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der hART1 mit seinem murinen Orthologen zeigte eine Homologie von 75% [Braren et al. 1998]. Yadollahi-Farsani und Kollegen stellten fest, dass es mehrere Isoformen der hART1 mit unterschiedlich starker ADP-Ribosylierungsfähigkeit von Zelloberflächenproteinen gibt. Es sind zwei Einzel-Base Polymorphismen in Kodon 257 und Kodon 302 bekannt, die für die unterschiedlichen Isoformen verantwortlich sind [Kefalas et al. 1998; Yadollahi-Farsani et al. 1999].

Die Zielproteine der hART1 sind in der Regel auf der Zelloberfläche lokalisiert. Als die bekanntesten Akzeptoren der hART1 konnten bisher die externe Domäne

von Integrin $\alpha 7$ [Zolkiewska & Moss 1993] und das „Human neutrophilic peptide“ (HNP) 1 identifiziert werden. Guanid-Verbindungen, wie Agmatin und Arginin-Methyl-Ester konnten *in vitro* ADP-ribosyliert werden [Tsuchiya & Shimoyama, 1994]. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die hART1 kleine lösliche Proteine wie „Fibroblast growth factor“ (FGF)-2 [Jones & Baird 1997] und „Platelet-derived growth factor-BB“ (PDGF-BB) modifiziert. Die ADP-Ribosylierung scheint eine Rolle in der Regulation der mitogenen Aktivität von PDGF-BB in glatten Muskelzellen zu spielen [Saxty et al. 2001].

HNP 1 gehört zur Familie der α -Defensine. Defensine werden von Atemwegsepithelzellen und rekrutierten Immunzellen in den Atemwegen als Teil der angeborenen unspezifischen Immunantwort freigesetzt. Das Peptid besitzt eine starke antimikrobielle und zytotoxische Aktivität gegenüber einer Vielzahl von Bakterien, Pilzen und Viren [Lehrer et al. 1993]. Paone und Kollegen zeigten, dass HNP 1 an Arginin 14 und 24 durch die hART1 ADP-ribosyliert wird und dadurch seine zytotoxische und antimikrobielle Aktivität abgeschwächt wird. Es behält jedoch seine chemotaktische Wirkung. Mono- und Di-ADP-Ribosyliertes HNP 1 wurde in der Bronchoalveolären Lavage von Rauchern, Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose oder Asthma nachgewiesen [Paone et al. 2002; Paone et al. 2006]. Interessanterweise stellte man fest, dass HNP 1 bakterielle ARTs neutralisiert. Zum Beispiel wird die ADP-Ribosylierung von eEF 2 durch DT und ETA (siehe Abschnitt 1.3.1) in Anwesenheit von HNP 1 konzentrationsabhängig gehemmt. HNP1 wird jedoch nicht von den bakteriellen ARTs modifiziert [Kim et al. 2006].

Integrin $\alpha 7$ hingegen wird von Skelett- und Herzmuskelzellen exprimiert und bindet nach Dimerisierung mit $\beta 1$ -Integrin an seinen Liganden Laminin, ein extrazelluläres Matrixprotein. Die ADP-Ribosylierung von Integrin $\alpha 7$ bei mikromolaren NAD-Konzentrationen führt zu einer verstärkten Bindung des $\alpha 7\beta 1$ -Heterodimers an seinen Liganden Laminin. Die Expression der hART1 konnte auf differenzierten multinukleären Myofibrillen nachgewiesen werden [Zolkiewska & Moss 1993]. Die Aktivierung der hART1-Gen-Expression in Skelettmuskelzellen ist von der Differenzierung der Muskelzellen abhängig und wird von zwei Transkriptionsfaktoren, Myogenin und „Myocyte-specific enhancer factor“ (MEF)-2, reguliert, die für die Transkription vieler Skelettmuskel-spezifischer Gene notwendig sind [Friedrich et al. 2008].

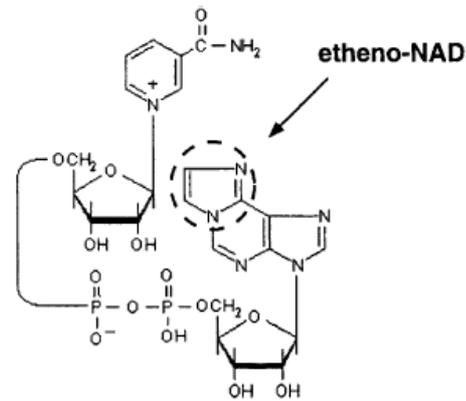
Die verstärkte Bindung des modifizierten Lamininrezeptors an seinen Liganden stellt, ähnlich der P2X7-Aktivierung, eine Reaktion ART-exprimierender Zellen in Situationen dar, in denen NAD vermehrt als Substrat zur Verfügung steht. Bei Gewebeverletzungen und Muskelerkrankungen geht die Plasmamembranintegrität der Muskelzelle verloren und NAD wird über Zellyse oder stimulierte intakte Zellen vermehrt in den Extrazellularraum freigesetzt. Die ADP-Ribosylierung führt zur notwendigen verstärkten Interaktion von Zelladhäsionsmolekülen wie dem Laminindimer und seinem Rezeptor. Interessanterweise scheint an die NAD-Konzentration nicht nur die Aktivität der ART1, sondern auch ihre Spezifität gekoppelt zu sein. Bei NAD-Konzentrationen im unteren mikromolaren (<10) Bereich ist die ADP-Ribosylierung von Integrin $\alpha 7$ auf einen bestimmten Aminosäuresequenzabschnitt beschränkt, bei höheren Konzentrationen (75-100M) kommt es zur zusätzlichen ADP-Ribosylierung in einem anderen Aminosäuresequenzabschnitt [zusammengefasst in Zolkiewska A. 2005].

Untersuchungen von Del Vecchio und Balducci lassen vermuten, dass die hART1 eine Rolle bei der Freisetzung von IL6 und IL8 spielt. Zur IL-Freisetzung stimulierte Alveolarepithelzellen zeigten in *in vitro*-Studien in Anwesenheit von Arginin-spezifischen ART-Inhibitoren (Meta-Iodobenzylguanidine oder Novobiocin) eine verminderte Freisetzung dieser Zytokine. Die Freisetzung der IL war von der Konzentration der ART-Inhibitoren abhängig [Del Vecchio et al. 2008]. Da das Spektrum der Zielproteine der hART1, dem der murinen ART2 sehr ähnelt und die ART2 beim Menschen funktionell inaktiv ist, nimmt man an, dass die hART1 die Rolle der ART2 auf Zellen des humanen Immunsystems ersetzen könnte [Krebs et al. 2003].

1.3.4 Nachweis der ADP-Ribosylierung

Zur Untersuchung der mARTs haben sich in unserem Institut zwei Verfahren etabliert. Dazu gehören Assays mit dem monoklonalen Antikörper (1G4) und der Nachweis ADP-ribosylierter Proteine mittels radioaktiv markiertem NAD⁺.

A



B

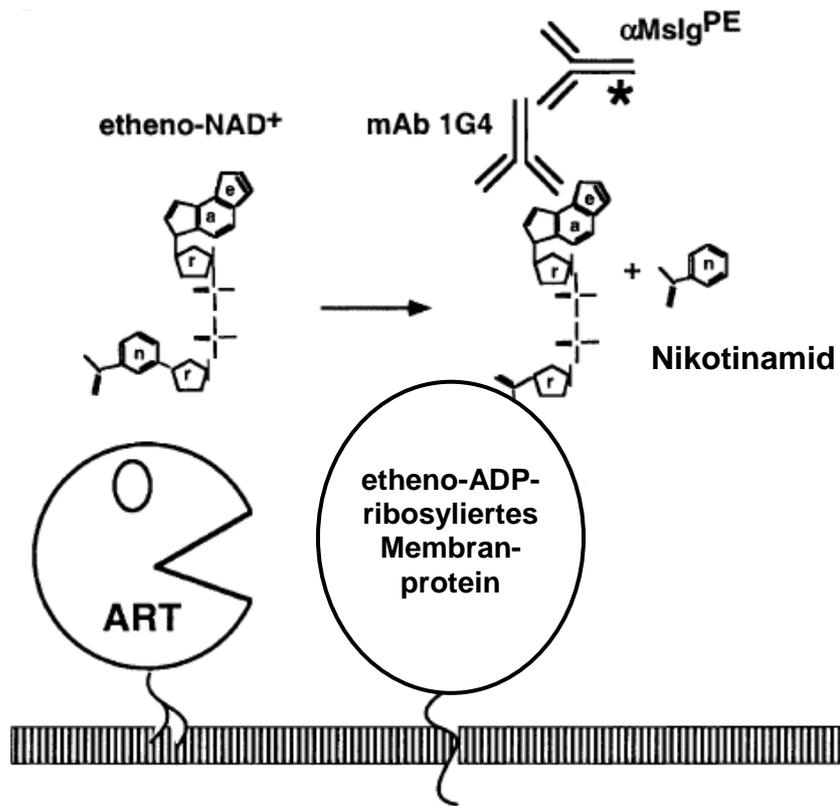


Abb.1.4: Schematische Darstellung von etheno-NAD und Nachweis der etheno-ADP-Ribosylierung mit dem 1G4 Antikörper [Krebs et al. 2003]. A) Die Etheno-Gruppe, die etheno-NAD von NAD unterscheidet ist mit einem Kreis markiert. B) Die GPI-verankerte membranständige mART ist als „Pacman“ dargestellt. ARTs können anstelle von NAD auch etheno-NAD als Substrat verwenden und so Zielproteine etheno-ADP-ribosylieren. Nach der Inkubation von ART-exprimierenden Zellen mit etheno-NAD, katalysieren mARTs den Transfer der etheno-ADP-Ribose-Gruppe von etheno-NAD auf Arginingruppen des Zielproteins unter Freisetzung von Nikotinamid. Die etheno-ADP-Ribosylierten Zellen werden mit einem monoklonalen Antikörper (1G4), der spezifisch an die etheno-Adenosingruppe bindet, inkubiert. Der 1G4 Antikörper kann anschließend mit einem Fluoreszenz- oder Peroxidase-markierten Sekundär-Antikörper detektiert werden. ADP-ribosylierte Zielproteine können so im Western Blot und auf lebenden Zellen in der Durchflusszytometrie dargestellt werden.

1G4 ist ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch an die etheno-Adenosin-Gruppe, z.B. des NAD-Analogons etheno-NAD, bindet. mARTs und PARPs können anstelle von NAD auch etheno-NAD als Substrat verwenden und so Zielproteine etheno-ADP-ribosylieren. Die etheno-ADP-Ribosylierten-Zelloberflächenproteine können mit dem 1G4-Antikörper und mit Fluoreszenz- oder Peroxidase-markierten Sekundär-Antikörpern detektiert werden (Abb. 1.4). Das Verfahren lässt sich im Western Blot, der Durchflusszytometrie und der Immunfluoreszenz-Mikroskopie anwenden [Krebs et al. 2003]. Der 1G4 Assay und analog radioaktiv markiertes NAD werden verwendet, um ADP-ribosylierte Proteine nachzuweisen. Das experimentelle Vorgehen wird im Methodenteil dieser Dissertation beschrieben (siehe Abschnitt 3.4).

1.4 TNF und hART1

Die posttranslationale Modifikation von humanem TNF ist noch weitgehend ungeklärt. In vorangegangenen Studien konnte bestätigt werden, dass humaner TNF durch hART 1 *in vitro* ADP-ribosyliert wird, wohingegen muriner TNF nicht modifiziert wird [Laing S. 2005]. Da die hART 1 somit Argininspezifisch und humanspezifisch ADP-ribosyliert ergab sich die grundlegende These, dass es sich bei den potentiellen Akzeptor-Argininen um nicht konservierte Aminosäuren handeln könnte. Sequenzvergleiche von murinem und humanem TNF zeigten, dass in humanem TNF 6 nicht konservierte Arginine in der extrazellulären, sezernierten Region vorkommen, die potentielle ADP-Ribosylierungsstellen darstellen und sich auf der Moleküloberfläche von TNF befinden. Interessanterweise scheint mindestens einer dieser Argininreste an der Bindung von TNF an seine Rezeptoren (TNFR 1, TNFR 2) beteiligt zu sein [Reed et al. 1997]. Ein weiteres nicht konserviertes Arginin befindet sich in der Stielregion des humanen TNF (Abb. 1.5).

Abweichend von dieser These wurde massenspektrometrisch und in Mutationsanalysen gezeigt, dass R82, ein nicht konserviertes Arginin, und R108, ein konserviertes Arginin, des löslichen TNF ADP-Ribosyliert werden. Es gab jedoch Hinweise auf mindestens eine weitere ADP-Ribosylierungsstelle [Laing S. 2010], die möglicherweise nicht in der abgespaltenen Sequenz von TNF liegt. Die Dissertationsarbeit von S. Laing zeigte weiterhin, dass die ADP-Ribosylierung durch hART 1 sowohl in löslicher als auch membranständiger Form der

Interaktionspartner erfolgen kann. Diesbezüglich ist noch nicht geklärt, welchen Einfluss die topologische Konstellation der hART1 und von TNF auf das Ausmaß der ADP-Ribosylierung von TNF nimmt und ob je nach Konstellation unterschiedliche Aminosäuresequenzabschnitte ADP-ribosyliert werden, als auch, ob der Grad der ADP-Ribosylierung von TNF entsprechend Integrin $\alpha 7$ von der NAD Konzentration abhängig ist (siehe Abschnitt 1.3.3).

```

hTNF  MSTESMI RDVELAEEALPKKTGGPQGS RRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPOR 60
mTNF  MSTESMI RDVELAEEALPQKMGGFQNS RRCLCLSLFSFLLVAGATTLFCLLNFGVIGPOR 60

hTNF  EE-FP DLSLISPLAO--AVR SSS TPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLN ANALLANGV 117
mTNF  DEKFNGLPLISSMAOTLTL R SSSQNSSDKPVAHVVANHQVEEQLEWLSQ ANALLANGM 120

hTNF  ELKDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKQGCPSTHVLLTHTISR IAVSYQTKVNLLSAIKSPC 177
mTNF  DLKDNQLVVPADGLYLVYSQVLFKQGCP-DYVLLTHTVSR FAISYQEKVNLLSAVKSPC 179

hTNF  QRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEIN PDYLDFAESGQVYFGIIAL 233
mTNF  PKDTPEGAELKPWYEPIYLGGVFQLEKGDQLSAEVNLPKYLDFAESGQVYFGVIAL 235

```

Abb.1.5: Vorkommen von Arginin-Resten in humanem und murinem TNF

Sequenzvergleich von humanem und murinem TNF wurden mit Custal W 1.83 (EBI Online) erstellt. Die Sequenzen stammen aus der UniProt-Datenbank. Die nur in humanem TNF vorkommenden Arginin-Reste sind blau hervorgehoben. Die konservierten Aminosäuren sind rot hervorgehoben. Die transmembranäre Domäne ist grau unterlegt und die Stielregion ist schwarz unterstrichen. Die entsprechenden Aminosäurenummern werden für die Humansequenz (hTNF) oben angegeben.

1.4.1 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel meiner Dissertationsarbeit war die Charakterisierung der ADP-Ribosylierung von humanem TNF durch die hART1. Vorangehende Arbeiten zeigten, dass humaner TNF durch die hART1 *in vitro* ADP-ribosyliert wird. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die durch hART1 modifizierten Argininreste in TNF sowohl in der Ektodomäne als auch im Stielbereich mittels zielgerichteter Mutagenese und ADP-Ribosylierungs-Assays mit etheno-NAD und radioaktiv markiertem NAD⁺ identifiziert werden. Schließlich sollte der Einfluss der Einzel-Base-Mutation als auch der ADP-Ribosylierung auf die Funktion und Bindungsfähigkeit des Zytokins untersucht werden.

Weiterführend könnten Funktionsassays und *in vivo* Studien durchgeführt werden, um die Relevanz der ADP-Ribosylierung von TNF als immunregulatorischen Mechanismus abschätzen zu können.

2. Materialien

2.1 Laborgeräte

Autoklav Modell 2540 EK	Tuttnauer
Varioklav	H+P Labortechnik GmbH
Bakterienbrutschrank B6060	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Bad Nenndorf
Digitalkamera DP500	Olympus, Hamburg
Erlenmeyerkolben	Schott, Simax
FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage Typ 1412	Sartorius
Filmentwicklungsmaschine	Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf
Fuji FPM 100A	
Folienschweißgerät	Vacufix electronic
	Petra electric, Burgau
Geldokumentationsanlage	Kodak
Edas 290 & Kamera DC290	
Gelelektrophorese-DNA/ RNA	peqLab Biotechnologie, Erlangen
Modell 40-0708	
Gelelektrophorese-Protein Novex	Invitrogen, Karlsruhe
Xcell SureLock MiniCell	
Kontaminationsmonitor	Eberline, Erlangen
Contamat FHT 111 M	
Kühltruhe (-80°C) HFC 586 Basic	Heraeus, Hanau
Magnetbank	
Magnetrührer RCT S 26	Omnilab, Bremen
Mikroskop	Zeiss
Mikrowelle, M 637 EC	Miele, Gütersloh
Neubauer Zählkammer	Labor Optik
Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech, Wien (Österreich)
PCR-Maschinen	
TGradient Whatman	Biometra, Göttingen
Thermocycler T3	Whatman Biometra, Göttingen

Schüttelinkubator	
ECOTRON/ UNITRON	Infors
Spannungsquellen	
High Voltage Power Pack P30	Whatman Biometra, Göttingen
Power Pac 200	BioRad, München
Stratacooler	Stratagene
Thermomixer kompakt	Eppendorf, Hamburg
Vortex	Neolab
Wasserbad Typ 1007	GFL
Werkbank	Intermed MDH
Zentrifugen	
Rotanta 460 R	Hettich, Tuttlingen
Ultrazentrifuge RC 26 PLUS	Sorvall
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
5414D, 5417R	Eppendorf, Hamburg

2.2 Verbrauchsmaterialien

Biomax MR/MS Röntgenfilm	Kodak Company
Blot-Filter GB 003	Schleicher und Schuell, Dassel
Blot-Schwämme	Invitrogen
Deckgläser 0,17 mm 9x9 mm	Science Services, München
Combitips	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml Tubes (Safe lock)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen 5ml	Falcon/BD Biosciences
Falcons	Becton Dickinson, Heidelberg
Gene Pulser Cuvette 4mm	Biorad, München
Handschuhe Safeskin	Kimberly-Clark, Koblenz
Hyperfilm ECL	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
Kulturflaschen (adhärent T25, T75)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Mikrotiterplatten 96 well	Greiner, Solingen
Nitrozellulose-HybondC 0,45 µm	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg

NuPAGE precast Gele (10%, 12%)	Invitrogen
Petrischalen 10cm	Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Polyvinylidendifluorid-ImmobilonP	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
Papillarpipettenspitzen	
Stericup	Millipore, Billerica, MA, USA
Strataclean Resin Matrix	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)

2.3 Zelllinien

Tabelle 2.1: Untransfizierte Zelllinie

Name	Gewebe	Organismus	Quelle
HEK 293T	Embryonales Nierengewebe	<i>H. sapiens</i>	Im Labor etabliert

2.4 Bakterienstämme

XL 10-Gold ultrakompetent <i>E.coli</i>	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
---	------------------------------------

2.5 Antikörper

Tabelle 2.2: Konjugierte und unkonjugierte Primärantikörper

Primärantikörper	Spezifität	Konjugat	Hersteller	Laborbezeichnung
Maus α -etheno-Adenosin	Hybridoma		IFI, Hamburg	1G4
Maus α -etheno-Adenosin		gAlexa	IFI, Hamburg	#93, 1G4
Maus α -Flag	monoklonal		Sigma	#6, M2
Maus α -Flag	monoklonal	HRPO	Sigma	#14
Ratte α -HA (Hämagglutinin)	monoklonal		Roche	#7
Maus α -HA	monoklonal	FITC	Abcam	#141
Ratte α -Human ART1	Hybridoma		IFI, Hamburg	#R19A3
Kaninchen α -Human ART1			IFI, Hamburg	#K315 FB
Kaninchen α -Human ART1			IFI, Hamburg	#K315 PIS
Kaninchen α -Human ENPP2			IFI, Hamburg	#K2G
Kaninchen α -Human ENPP2			IFI, Hamburg	#K2G PIS
Ratte α -Human P2X7	Hybridoma		IFI, Hamburg	L4
Maus α -Human-P2X7		gAlexa	IFI, Hamburg	#139, L4

Maus α -Human TNF		Biotini- liert	eBioscience	#44
Maus α -Human TNF	monoklonal		eBioscience	#169
Maus α -Human TNF	monoklonal		abcam	#189
Ziege α -Human TNF			R&D Systems	#192
Human α -Human TNF			Centocor Inc. Essex Pharma	#206, Infliximab

Tabelle 2.3: Konjugierte Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Spezifität	Konjugat	Hersteller	Laborbe- zeichnung
Esel α -Human		FITC	Dianova	#71
Esel α -Human		PE	Dianova	#62
Esel α -Kaninchen		PE	Dianova	#70
Esel α -Maus		PE	Dianova	#59
Ziege α -Maus		HRPO	eBioscience	#20
Esel α -Ratte		PE	Dianova	#39
α -Streptavidin		gAlexa	Mol.Probes	#60
Esel α -Ziege		PE	Dianova	#85
Kaninchen α -Ziege	polyklonal	HRPO	abcam	#18

2.6 Chemikalien

ADP-Ribose (200mM)	Sigma-Aldrich
AEBSF (Stammlösung 100mM)	MP Biomedicals
4-(2-Aminoethyl)- benzensulfonylfluorid	
Agarose	Invitrogen/ SIGMA, Deisenhofen
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
β -Mercaptoethanol	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)
Bio-Adembeads Protein G 0433	Ademtech
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Schwalbach
Carbenicillin (SL.: 100mg/ml)	Serva, München
dNTPs	Invitrogen
DNA Ladepuffer	MBI Fermentas, ST. Leon-Rot
Dithiothreitol (DTT)	
ECL Western Blotting	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Detection Reagent	
Ethanol, reinst, getrocknet	Merck
Ethanol, vergällt	Walter CMP GmbH

Ethidiumbromid	Molecular Probes, Leiden
Etheno-NAD (10mM)	SIGMA, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Gene Ruler 1kB DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Loading dye solution 6x	Invitrogen, Karlsruhe
Lysepuffer	PBS/ 1% TritonX 100 / 1% AEBSF
Methanol	Walter CMP GmbH
Multi Color Marker	Invitrogen
Natriumacetat (3M)	
Natriumchlorid	Braun
NAD	Sigma-Aldrich
³² P-NAD 10 mCi/mL	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
Propidium Iodid (1mg/ml)	Pharmingen, Hamburg
20x TAE-Puffer	Gibco BRL, Eggenstein
Triton X 100	Sigma
Trypsin	Gibco BRL, Eggenstein
Tween 20	ICI Americas

2.7 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

<i>Dpn</i> I (20.000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Not</i> I (20.000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Xma</i> I (20.000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt

DNA-Polymerasen

AmpliTaq GOLD DNA-Polymerase	Applied Biosystems
PFU-Turbo DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)

Andere Enzyme

T4 DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
TAPI-2	Calbiochem
Alkalische Phosphatase (1000 U)	Roche Diagnostics, Mannheim
PI-PLC	Molecular Probes (100 U/mL)

2.8 Primer

Primer für die Mutagenese-PCR wurden mit den Programmen von DNA-Star, Madison (USA) entworfen.

Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Mutageneseprimer. Der Anfangsbuchstabe repräsentiert die Spezies (h = Mensch). Er ist gefolgt von der Arginin zu Lysin Mutationstelle und der Orientierung des Primers (F = Vorwärts, R = Rückwärts). Synthetisierung erfolgte durch die Firma MWG, Ebersberg.

Name	Primersequenz
hTNF_R60K_F	ATCGGCCCCAGAAaGGAAGAGTTCCCCAGG
hTNF_R60K_R	CCTGGGGAACTCTTCCtTCTGGGGGCCGAT
hTNF_R65K_F	GAAGAGTTCCCCAaGGACCTCTCTCTAATC
hTNF_R65K_R	GATTAGAGAGAGGTCCtTGGGGAACTCTTC
hTNF_R82K_F	GCAGTCAGATCATCTTCT aaAACCCCGAGTGACAAGC
hTNF_R82K_R	GCTTGTCACTCGGGG TtAGAAGATGATCTGA CTGC
hTNF_R107K_F	CTCCAGTGGCTGAACaagCGGGCCAATGCCC
hTNF_R107K_R	GGGCATTGGCCCGcttGTTTCAGCCACTGGAG
hTNF_R120K_F	CAATGGCGTGGAGCTGAaAGATAACCAGCTGG
hTNF_R120K_R	CCAGCTGGTTATC TtTCAG CTCCACGCCATTG
hTNF_R179K_F	GAGCCCCTGCCAGAAaGGAGACCCAGAGGG
hTNF_R179K_R	CCCTCTGGGGTCTCCtTCTGGCAGGGGCTC
hTNF_R207K_F	G CTGGAGAAGGGTGACaaACTCAGCGCTGAGATC
hTNF_R207K_R	GATCTCAGCGCTGAGTt GTCACCCTTCTCCAGC
hTNF_R214K_F	CAGCGCTGAGATCAATaaGCCCCACTATCTCGAC
hTNF_R214K_R	GTCGAGATAGTCGGGcttATTGATCTCAGCGCTG

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

CMV-F: 5'-GGCGTGTACGGTGGGAGG-3'

K3: 5'-TTGTAACCATTAAGCTGC-3'

2.9 Plasmide

pCMV_SPORT 6_TNF	UKE, Institut für Immunologie
pMeneo_hART1 (Flag-Tag)	UKE, Institut für Immunologie, #102 MN
pCMV_SPORT_P2X7	UKE, Institut für Immunologie, #24 FS
peGFP_HA_hLKLf	UKE, Institut für Immunologie, #312
pME_HA_CD38_hENPP2	UKE, Institut für Immunologie, #128 FS

2.10 Puffer und Lösungen

2.10.1 Zellkulturmedien und Lösungen

DMEM Komplettmedium

Dulbecco's modified Eagle medium Invitrogen/ Gibco BRL
(DMEM)

10% Fötale Kälberserum Biochrom KG, Berlin

1mM Natriumpyruvat Invitrogen/ Gibco BRL

2mM L-Glutamin Invitrogen/ Gibco BRL

10 mM HEPES-Puffer Invitrogen/ Gibco BRL

1x nicht-essentielle Aminosäuren Invitrogen/ Gibco BRL

1 x Dulbecco's PBS Invitrogen/ Gibco BRL

2,67 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 137,93
mM NaCl, 8,06 mM Na₂PO₄, pH 7,4

jetPEI Transfektionreagenz Polyplus, New York

³²P-NAD-Ribosylierungspuffer 1mM ADP-Ribose, 1µM NAD, 5µCi ³²P-
NAD/ Probe, 2mM EDTA in RPMI
Medium

RPMI 1640 Komplettmedium

RPMI 1640 Medium Invitrogen/ Gibco BRL

10% Fötale Kälberserum Biochrom KG, Berlin

1mM Natriumpyruvat Invitrogen/ Gibco BRL

2mM L-Glutamin Invitrogen/ Gibco BRL

Waschpuffer 500 µM ADP-Ribose in PBS

(nach ³²P-NAD-Ribosylierung)

Zellysepuffer 1 % TritonX100, 1mM AEBSF, 1mM
(nach ³²P-NAD-Ribosylierung) ADP-Ribose, 1mM NAD// 100µM NAD,
2mM EDTA in PBS

2.10.2 Bakterienkulturmedien

LB-Agar BD Biosciences

Carbenicillin 100 µg/ml Serva, Heidelberg

Kanamycin 100 µg/ml Roche, Basel, Schweiz

LB-Medium Invitrogen/ Gibco BRL, Karlsruhe

Formulierung nach Miller 1% Trypton, 1% NaCl, 0,5% Hefeextrakt

SOC-Medium	Invitrogen/ Gibco BRL, Karlsruhe 2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 8,6 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose
------------	--

2.10.3 SDS-PAGE und Western Blot

Antikörperpuffer	5% Milchpulver in Aqua iniectionabilia
Blotpuffer	10 % Methanol, 0,1 % Antioxidans, 1 x Transferpuffer Tween 20
Blockpuffer	5% Milchpulver (Carl Roth, Karlsruhe) in 1x TBS
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen
NuPAGE LDS sample buffer	Invitrogen
NuPAGE sample reducing agent	Invitrogen
NuPAGE SDS PAGE MES running buffer	Invitrogen, 50 mM 2-(N-morpholino)-ethansulfonsäure (MES), 50 mM TRIS-Base, 3,5 mM SDS, 1 mM EDTA, pH 7,7
NuPAGE SDS PAGE MOPS running buffer	Invitrogen, 1 M 3-(N-morpholino)-propansulfonsäure (MOPS), 1 M TRIS-Base, 69,3 mM Natriumdodecylsulfat (SDS), 20,5 mM EDTA
NuPAGE SDS PAGE transfer buffer	Invitrogen, 0,5 M Bicin, 0,5 M BIS-TRIS, 20,5 mM EDTA, 1 mM Chlorobutanol
Silberfärbungslösung	9ml a.i – 0,5ml 40% Natriumcitrat – 0,4ml 20% Fe ₂ SO ₄ - 0,1ml 20% AgNO ₃
Strippinglösung	10% ReBlot plus strong Solution (Chemicon international) in 5% Milchpulverlösung
Transferpuffer 1x	3.027g TrisBase - 14,4g Glycin – pH 8,3 - 20% Methanol
1x Transferpuffer	849ml a.i., –1ml NuPage Antioxidant, 250ml Tween 20
1x TBS:	8g NaCl – 0,2g KCl – 3g TrisBase – pH 7,4

Waschpuffer

0,05% Tween 20 in 1x TBS

2.11 Reagenzsysteme (Kits)

BCA-Protein quantifizierung	BCA Protein Assay Reagent	Pierce Biotechnology
Gelextraktion	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Plasmid-Präparation	QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
	Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Sequenzierreaktionen	BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems

3. Methoden

3.1 Methoden der Zellbiologie

3.1.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten adhärent wachsenden HEK293-Zellen wurden in T25 und T75 Zellkulturflaschen, sowie in 10 cm Petrischalen für adhärente Zellen mit DMEM („Dulbecco’s modified Eagle medium“)-Komplettmedium bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter, 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte im Verhältnis 1:5 bis 1:10 im Abstand von zwei bis drei Tagen. Dazu wurden die Zellen mit 4 °C kaltem „Phosphate buffered saline“ (PBS) -/- gewaschen und mit 1 ml in PBS gelöstem Trypsin geerntet, bei 4°C und 1300-1600 RPM 5 min pelletiert, mit DMEM-Komplettmedium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung in einem Volumen von 5ml oder 10ml ausplattiert, bzw. für Experimente eingesetzt. Die Zelldichte wurde mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

3.1.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Die HEK293-Zellen wurden in Zellkulturflaschen ausgesät und bei 50%iger Konfluenz wurde die transiente Transfektion mittels des jetPEI™-Transfektionssystems (Polyplus) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die Transfektion einer T25-Flasche mit ca. 2×10^6 HEK293-Zellen wurden 5 µg Plasmid-DNA und 10 µl JetPEI-Reagenz eingesetzt. Dabei wurden nach dem JetPEI-Protokoll zunächst die DNA und die JetPEI-Reagenz separat in jeweils 250µl 150mM Kochsalz (NaCl)-Lösung durch wiederholtes Vortexen aufgelöst. Anschließend wurde die JetPEI-Lösung zu der DNA-Lösung zugegeben und erneut gevortext. Während der 30 minütigen Inkubation wurde das Medium der Zellkulturflaschen gewechselt und anschließend die JetPEI-DNA-Lösung zu den Zellen zugegeben. Für die Kotransfektion einer 10cm Petrischale mit ca. 6×10^6 HEK293-Zellen wurden entsprechend 6µg Plasmid-DNA eines TNF-Expressionsplasmids und 2µg hART1-Expressionsplasmid eingesetzt. Die Zellen

wurden 24 Stunden nach Transfektion geerntet und für die Experimente weiterverarbeitet.

3.2 Proteinbiochemische und Immunologische Methoden

3.2.1 "Fluorescence Activated Cell Sorting" (FACS) -Analysen

Die so genannte Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung von mikroskopisch kleinen Partikeln, wie Zellen, nach ihrer Größe, Struktur und Oberflächeneigenschaften. Die zu untersuchenden Zellen werden über eine Trägerflüssigkeit durch eine sehr dünne Kapillare einzeln hintereinander an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Der Laserstrahl wird durch die Eigenschaften der Zelle abgelenkt, wodurch sich mehrere Parameter messen lassen. Die Messung der Vorwärtstreuung wird als „forward scatter“ (FSC) bezeichnet und gibt Auskunft über die Partikelgröße. Der sogenannte „side scatter“ (SSC) erlaubt eine Aussage über die Granularität einer Zelle. Durch die Markierung mit Fluorochrom-markierten Antikörpern ist es möglich ein spezifisches Oberflächenmolekül zu detektieren. Die Fluorochrome werden durch das monochrome Laserlicht angeregt und emittieren es in einem definierten Wellenlängenbereich. Diese Emission ist spezifisch für einzelne Fluorochrome und kann durch verschiedene Photodetektoren gemessen werden. Die Intensität der detektierten Fluoreszenz entspricht der Expressionsstärke des durch einen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper angefärbten Moleküls auf der Zelle bzw. Stärke der Anfärbung mit fluoreszierenden Molekülen. Das Verfahren wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Expression bestimmter Zelloberflächenproteine nach transienter Transfektion von HEK293-Zellen zu untersuchen. Die Untersuchungen dienten zur Kontrolle der Transfektion, der Spezifität der verwendeten Antikörper und zum Nachweis der etheno-ADP-Ribosylierung (siehe Abschnitt 3.4.1). Die Anfärbungen wurden in FACS-Röhrchen mit ca. 1×10^5 Zellen pro Ansatz durchgeführt. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden mit PBS -/- bei 4°C durchgeführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1600 RPM wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit dem Primär- und dem Sekundär-Antikörper für jeweils 30 Minuten in 100 µl PBS -/- bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Antikörper wurden nach Angaben des Herstellers oder in einer Konzentration von 1µg/µl eingesetzt. Nach jeder Inkubation erfolgte ein Waschschrte. Nach der Anfärbung wurden die

Zellen erneut gewaschen und im FACSCalibur mit Hilfe der entsprechenden Software (Cellquest, Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen und die Daten ausgewertet. Abhängig vom Versuchsaufbau wurden als Negativkontrollen zum einen untransfizierte Zellen mit Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert, als auch Proben nur mit einem Sekundärantikörper inkubiert, sowie Proben mit einem gegen ein anderes Epitop gerichteten Primärantikörper inkubiert. Tote Zellen wurden anhand der *Scatter*-Eigenschaften von der Analyse ausgeschlossen.

3.2.2 Immunpräzipitation

In dieser Arbeit wurden zur Immunpräzipitation Protein G gekoppelte Magnetbeads verwendet. Protein G besitzt eine hohe Affinität zur Fc-Region der Antikörper; nach Bindung der Protein G Magnetbeads an den gewünschten Antikörper, kann dieser Komplex ein spezifisches Protein aus einem Gesamtzelllysate isolieren. 5µl Magnetbeads pro Ansatz wurden dreimal in der Magnetbank gewaschen. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden mit 90µl PBS/ 0.05% Tween 20 durchgeführt. Nach dem Waschen wurden die Protein G Magnetbeads mit jeweils 1µg Antikörper 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) auf dem Roller inkubiert. Verwendet wurden der Human-anti-TNF-Antikörper (#206), der Ratte- α -hP2X7-Antikörper (#L4), der Ratte- α -Hämagglutinin-Antikörper (#7), der Kaninchen- α -hENPP2-Antikörper (#K2G) und der Maus α -etheno-Adenosin-Antikörper (#1G4) (s. Tab.2.2). Nach einem erneuten Waschschrte wurden 35-80 µl die Ganzzelllysate der transfizierten Zellen mit den Antikörper-gebundenen Protein G Magnetbeads 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Roller inkubiert. Danach folgte ein erneuter Waschgang und die Protein-G-gekoppelten Magnetbeads wurden mit 1x Sample Buffer in der SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden, abhängig vom Versuch, Protein G Magnetbeads ohne Antikörper mit Lysaten inkubiert, als auch untransfizierte HEK293-Zellen mit Antikörper-gebundenen Protein G Magnetbeads inkubiert, um unspezifische Bindungen auszuschliessen und ein Hintergrundbandenmuster differenzieren zu können.

3.2.3 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung der Zelllysate wurden einen Tag zuvor transient transfizierte HEK293-Zellen verwendet. Die Zellen einer T25-Flasche mit $0,5-2 \times 10^6$ Zellen

wurden gewaschen und abtrypsiniert. Es folgte die Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 1600 RPM. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und jeweils 1×10^5 Zellen je Zellkultur zur Expressionskontrolle mittels FACS entnommen. Die restlichen Zellen wurden zentrifugiert und mit 50-100 μ l Lysepuffer für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Lysate 5 Minuten bei 3000 RPM zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Eine zweite Zentrifugation erfolgte 1 Minute bei 13000 RPM, um die lysierten Proteine komplett von eventuellen Zelltrümmern zu befreien. Die Lysate wurden bei -20°C tiefgefroren oder direkt weiter verwendet. Für die ADP-Ribosylierungs-Assays (siehe Abschnitt 3.4) wurden ca. 1×10^6 transient transfizierte HEK293-Zellen vor der Zelllyse mit 32 P-NAD bzw. mit etheno-NAD inkubiert.

3.2.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE Analyse wurde das „NuPAGE Electrophoresis System“ verwendet. Die Versuche wurden in der Regel unter nicht reduzierten Bedingungen durchgeführt. Die Proteine werden durch die Seife SDS (Sodiumdodecylsulfat) denaturiert und bilden negativ geladene Komplexe, die sich beim Anlegen einer Spannung im elektrischen Feld zum Plus-Pol bewegen. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins ist von dem Molekulargewicht des Proteins und der durch das Gewicht erzeugten Reibung abhängig, so dass sie der Größe nach aufgetrennt werden können. Die Proteinproben wurden in einfach konzentriertem SDS-Ladepuffer für 10 Minuten bei 70°C erhitzt und je 20 μ l in die Geltaschen aufgetragen. Als Größenmarker diente Multimark (Invitrogen). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12%igen Bis-Tris Polyacrylamid-Gel (Invitrogen) mit 10 oder 12 Geltaschen in MES bzw. MOPS Laufpuffer ca. 30 Minuten bei 200 V.

3.2.5 Western Blot-Analysen

Mit Hilfe des „X Cell II Blotting“ Systems ist es möglich die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Proteinbindende Membran zu transferieren, um sie z.B. einer Immunodetektion zu zuführen. Zunächst wurde die Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran für 15 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit der Nitrocellulose (NC)-Membran und den

benötigten Filtern und Schwämmen für etwa 10 Minuten im Transferpuffer getränkt. Das Polyacrylamidgel wurde zwischen die NC-Membran und die PVDF-Membran gelegt und für 90 Minuten bei 30 V auf die PVDF-Membran transferiert. Für die Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran reichte das Auflegen der Membran auf das Gel aus.

3.2.6 Silberfärbung

Mit Hilfe der Silberfärbung war es möglich die auf der Nitrozellulosemembran gebundenen Proteine anzuschwärzen und so die Proteinbeladungsmengen der einzelnen Taschen miteinander zu vergleichen. Hierfür wurde die NC-Membran mit 10 ml der frisch hergestellten Silberlösung (Bestandteile siehe Abschnitt 2.10.3) für 1-2 Minuten unter ständiger Bewegung angefärbt, mit destilliertem H₂O gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.7 Immunodetektion

Die PVDF-Membran mit den transferierten Proteinen wurde nach erfolgtem Western Blot zunächst 30 Minuten in einem Blockpuffer (Bestandteile siehe Abschnitt 2.10.3) bei RT rotierend inkubiert. Anschliessend erfolgte die Inkubation mit den unkonjugierten Primärantikörpern in einer Verdünnung von 1:1000 rotierend für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (0,05% Tween 20 in 1x TBS) für fünf Minuten erfolgte die Inkubation der PVDF-Membran mit dem HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper in Verdünnung nach Herstellerangabe rotierend für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach einem erneuten Waschgang von dreimalig fünf Minuten erfolgte die Chemilumineszenz-Detektion.

3.2.8 Chemilumineszenz-Detektion und Autoradiographie

Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde mit dem "Enhanced chemoluminescence (ECL) Western blotting detection reagent" (Roche) durchgeführt. Die ECL-Lösung enthält Luminol, welches durch Katalyse der „Horseradish-Peroxidase“ (HRP) in einer Reduktions-Oxidations-Reaktion unter Lichtemission umgesetzt wird. Die Lichtemission wurde an der Stelle des HRP-gekoppelten Antikörpers mittels eines lichtsensitiven Films detektiert. Für die Entwicklung wurde die

PVDF-Membran mit einem 1:1 Gemisch der Entwicklersubstanzen benetzt, mit Plastikfolie umwickelt in eine Röntgenkassette geklebt und für wenige Sekunden bis mehrere Minuten dem lichtempfindlichen Film exponiert. Der Film wurde in der „Fuji FPM 100 A“ Entwicklungsmaschine entwickelt. Bei der Autoradiographie wurde die PVDF-Membran in eine Expositionskassette geklebt und ein Kodak Biomax MR Röntgenfilm aufgelegt. Der Film wurde dann für zwei bis sieben Tage bei -80°C exponiert und anschließend in der „Fuji FPM 100A“ Entwicklungsmaschine entwickelt. Die Strahlung des verwendeten β -Strahlers ³²P führte zu einer Schwärzung des Röntgenfilms an der Stelle, an der das radioaktiv markierte Protein auf der PVDF-Membran geblottet war.

3.3 Methoden der Molekularbiologie

3.3.1 PCR-Primer Design und Zielgerichtete Mutagenese

Mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese war es möglich spezifische Argininreste im TNF gezielt zu Lysin zu mutieren, um potentielle ADP-Ribosylierungsstellen im TNF auszuschalten. Es wurden für jede Mutagenese jeweils zwei Mutationsprimer zur Klonierung von TNF designed, komplementär zu der Region, welche die Position des jeweiligen Arginins umfassten. Das Basentriplett, welches für die Arginine (R) kodierte (AGG, AGA, CGA, CGG, CGC oder CGT) wurde zu einem für Lysin (K) kodierenden Triplett umgewandelt (AAG oder AAA) (s. Tab.2.4). Mit diesen Primerpaaren und dem pCMV.SPORT.6-TNF-Wildtyp-Vektor als Matrize wurde die Mutagenese der TNF-Plasmide nach dem Protokoll des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Qiagen) durchgeführt. Die PCR wurde im Thermocycler T3 (Whatman, Biometra) durchgeführt.

PCR-Mutageneseprogramm:

1. 95°C , 30 s
2. 95°C , 30 s
3. 55°C , 60 s
4. 68°C , 7 min
5. 18 Zyklen gehe zu 2.
6. 68°C , 10 min
7. auf 4°C halten

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit *Dpn* I verdaut. Das Enzym schneidet methylierte DNA, wodurch nur die methylierten Ursprungsplasmide entfernt

werden. Die Mutagenese-Ansätze wurden in XL10-Gold untraktompetente Zellen transformiert (s. Abschnitt 3.3.5), ausplattiert auf LB-Agarplatten und nach Kultur und Isolierung mittels Sequenzierung auf den Erfolg der Mutagenese hin überprüft (s. Abschnitt 3.3.6).

Ausgehend vom pCMV.SPORT.6-TNF-Vektor wurden die Einzelmutanten der nicht konservierten Arginine von löslichem TNF (R82K, R107K, R120K, R179K, R207K, R214K) hergestellt. Desweiteren wurde das Wildtyp-TNF-Insert und die TNF-Einzelmutanten-Inserts (R82K, R107K, R120K, R179K, R207K, R214K) in einen Kanamycin-Resistenzgen-tragenden pEGFP-Vektor kloniert, der innerhalb der Arbeitsgruppe N-terminal mit einem HA-Tag versehen wurde, und zwei weitere TNF-Einzelmutanten der Stielregion hergestellt (R60K, R65K).

3.3.2 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde 1%ige Agarose, in TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer gelöst, und mit 10µl Ethidiumbromid versetzt. Dieser Farbstoff erhöht die Fluoreszenzintensität unter UV-Licht durch Interkalation in (Desoxy) Ribonukleinsäurehelices, so dass die DNA sichtbar gemacht werden kann. Die Agaroselösung wurde in eine Gelkammer gegossen und nach Abkühlung in eine mit TAE-Puffer gefüllte Laufkammer gesetzt. Die Proben wurden jeweils mit einem Ladepuffer (6 x Loading dye, MBI Fermentas) gemischt und in die vorgesehenen Geltaschen pipettiert. Als DNA-Marker wurden 3 µl 1 kb DNA Ladder (Gene Ruler) verwendet. Die Agarosegel-Elektrophorese fand bei 120 Volt statt. Danach wurden die aufgetrennten DNA-Banden unter UV-Licht betrachtet und mit der Geldokumentationsanlage fotodokumentiert. Bei Bedarf wurden die DNA-Banden aus dem 1%igen Agarosegel mit dem „QIAquick Gel Extraktion Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangabe aufgereinigt und eluiert.

3.3.3 Restriktionsenzymatischer Verdau von DNA-Fragmenten

Der restriktionsenzymatischen Verdau von Plasmid-DNA wurde angewandt, um ein Insert aus einem Expressionsvektor herauszuschneiden. Folgend war die Klonierung des Wildtyp-TNF-Insert und der TNF-Einzelmutanten-Inserts in den pEGFP.HA-Vektor möglich. Hierfür wurden die Restriktionsendonukleasen XMA I und NOT I verwendet, die nicht in der codierenden Sequenz für TNF oder des

HA-Tags schneiden. Ein 30 µl Ansatz bestand aus 3 µl 10x NEBuffer, 0,5µl XMA I, 1 µl NOT I, 3 µl 10x BSA, H₂O und 2 µl pEGFP_hLKLF-Vektor. Der Reaktionsansatz wurde für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Entsprechend wurden zur Amplifikation von TNF-Wildtyp und TNF-Einzelmutanten aus dem pCMV.Sport6-Vektor Primer mit XMA und NOT als Startpunkt gewählt. Anschließend erfolgte die Gelelektrophorese und Aufreinigung der DNA-Banden.

3.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von amplifiziertem Insert und restriktionsenzymatisch verdautem Vektor erfolgte mit der T4 DNA-Ligase. Das Enzym katalysiert hierbei in einem entsprechendem Mischungsverhältnis von Plasmid zu Insert eine Phosphodiesterbindung zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylende zu einem DNA-Strang. Ein Ligationsansatz wurde für 16 Stunden bei 14 °C inkubiert.

3.3.5 Transformation von Bakterien und Plasmidpräparation

Die Transformationen erfolgten über die Hitzeschockmethode nach Herstellerangabe. Hierzu wurde 1µl der Mutagenese-Ansätze in XL 10 Gold Ultrakompetent Zellen (Stratagene) transformiert. Transformierte Bakterien wurden in SOC-Medium für 1 Stunde bei 37°C und 250 RPM inkubiert und auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus transformierten *E.Coli* Bakterien erfolgte je nach erwarteter Ausbeute mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ (Qiagen) und „Endofree Plasmid Maxi Kits“ (Qiagen) nach Herstellerangabe. Nach erfolgter Isolierung der Plasmid-DNA wurde die DNA-Konzentration mittels Photometrie bestimmt.

3.3.6 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die Basenfolge der Einzelmutanten-Konstrukte wurde mit Hilfe der Sequenzierungsmethode nach Sanger mit Fluorochrom-markierten Didesoxynukleotiden ermittelt. Es wurde das „BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems) verwendet. Ein Sequenzieransatz bestand aus 2µl Plasmid-DNA (Ca. 500ng DNA aus Minipräparation), 4µl „Big dye

terminator“, 2µl Primer und 12µl dest. Wasser. Die PCR wurde wie folgend durchgeführt.

PCR-Sequenzierungsprogramm:

1. 96°C, 40 sec
2. 50°C, 15 sec
3. 60°C, 4 min
4. 28 Zyklen gehe zu 1.
5. auf 4°C halten

Nach der Sequenzierreaktion wurde die DNA mit 100%igem Ethanol und 3M Natriumacetat versetzt, 10min auf Eis gehalten und 30min bei 4°C und 13000 RPM zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 10 Minuten bei RT und 13.000 RPM zentrifugiert und getrocknet. Die Sequenzierung erfolgte über das Servicelabor des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg. Die Sequenzalignments wurden mit der DNASTAR Software (Madison, USA) erstellt.

3.4 ADP-Ribosylierungen

Zur Untersuchung der mono-ADP-Ribosyltransferasen (mARTs) haben sich in unserem Institut zwei Verfahren etabliert. Dazu gehören Assays mit dem monoklonalen Anti-etheno-Adenosin-Antikörper (1G4) und der Nachweis ADP-ribosylierter Proteine mittels radioaktiv markiertem NADs.

Wird Radioisotop ³²P markiertes NAD als Substrat der mART eingesetzt, können nach einem Western Blot die markierten Proteine in der anschließenden Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Die radioaktiv markierten Banden entsprechen den ADP-ribosylierten Proteinen. Hingegen kann der monoklonale Maus-Antikörper 1G4 die etheno-Adenosin-Gruppe des NAD-Analogons etheno-NAD, welches in Form von etheno-ADP-Ribose ART-vermittelt auf ein Protein übertragen wird, detektieren. Beide Verfahren wurden im Rahmen dieser Arbeit angewandt, um die Aktivität der hART 1 nachzuweisen und die Zielarginine der hART1 zu identifizieren.

3.4.1 Nachweis der etheno-ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen im FACS und im Western Blot

1G4 ist ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch an die etheno-Adenosin-Gruppe, z.B. des NAD-Analogons etheno-NAD (eNAD), bindet. Die mARTs können anstelle von NAD auch etheno-NAD als Substrat verwenden und so Zielproteine etheno-ADP-ribosylieren. Die an der Zelloberfläche lokalisierte ART reagiert mit dem zugeführten etheno-NAD, indem sie das Nikotinamid abtrennt und den etheno-Adenosin-Rest über ein Arginin an Zielproteine bindet. Die etheno-ADP-Ribosylierten-Zelloberflächenproteine können mit dem 1G4-Antikörper und mit Fluoreszenz- oder Peroxidase-markierten Sekundär-Antikörpern detektiert werden. Das Verfahren lässt sich im Western Blot, der Durchflusszytometrie und der Immunfluoreszenz-Mikroskopie anwenden (s. Abschnitt 1.3.4) [Krebs et al. 2003].

Zunächst wurden ca. 2×10^6 HEK293-Zellen auf eine 10cm Petrischale für adhärenente Zellen gesäht. Nach 24 Stunden erfolgte die Kotransfektion eines Expressionsplasmids (TNF-Wildtyp, TNF-Einzelmutanten, hP2X7, hENPP2 („Ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 2“)) und des hART1-Expressionsplasmids. Am Folgetag wurden die Zellen geerntet. Die Inkubation erfolgte je nach Versuchsreihe mit 10 μ M bis 50 μ M eNAD und 1mM ADP-Ribose, um NAD-Glycohydrolase-Aktivitäten, d.h. Freisetzung ungebundener ADP-Ribose, entgegenzuwirken für 30 Minuten bei 37°C und unter regelmässigem mixen. Um ungebundenes eNAD zu entfernen, wurden die Zellen 3x mit PBS oder RPMI gewaschen und in 1ml Volumen resuspendiert. Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen zum Nachweis der etheno-ADP-ribosylierten Proteine im FACS oder zur Immunpräzipitation und zum Western Blot verwendet. Die Anfärbung zur Durchflusszytometrie erfolgte entsprechend Abschnitt 3.2.1 mit einem gegen die etheno-Gruppe gerichteten und Fluoreszenz-konjugierten Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 in 100 μ l PBS +/- und für 30 Minuten bei 4°C. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen entfernt. Für den etheno-ADP-Ribosylierungsnachweis im Western Blot wurden die eNAD inkubierten Zellen lysiert und als Ganzzelllysate und Immunpräzipitat mit Protein G gekoppelten Magnetbeads für die SDS-Page verwendet. Die 20 μ l Ganzzelllysate und in 20 μ l 1x Sample Buffer aufgenommenen Präzipitate wurden in einem 12% Bis-Tris-Gel mit MOPS-

Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt und anschliessend auf eine NC- und PVDF-Membran geblottet. Nach dem Blocken der PVDF-Membran erfolgte die Inkubation mit dem unkonjugierten Maus-anti-etheno-Adenosin Antikörper und dem HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper. Im Falle einer zweiten Anfärbung erfolgte die Inkubation der PVDF-Membran nach erfolgter ECL-Detektion mit 800µl „Re-Blot-plus-strong Solution“ 10x und 7,2ml 5% Milchpulverlösung für 20 Minuten. Die Färbungen wurden mit dem ECL-System detektiert und auf mehreren Röntgenfilmen unterschiedlich lange exponiert. Die NC-Membranen wurden für die Silberfärbung verwendet.

3.4.2 ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen mittels radioaktiv markiertem NAD⁺

Die mART katalysiert die Bindung der ³²P-ADP-Ribose von ³²P-NAD auf einen Argininrest des Zielproteins unter Abspaltung von Nikotinamid, so dass die radioaktiv markierten ADP-ribosylierte Oberflächenproteine in der Autoradiographie sichtbar gemacht werden können. Entsprechend Abschnitt 3.4.1 wurden ca. 2x10⁶ Zellen HEK293-Zellen auf 10cm Petrischalen gesäht, nach 24 Stunden geerntet und kotransfiziert. Ein Fünftel der Zellen wurde zur Transfektionskontrolle im FACS verwendet. Der Rest der Zellen wurde in 180µl RPMI aufgenommen und mit 20µl des ³²P-NAD-Ribosylierungspuffers für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Pro Ansatz wurde eine Aktivität von 5 µCi ³²P-NAD berechnet. Danach erfolgten fünf bis sieben Waschschritte, um nicht gebundene Radioaktivität von den Zellen zu entfernen. Nach Pelletierung wurde die Lyse der ³²P-ADP-ribosylierten Zellen in einem Volumen von je 100µl Lysepuffer für 30 Minuten bei 4°C durchgeführt. 20µl der Ganzzelllysate wurden direkt für die SDS-Page und die restlichen 80µl für Immunpräzipitationen verwendet. Für die SDS-Page wurden 12% Bis-Tris-Gele verwendet. Die 20µl Ganzzelllysate wurden mit MES-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine NC- und PVDF-Membran geblottet. Die in 20µl 1xSampleBuffer aufgenommenen Präzipitate wurden mit MOPS-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt und ebenfalls auf eine NC- und PVDF-Membran geblottet. Zunächst erfolgte nach dem Blocken die Inkubation mit einem unkonjugierten Primärantikörpern und HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper und Chemilumineszenz-Detektion. Abschließend wurden Röntgenfilme

unterschiedlich lange mit den PVDF-Membranen bei -80°C inkubiert. Die NC-Membran wurde für die Silberfärbung verwendet.

4. Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in drei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt wird die Zelloberflächenexpression von TNF und hART1 mittels verschiedener Detektionsverfahren verifiziert und die GPI-Verankerung der hART1 nachgewiesen. Im zweiten Abschnitt werden HEK293-Zellen transient mit hART1 und TNF ko-transfiziert. TNF wird als Zielprotein der hART1 mittels Durchflusszytometrie bestätigt. Im dritten Abschnitt werden die potentiellen ADP-Ribosylierungsstellen im TNF näher untersucht. Zunächst erfolgt die zielgerichtete Mutagenese der nicht-konservierten Arginine (R82K, R107K, R120K, R179K, R207K, R214K) von löslichem TNF (sTNF) zu Lysin. Nach Ko-Transfektion von TNF-Einzelmutanten und hART1 in HEK293-Zellen wird die ADP-Ribosylierung von Wildtyp-TNF- und TNF-Einzelmutanten mittels radioaktiv markiertem NAD^+ vergleichend untersucht. Des Weiteren erfolgt die Klonierung der Einzelmutanten in einen HA-getaggten Expressionsvektor und die zielgerichtete Mutagenese der zwei Arginine der Stielregion (R60K, R65K). Anschließend wird die ADP-Ribosylierung von Wildtyp-TNF und TNF-Einzelmutanten mittels radioaktiv markiertem NAD^+ und etheno-ADP-Ribosylierung vergleichend untersucht.

4.1 Expression von hART1 und TNF auf HEK293-Zellen

In diesem Kapitel werden die Verfahren zur Detektion von TNF und hART1 optimiert und etabliert. HEK293-Zellen wurden mit TNF oder hART1 transient transfiziert und die Expression mit verschiedenen Nachweismethoden untersucht.

4.1.1 Expression und Detektion von TNF auf HEK293-Zellen

Der folgende Abschnitt schildert den Nachweis der Expression von TNF auf HEK293-Zellen. Die Expression wurde nach transienter Transfektion von HEK293-Zellen mit TNF mittels FACS und Western Blot verifiziert.

Nachweis der Expression mittels FACS

Die Expression von TNF auf HEK293-Zellen wurde im FACS untersucht. Dazu wurden HEK293-Zellen transient mit TNF transfiziert und mit Antikörpern gegen

TNF und Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörpern inkubiert. Für den Nachweis von TNF wurden unterschiedliche monoklonale Antikörper (mAb) (Clone MAb1 (Nr.169); polyklonales Ziege-anti-TNF (Nr.192)) verwendet. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK293-Zellen mitgeführt. In Abb. 4.1 wird gezeigt, dass TNF auf HEK293-Zellen exprimiert wurde. Beide Antikörper wiesen dabei eine differenzierte höhere mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) auf als die Negativkontrollen und wurden in der weiteren Arbeit verwendet.

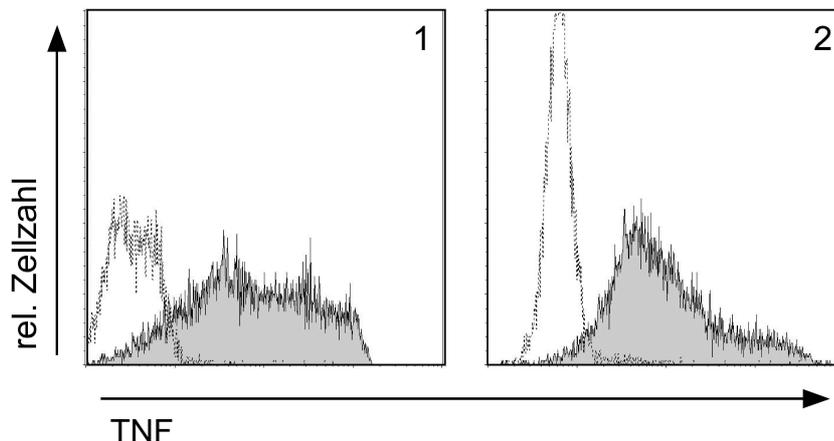


Abb.4.1: FACS-Analyse der Expression von TNF auf HEK293-Zellen nach transients Transfektion. HEK293-Zellen wurden entweder untransfiziert (gestrichelte Linie) oder nach transients Transfektion mit TNF (graue Fläche) mit TNF-spezifischen Antikörpern und Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörpern inkubiert. Der Erfolg der Transfektion bzw. die Spezifität der gegen TNF-gerichteten Antikörper wurde mittels FACS-Analyse eruiert. Panel 1: Anti-human-TNF-Antikörper_{Maus} (Nr.169). Panel 2: Anti-human-TNF-Antikörper_{Ziege} (Nr. 192).

Nachweis der Expression mittels Western Blot

Die Expression von TNF auf HEK293-Zellen wurde ferner mittels Immunodetektion untersucht. HEK293-Zellen wurden transient mit TNF transfiziert, lysiert und per SDS-PAGE größenfraktioniert. Nach der Übertragung der Proteine auf eine NC- und PVDF-Membran erfolgte die Inkubation der PVDF-Membran mit TNF-spezifischen Antikörpern und HRP-gekoppelten Zweitantikörpern. Zur Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK293-Zellen und hART1-transfizierte Zellen mitgeführt. In Abb. 4.2.A zeigt die Silberfärbung den Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Spuren. TNF wurde spezifisch mit beiden Antikörpern nachgewiesen. Die beiden Antikörper zeigten ein differentes Bandenmuster (Abb. 4.2.B). Antikörper Nr. 192 bindet sowohl lösliches TNF (sTNF, 17 kDa) als auch transmembranäres TNF (mTNF, 26 kDa).

Hingegen bindet Antikörper Nr. 189 nur mTNF. Um in weiteren Versuchen ein möglicherweise verändertes Bindungsverhalten der Antikörper an modifizierte Formen von TNF darstellen zu können und sowohl sTNF als auch mTNF detektieren zu können, wurde für die folgenden Studien Antikörper Nr.192 in Western Blot-Analysen weiter verwendet.

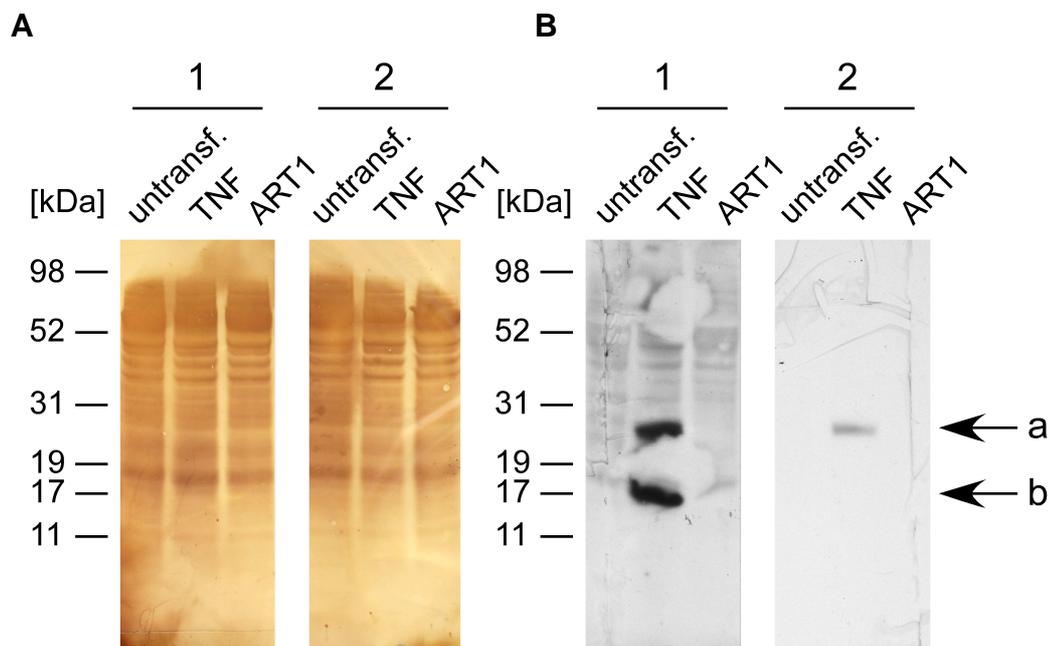


Abb.4.2: SDS-PAGE und Immunoblot-Analyse mit TNF-spezifischen Antikörpern. HEK293-Zellen wurden entweder untransfiziert (Spur: 1), mit TNF (Spur: 2) oder mit hART1 (Spur: 3) transient transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und per SDS-PAGE größenfraktioniert. Anschließend wurden die Membranen zum einen einer Silberfärbung (A) unterzogen, um die Proteinbeladung der Spuren abschätzen zu können, zum anderen wurde mittels Immunodetektion (B) das spezifische Bandenmuster der TNF-spezifischen Antikörper analysiert. 1: Detektion mit Anti-TNF-Antikörper _{Ziege} (Nr. 192). 2: Detektion mit Anti-TNF-Antikörper _{Maus} (Nr. 189). a: mTNF, 26 kDa . b: sTNF, 17 kDa .

In einer weiteren Studie wurde per Immunodetektion mit Antikörper Nr. 192 das Bandenmuster von TNF nach Lyse und Immunpräzipitation vergleichend untersucht (Abb. 4.3). Hierzu wurden HEK293-Zellen mit TNF transient transfiziert, lysiert, ein Teil der Lysate mit Infliximab-gekoppelten Magnetbeads inkubiert und sowohl Lysate als auch Immunpräzipitate per SDS-PAGE größenfraktioniert und immunodetektiert. Infliximab ist ein chimärer monoklonaler Antikörper gegen TNF, der z.B. bei der Therapie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt wird [Feldmann 2002]. Als Negativkontrolle wurden Lysate von transient mit P2X7 transfizierten HEK293-Zellen mit den gekoppelten Magnetbeads inkubiert und mitgeführt. Die Silberfärbung zeigt den Nachweis

einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Spuren (Abb. 4.3.A). Die Immunodetektion von TNF nach Lyse und Immunpräzipitation zeigt ein differentes Bandenmuster. Die Immunodetektion des Lysats mit Antikörper Nr. 192 zeigt die erwarteten Banden von sTNF, 17 kDa und mTNF, 26 kDa (Abb. 4.3.B). Hingegen konnte nach Immunpräzipitation mit Infliximab-gekoppelten Magnetbeads sTNF, mTNF und eine zusätzliche Bande von 51 kDa detektiert werden, die einem TNF-Trimer (tTNF) entspricht (Abb. 4.3.C). Aus dem Überstand des TNF-Immunpräzipitats konnte keine TNF-Form nachgewiesen werden, was für eine spezifische Bindung und adäquate Menge des eingesetzten Infliximab spricht.

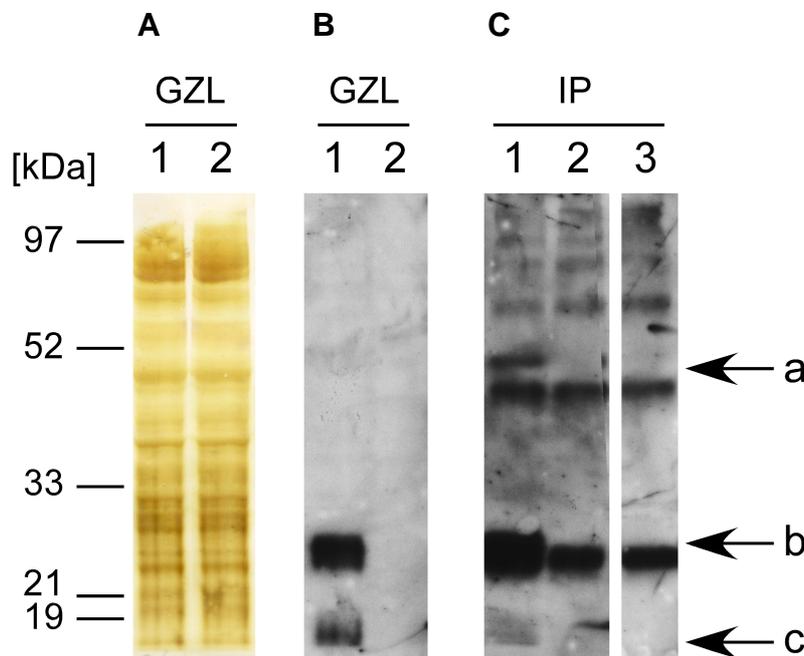


Abb.4.3: SDS-PAGE und Immunoblot-Analyse von TNF-Lysat und -Immunpräzipitat. HEK293-Zellen wurden nach transienter Transfektion mit TNF (Spur: 1) oder P2X7 (Spur: 2) lysiert und ein Aliquot der Gesamtzelllysate direkt per SDS-PAGE größenfraktioniert. Der Rest der Lysate wurde zur Immunopräzipitation mit einem spezifischen an Magnetbeads gekoppelten Antikörper verwendet. Die Membranen des Western Blots wurden zum einen einer Silberfärbung (A) unterzogen, zum anderen wurde mittels Immunodetektion mit einem TNF-spezifischen Antikörper das Bandenmuster der Lysate (B) und Immunpräzipitate (C) verglichen. Zur Analyse der Bindungskapazität der an Magnetbeads gekoppelten Antikörper wurde der Überstand des TNF-Präzipitats erneut immunpräzipitiert und aufgetragen (Spur: 3). B-C: Detektion mit Anti-TNF-Antikörper ziege (Nr.192). a: tTNF, 51 kDa. b: mTNF, 26 kDa. c: sTNF, 17 kDa.

Schließlich ist in dieser Studie, wie auch in folgenden mit erfolgter Immunpräzipitation ein Hintergrundbandenmuster aufgrund von Antikörperketten und Protein G zu beachten.

4.1.2 Expression und Aktivität von hART1 auf HEK293-Zellen

Der folgende Abschnitt schildert den Nachweis der Expression der hART1 auf HEK293-Zellen. Die Expression wurde nach transienter Transfektion von HEK293-Zellen mit hART1 mittels Durchflusszytometrie verifiziert. Weiterhin konnte die GPI-Verankerung der hART1 mittels PI-PLC-Behandlung und anschließender FACS-Analyse bestätigt werden.

Nachweis der Expression mittels FACS

Die Expression der hART1 auf HEK293-Zellen wurde im FACS-Assay untersucht. Dazu wurden HEK293-Zellen transient mit hART1 transfiziert und mit spezifischen Antikörpern und Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörpern inkubiert. Für den Nachweis der hART1 wurden unterschiedliche Antikörper verwendet. Ein gegen hART1-gerichtetes aufgereinigtes Immunsereum aus dem Kaninchen (Nr. K315) und ein FLAG-Tag spezifischer Antikörper (M2-AK, Nr.6). Das verwendete hART1-Konstrukt war mit einem FLAG-Tag versehen, d.h. ein rekombinant eingefügtes Epitop, das die Erkennung eines Proteins durch einen spezifisch gegen dieses Epitop gerichteten Antikörper ermöglicht. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK293-Zellen mitgeführt. Die Abb. 4.4 zeigt, dass die hART1 auf HEK293-Zellen exprimiert wurde. Beide Antikörper wiesen eine höhere MFI auf als die Negativkontrollen. Jedoch zeigte der FLAG-Tag-spezifische Antikörper (Nr.6) eine deutlichere Differenzierung der MFI von negativen und positiven Zellen.

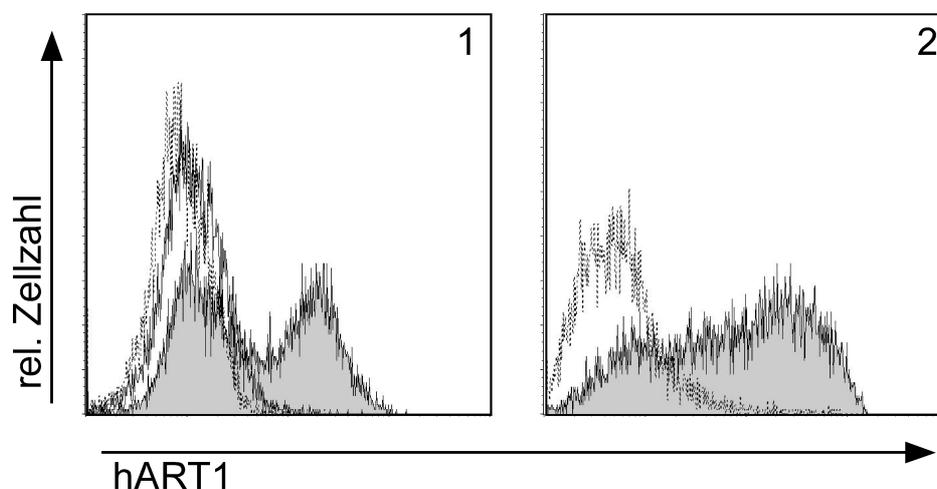


Abb.4.4: FACS-Analyse der Expression von hART1 und der Bindungsfähigkeit von hART1- und FLAG-tag-spezifischen Antikörpern auf HEK293-Zellen nach transienter Transfektion. HEK293-Zellen wurden untransfiziert (gestrichelte Linie) und

nach transienter Transfektion mit hART1 (graue Fläche) mit Antikörpern gegen hART1 (Panel 1), FLAG-tag (Panel 2) und Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörpern inkubiert und im FACS analysiert. Um die Spezifität des hART1-Antikörpers Nr. K315 zu kontrollieren wurde ebenfalls ein Aliquot der mit hART1 transfizierten Zellen mit dem Präimmunserum inkubiert (Panel 1: schwarze Linie). Panel 1: Anti-human-ART1-Antikörper_{Kaninchen} (Nr. K315). Panel 2: Anti-FLAG-tag-Antikörper_{Maus} (Nr.6).

Nachweis der GPI-Verankerung der hART1 nach transienter Transfektion

Die hART1 ist ein GPI-verankertes, membranständiges Ekto-Enzym [Okazaki und Moss 1998]. Auf diese spezifische GPI-Verankerung hin wurde die hART1 überprüft. Dazu wurde ein Aliquot von transient hART1-exprimierenden HEK293-Zellen mit Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) inkubiert, die die GPI-verankerten Proteine hydrolytisch von der Zelloberfläche schneidet [Donnelly et al. 1996]. Die transient hART1-exprimierenden HEK293-Zellen wurden mit und ohne PI-PLC-Behandlung im FACS auf die GPI-Verankerung hin überprüft. Als Negativkontrolle wurden TNF-exprimierende HEK293-Zellen mitgeführt. Zum Nachweis der hART1 wurden ein gegen hART1-gerichteter Antikörper (Nr. R19A3) und der FLAG-Tag spezifische Antikörper (Nr.6) verwendet. Die Abb. 4.5 zeigt, dass die hART1 und TNF auf HEK293-Zellen exprimiert werden und die hART1 spezifisch durch PI-PLC von der Zelloberfläche abgespalten wird. Die PI-PLC-Behandlung von transient hART1-exprimierenden HEK293-Zellen führte zu einem deutlichen Rückgang der MFI im Vergleich zu transient hART1-exprimierenden HEK293-Zellen ohne PI-PLC-Behandlung. Dies bestätigt GPI-Verankerung der hART1. Hingegen zeigte die Behandlung von TNF-exprimierenden Zellen mit PI-PLC keine Reduktion der MFI, da TNF ein Typ II-Transmembranprotein ist und von Metalloproteasen wie TACE von der Zelloberfläche abgespalten wird. Im Vergleich der Spezifität des gegen hART1-gerichteten Antikörpers (Nr. R19A3) und des FLAG-Tag spezifischen Antikörpers (Nr.6) zeigte der FLAG-Tag spezifische Antikörper (Nr.6) eine deutlichere Differenzierung der MFI von transient hART1-exprimierenden HEK293-Zellen ohne und mit PI-PLC-Behandlung.

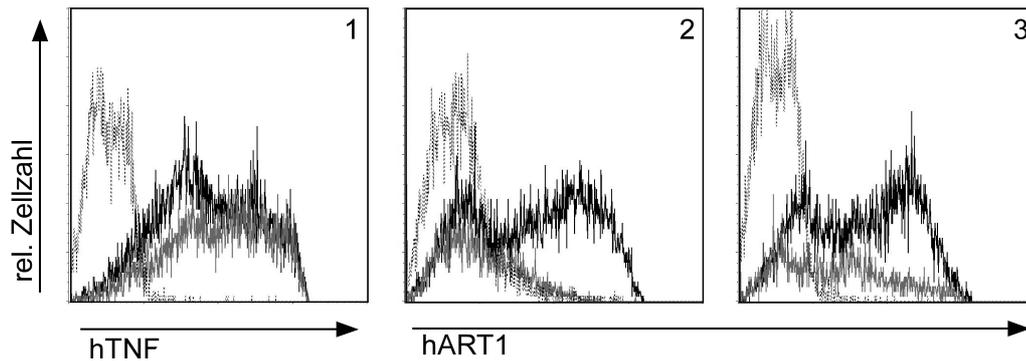


Abb.4.5: FACS-Assay der FLAG-getagten hART1 auf HEK293-Zellen nach transienter Transfektion. HEK293-Zellen wurden entweder untransfiziert (gestrichelte Linie), nach transienter Transfektion mit hART1 (Panel 2-3) und TNF (Panel 1) mit PI-PLC (graue Linie) oder ohne PI-PLC (schwarze Linie) inkubiert, welches GPI-verankerte Proteine von der Zelloberfläche abspaltet. Die Zellen wurden anschließend mit spezifischen Antikörpern gefärbt und im FACS analysiert. Panel 1: Anti-human-TNF-Antikörper_{Maus} (Nr.169). Panel 2: Anti-FLAG-tag-Antikörper_{Maus} (Nr.6). Panel 3: Anti-human-ART1-Antikörper_{Ratte} (Nr.R19A3).

4.2 Analyse von TNF als Zielprotein der hART1 auf HEK293-Zellen

Nachdem im ersten Kapitel die Zelloberflächenexpression von TNF und der hART1 auf transient transfizierten HEK293-Zellen verifiziert werden konnte, wird in diesem Kapitel die ADP-Ribosylierung des TNF als Zielprotein der hART1 untersucht.

4.2.1 Nachweis der ADP-Ribosyltransferase-Aktivität von hART1 auf HEK 293-Zellen

Nachweis der etheno-ADP-Ribosylierung von Oberflächenproteinen mittels FACS

In diesem Abschnitt wird die ADP-Ribosylierungs-Aktivität der hART1 bestätigt. Dazu wurden transient TNF/ hART1-exprimierende HEK293-Zellen mit etheno-NAD inkubiert und die erfolgreiche etheno-ADP-Ribosylierung mit dem monoklonalen Antikörper 1G4 im FACS nachgewiesen. Als Positivkontrolle der ADP-Ribosylierungsaktivität der hART1 wurden transient P2X7/hART1-exprimierende HEK293-Zellen mit dem gleichen Verfahren auf die etheno-ADP-Ribosylierung hin überprüft. Die Zelloberflächenexpression der Proteine wurde

mit spezifischen Antikörpern im FACS nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK293-Zellen mitgeführt. Die Untersuchung (Abb. 4.6) zeigte, dass hART1 und TNF auf HEK293-Zellen exprimiert wurden, während sich die Expression von P2X7 mit dem Anti-human-P2X7-Antikörper Nr. 139 kaum nachweisen ließ. Hingegen wiesen TNF/hART1-exprimierende Zellen eine deutlich höhere MFI nach Inkubation mit Anti-TNF-Antikörper Nr. 169 und Anti-FLAG-tag-Antikörper Nr.6 auf als die Negativkontrolle bei jedoch geringer Zellzahl. Obwohl die Anfärbung mit dem 1G4-Antikörper keine Aussage über die Identität der modifizierten Zielproteine der etheno-ADP-Ribosylierung machen kann, deutet die höhere Stärke der 1G4-Fluoreszenz in den mit TNF transfizierten Zellen darauf hin, dass TNF modifiziert wurde. Diese Annahme wurde durch die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Immunpräzipitationen bestätigt.

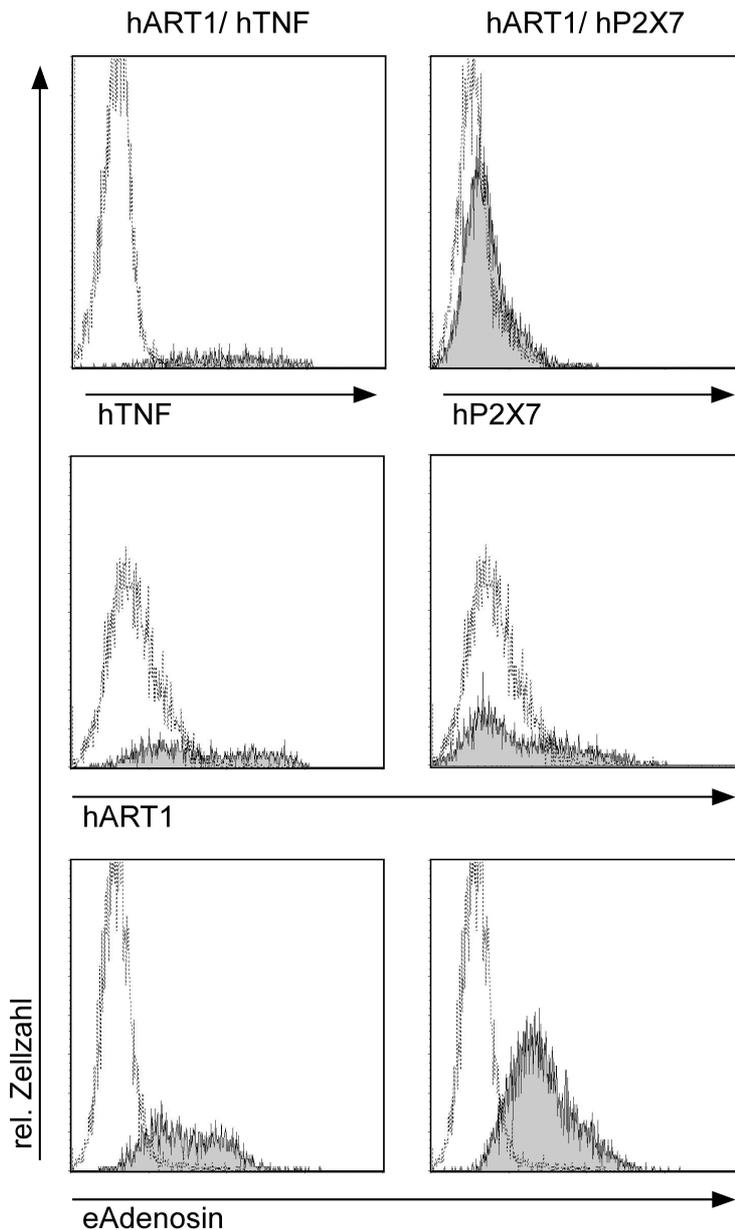


Abb.4.6: Analyse der Aktivität von hART1 nach transienter Ko-Transfektion mit TNF. HEK293-Zellen wurden entweder untransfiziert (gestrichelte Linie) oder mit TNF und hART1 (Panel 1,3,5) bzw. P2X7 und hART1 (Panel 2,4,6) transient ko-transfiziert (graue Fläche). Die Zellen wurden mit eNAD inkubiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Mittels FACS wurde der Erfolg der Transfektion, sowie die Ribosylierungsaktivität der hART1 analysiert. Panel 1: Anti-human-TNF-Antikörper_{Maus} (Nr.169). Panel 2: Anti-human-P2X7-Antikörper gAlexa_{Maus} (Nr.139/L4). Panel 3-4: Anti-FLAG-tag-Antikörper_{Maus} (Nr.6). Panel 5-6: Anti-etheno-Adenosin-Antikörper gAlexa_{Maus} (Nr.93/1G4)

4.3 Analyse von ADP-Ribosylierungsstellen im sezernierten Teil des TNF

Dieses Kapitel widmet sich der zentralen Fragestellung dieser Arbeit, der Identifizierung der ADP-Ribosylierungsstelle(n) in TNF. Die potentiellen ADP-

Ribose-Akzeptorarginine im TNF wurden mittels zielgerichteter Mutagenese zu Lysin verändert. Der Einfluss dieser Mutationen im TNF auf die Bindungsaffinität spezifischer Antikörper und auf die ADP-Ribosylierung von TNF wurde vergleichend untersucht. Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass TNF an mehreren Argininen ADP-ribosyliert wird.

4.3.1 Identifikation der ADP-Ribosylierungsstelle von TNF durch zielgerichtete Mutagenese

In der Einleitung dieser Arbeit wurde bereits vorgestellt, dass vorherige Untersuchungen bestätigten, dass die hART1 speziesspezifisch humanes TNF ADP-ribosyliert [Laing S. 2005]. Aufgrund der Tatsache, dass die hART1 eine Arginin-spezifische ADP-Ribosyltransferase ist, wurden durch Sequenzvergleich von humanem und murinem löslichem TNF sechs humanspezifische Arginine (R82K, R107K, R120K, R179K, R207K, R214K) identifiziert (s. Abschnitt 1.4), die potentielle ADP-Ribosylierungsstellen darstellen. In der dreidimensionalen Struktur von TNF liegen diese Arginine auf der Oberfläche des Moleküls. Basierend auf diesen Erkenntnissen schildert der folgende Abschnitt die zielgerichtete Mutagenese dieser sechs Arginine. Die TNF-Einzelmutanten wurden mittels FACS auf ihre Zelloberflächenexpression und ihre Antikörperbindungsfähigkeit hin überprüft. Des Weiteren wurden HEK293-Zellen mit TNF-Wildtyp oder TNF-Einzelmutanten und hART1 ko-transfiziert und mittels radioaktivem Ribosylierungsassay auf ihre ADP-Ribosylierung hin untersucht.

4.3.1.1 Zielgerichtete Mutagenese nicht konservierter Arginine im TNF

Nachdem die sechs ADP-Ribosylierungsstellen der löslichen TNF-Form (R82K, R107K, R120K, R179K, R207K, R214K) aufgrund eines Sequenzvergleichs identifiziert wurden, wurden diese Arginine in dem humanen TNF-Insert des Vektors pCMV.Sport6 mutiert. Um an der Sekundär- und Tertiärstruktur des Moleküls so wenig wie möglich zu verändern, wurde Lysin, als die konservativste Austauschaminosäure, gewählt. Um die Mutagenese durchzuführen wurde das Ursprungsplasmid mit dafür entworfenen Mutageneseprimern, welches das für Arginin (R) kodierende Triplet zu einem für Lysin (K) kodierendes Triplet umwandeln, amplifiziert. Anschließend wurde die DNA des Ursprungsplasmids

durch die Methylierungssensitive Endonuklease *Dpn* I verdaut. Der Erfolg der Mutation wurde mittels Sequenzierung kontrolliert. Die Abb. 4.7 zeigt die Linearisierung der erzeugten Vektoren nach erfolgreicher Amplifikation und *Dpn* I-Verdau.

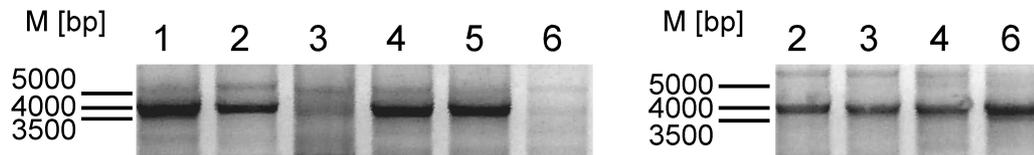


Abb.4.7: Klonierung von humanem TNF im pCMV.Sport6-Vektor. Das Konstrukt pCMV.Sport6.TNF wurde jeweils mit Vorwärts- und Rückwärtsprimern, welche ein für Arginin (R) kodierendes Triplet zu einem für Lysin (K) kodierendes Triplet umwandeln, in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Anschließend erfolgte der Verdau mit *Dpn* I und die elektrophoretische Auftrennung der neuen Konstrukte zur Erfolgskontrolle. Die Vektoren wurden in *E.coli* transformiert, ausplattiert und es wurde von je 8 Klonen pro Platte eine Vorkultur zur Plasmidpräparation angesetzt. Die mutierten TNF-Inserts wurde zur Kontrolle sequenziert. 1: R82K. 2: R107K. 3: R120K. 4: R179K. 5: R207K. 6: R214K

4.3.1.2 Expression und Detektion der TNF-Einzelmutanten auf HEK293-Zellen

Nachdem die Mutanten des TNF hergestellt und per Sequenzierung kontrolliert worden waren, wird in diesem Abschnitt die Zelloberflächenexpression der TNF-Einzelmutanten auf HEK293-Zellen verglichen und die Auswirkung der Mutationen auf die Erkennung durch Antikörper mittels Durchflusszytometrie überprüft.

Nachweis der Expression mittels FACS

Die Expression von Wildtyp-TNF und TNF-Einzelmutanten auf HEK293-Zellen wurde im FACS-Assay untersucht. Dazu wurden HEK293-Zellen transient mit Wildtyp-TNF oder TNF-Einzelmutanten transfiziert und mit spezifischen Antikörpern gegen humanen TNF und Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörpern inkubiert. Für den Nachweis von TNF wurden unterschiedliche mAb (Nr.44; Nr.169; Nr.189; Nr.206; Tab. 3.1) verwendet. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK293-Zellen mitgeführt. Die Untersuchung (Abb. 4.8) konnte die Expression von Wildtyp-TNF und TNF-Einzelmutanten auf HEK293-Zellen mit drei von vier spezifischen Anti-TNF-Antikörpern erfolgreich nachweisen. Es ließ sich im Vergleich zum Wildtyp keine bedeutsame Zu- oder Abnahme der MFI der TNF-Einzelmutanten nachweisen. Einzig Antikörper

Nr.206 (Infliximab) wies eine einheitlich geringere MFI auf als andere Antikörper. Die TNF_R107K Mutante war zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht fertig gestellt und wurde in dieser Serie nicht analysiert.

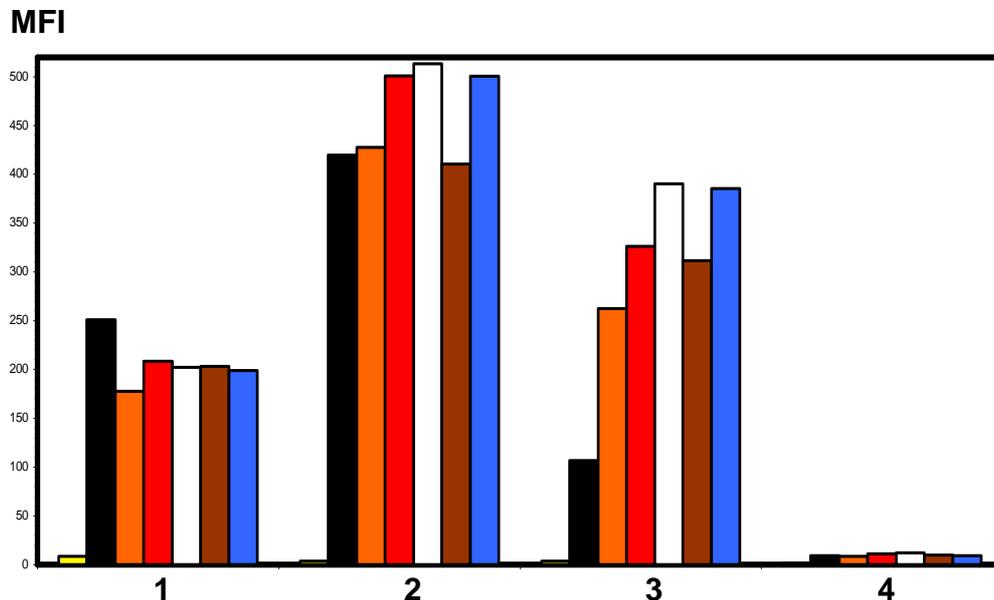


Abb.4.8: FACS-Analyse des Expressionsniveaus von Wildtyp-TNF und TNF-Einzelmutanten auf HEK293-Zellen nach transients Transfektion. HEK293-Zellen wurden entweder untransfiziert oder nach transients Transfektion mit TNF oder TNF-Einzelmutanten mit spezifischen gegen TNF gerichteten Antikörpern inkubiert. Die Expression bzw. die Affinität der Antikörper wurde mittels FACS verglichen. Balkendiagramm: Gelb: Untransfizierte Zellen; Schwarz: Wildtyp-TNF; Orange: TNF_R82K; Rot: TNF_R120K; Weiss: TNF_R179K; Braun: TNF_R207K; Blau: TNF_R214K; 1: Anti-human-TNF-Antikörper_{Maus} biot. (Nr.44). 2: Anti-human-TNF-Antikörper_{Maus} (Nr. 169). 3: Anti-human-TNF-Antikörper_{Maus} (Nr. 189). 4: Anti-human-TNF-Antikörper_{Human} (Nr. 206).

Die Spezifität und Affinität des Antikörpers Nr.206 und des verwendeten Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörpers wurde mittels einer weiteren FACS-Analyse überprüft (Abb. 4.9). Dazu wurden HEK293-Zellen transient mit Wildtyp-TNF oder der Variante TNF_R214K transfiziert und mit dem Antikörpern Nr.206 und zwei verschiedenen Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörpern inkubiert. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK293-Zellen mitgeführt. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der MFI sowohl bei Wildtyp-TNF, als auch bei TNF_R214K bei Verwendung des PE-gekoppelten Zweitantikörpers Nr. 62, der ebenfalls in der vorherigen Untersuchung verwendet worden war. Aus der Untersuchung ließ sich schlussfolgern, dass die Abnahme der MFI sich nicht auf eine geringere Affinität des Antikörpers Nr.206 zurückführen lässt, sondern auf eine Fehlfunktion des

verwendeten Zweitantikörpers Nr. 62. Hingegen zeigte sich bei Verwendung des Zweitantikörpers Nr. 71 eine adäquat erhöhte MFI im Gegensatz zur Negativkontrolle.

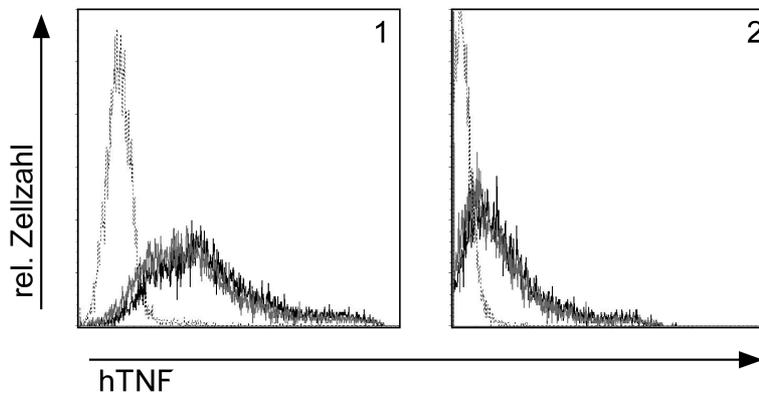


Abb.4.9: FACS-Analyse der Bindungsfähigkeit des TNF-spezifischen Antikörpers Infliximab auf HEK293-Zellen nach transienter Transfektion. HEK293-Zellen wurden entweder untransfiziert (gestrichelte Linie) oder nach transienter Transfektion mit TNF (schwarze Linie) oder TNF_R214K (graue Linie) mit dem Antikörper Infliximab und zwei Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörpern inkubiert, und mittels FACS analysiert. 1: Anti-human-TNF-Antikörper_{Human} (Nr. 206) > Anti-human-Ig-Antikörper_{Ziege} FITC (Nr. 71). 2: Anti-human-TNF-Antikörper_{Human} (Nr. 206) > Anti-human-Ig-Antikörper_{Ziege} PE (Nr. 62)

4.3.1.3 ADP-Ribosylierung von TNF durch die hART1

In diesem Abschnitt wird die ADP-Ribosylierung der potentiellen ADP-Ribosylierungsstellen im sTNF vergleichend untersucht. TNF-Wildtyp und Einzelmutanten wurden jeweils mit hART1 auf HEK293-Zellen transient kointransfiziert, mittels FACS auf Ihre Expression hin überprüft und zum Nachweis der ADP-Ribosylierung wurde radioaktiv markiertes NAD^+ verwendet.

Nachweis der ADP-Ribosylierung von TNF auf HEK293-Zellen mittels radioaktiv markiertem NAD^+

Im folgenden Abschnitt werden zwei Autoradiographie-Analysen gezeigt. Zum Zeitpunkt der ersten Analyse war die zielgerichtete Mutagenese von TNF_R107K noch nicht fertig gestellt und die Untersuchung erfolgte ohne diese Variante.

Für die erste Untersuchung wurden HEK293-Zellen transient mit hART1 und Wildtyp-TNF bzw. TNF-Einzelmutanten transfiziert, mit $^{32}\text{P-NAD}^+$ inkubiert und mit einem TNF-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Als Positivkontrolle der ADP-Ribosylierungsaktivität der hART1 wurden transient P2X7/hART1-exprimierende HEK293-Zellen mit dem gleichen Verfahren auf die ADP-

Ribosylierung hin überprüft. Zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung wurden ebenfalls Protein G Magnetbeads ohne gekoppelten Antikörper mit den Lysaten inkubiert und aufgetrennt. Die Immunpräzipitate wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und auf eine PVDF-Membran geblottet. Anschließend folgte die Immunodetektion der PVDF-Membran mit einem TNF-spezifischen Antikörper und von derselben Membran eine Autoradiographie. Die Untersuchung (Abb. 4.10) zeigt, dass sowohl die Immunodetektion als auch die Autoradiographie der Protein G Magnetbeads ohne gekoppelten Antikörper nach Inkubation mit den Lysaten keine unspezifischen Proteinbindungen eingehen und keine ADP-Ribose binden. Wie bereits in vorherigen Untersuchungen weisen die Protein G Magnetbeads im Western Blot ein eigenes Hintergrundbandenmuster auf. Per Immunodetektion der Immunopräzipitate von hART1/ Wildtyp-TNF und hART1/ TNF-Einzelmutanten konnte ihre Expression bestätigt werden. Es wurde jeweils ein Bandenmuster bei 17 kDa (sTNF), 26 kDa (mTNF) und 51 kDa (tTNF) bei Wildtyp-TNF, TNF_R82K, TNF_R120K, TNF_R179K und TNF_R207K nachgewiesen. Die entsprechenden Banden von TNF_R214K und P2X7 konnten nicht detektiert werden, am ehesten aufgrund fehlerhafter Expression. Daher wurde in den weiteren Analysen im Vorfeld die erfolgreiche Transfektion mittels FACS überprüft. Die Autoradiographie der Immunopräzipitate von hART1/ Wildtyp-TNF und hART1/ TNF-Einzelmutanten nach radioaktiver ADP-Ribosylierung mit $^{32}\text{P-NAD}^+$ zeigt, dass die untransfizierten HEK293-Zellen keine Radioaktivität inkorporieren und somit keine endogene Zelloberflächen-ADP-Ribosylierungsaktivität besitzen. Hingegen konnte die ADP-Ribosylierung von Wildtyp-TNF, TNF_R82K, TNF_R120K, TNF_R179K und TNF_R207K durch Immunodetektion bestätigt werden. Es wurden jeweils radioaktiv markierte Banden bei 17 kDa (sTNF) und 26 kDa (mTNF) nachgewiesen. Hierbei zeigte sich das Bandensignal von transmembranärem TNF (mTNF α , 26 kDa) einheitlich stärker als von löslichem TNF (sTNF, 17 kDa), was vermuten lässt, dass mTNF mehr ADP-Ribosylierungsstellen besitzt und stärker ADP-ribosyliert wird als sTNF. Im Vergleich der Signalstärke der TNF-Einzelmutanten zeigte TNF_R82K die qualitativ schwächsten radioaktiv markierten Banden, jedoch zeigte Wildtyp-TNF ebenfalls ein schwächeres Signal als TNF_R120K, TNF_R179K, TNF_R207K.

P2X7 sollte als Positivkontrolle der ADP-Ribosylierung dienen und konnte in dieser Analyse bei fehlender Expression nicht nachgewiesen werden.

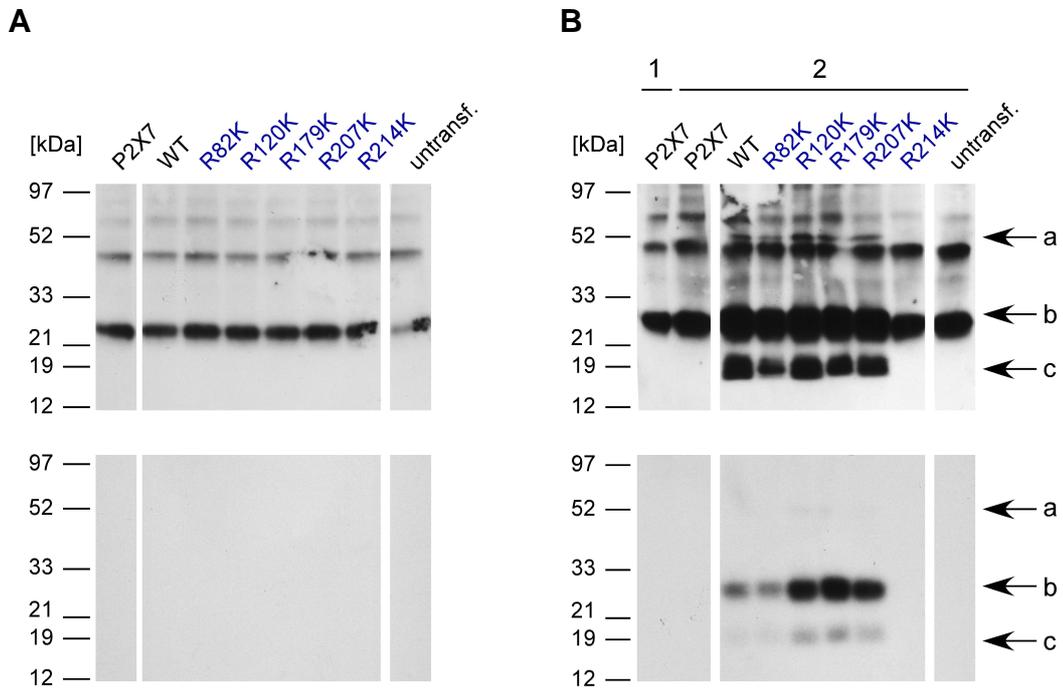


Abb.4.10: Analyse der ADP-Ribosylierung von Wildtyp-TNF und TNF-Varianten mit Einzelsubstitution der nicht konservierten Arginine. HEK293-Zellen wurden jeweils mit hART1, sowie mit P2X7 oder Wildtyp-TNF bzw. TNF-Einzelmutanten transient ko-transfiziert. Nach einem Tag wurden die Zellen geerntet und für 30 Minuten bei 37°C mit je 5 µCi $^{32}\text{P-NAD}^+$ inkubiert. Nicht inkorporiertes $^{32}\text{P-NAD}^+$ wurde durch mehrere Waschgänge entfernt. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten bei 4°C lysiert und mit einem TNF-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert (B). Zur Kontrolle wurden ebenfalls Protein G Magnetbeads ohne gekoppelten Antikörper mit den Lysaten inkubiert und aufgetrennt (A). Die Immunpräzipitate wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und auf eine PVDF-Membran geblottet. Zur Immunodetektion (obere Bilderreihe) wurde die PVDF-Membran mit einem TNF-spezifischen Antikörper inkubiert. Anschließend wurde von derselben Membran eine Autoradiographie (untere Bilderreihe) durchgeführt. A: Spur 1:P2X7+hART1; Spuren 2-7: TNF_WT, _82, _120, _179, _207, _214+hART1; Spur 8: Untransfizierte HEK293-Zellen; B: Spur 1-2: P2X7+hART1; Spuren 3-8:TNF_WT, _82, _120, _179, _207, _214+hART1; Spur 9: Untransfizierte HEK293-Zellen; 1: Immunpräzipitation mit Anti-P2X7-Antikörper. 2: Immunpräzipitation mit Anti-human-TNF-Antikörper_{Human}. a: tTNF, 51 kDa. b: mTNF, 26 kDa. c: sTNF, 17 kDa.

Für die zweite Autoradiographie-Analyse wurden HEK293-Zellen transient mit hART1 und Wildtyp-TNF bzw. TNF-Einzelmutanten transfiziert, mit $^{32}\text{P-NAD}^+$ inkubiert und mit einem TNF-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Als Positivkontrolle der ADP-Ribosylierungsaktivität der hART1 wurden transient P2X7/hART1-exprimierende HEK293-Zellen mitgeführt. Die Immunpräzipitate und ein Aliquot der Ganzzelllysate wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und auf eine PVDF-Membran geblottet. Anschließend folgte die

Immunodetektion der PVDF-Membranen mit einem TNF-spezifischen Antikörper und von derselben Membran eine Autoradiographie. Je ein Aliquot der Transfektanten wurde mittels FACS auf die Expression von Wildtyp-TNF, TNF-Einzelmutanten, P2X7 und hART1 hin erfolgreich überprüft. In Abb. 4.11 zeigt die Silberfärbung der Gesamtzelllysate qualitativ eine geringere Proteinbeladung der Spur von Wildtyp-TNF. Dieses Ergebnis ist bei der Analyse der Autoradiographien zu beachten. Die Autoradiographie der Ganzzelllysate von hART1/Wildtyp-TNF und hART1/TNF_R82K, _R107K, _R120K, _R179K und _R207K nach radioaktiver ADP-Ribosylierung mit $^{32}\text{P-NAD}^+$ konnte jeweils schwache radioaktiv-markierte Banden bei 26 kDa (mTNF) nachweisen. Die Signalstärke der radioaktiv markierten Banden korrelierte qualitativ mit der Spurenbeladung der Silberfärbung.

Wie in der vorherigen Untersuchung konnte durch Immunodetektion der Immunpräzipitate die Expression von hART1/ Wildtyp-TNF und hART1/ TNF-Einzelmutanten bestätigt werden. Es wurden jeweils Banden bei 17 kDa (sTNF), 26 kDa (mTNF) und 51 kDa (tTNF) bei Wildtyp-TNF und TNF_R82K, _R107K, _R120K, _R179K und _R207K nachgewiesen. Die entsprechenden Banden von TNF_R214K und P2X7 konnten wiederholt, trotz erfolgtem Expressionsnachweis im FACS, nicht detektiert werden.

Die Autoradiographie der Immunpräzipitate von hART1/ Wildtyp-TNF und hART1/ TNF-Einzelmutanten nach radioaktiver ADP-Ribosylierung mit $^{32}\text{P-NAD}^+$ konnte die ADP-Ribosylierung von Wildtyp-TNF und TNF_R82K, _R107K, _R120K, _R179K und _R207K entsprechend der Immunodetektion bestätigen. Es wurden jeweils radioaktiv markierte Banden bei 17 kDa (sTNF) und 26 kDa (mTNF) nachgewiesen. TNF_R107K zeigte hierbei sowohl in der Immunodetektion, als auch in der Autoradiographie die Banden mit den stärksten Signalen und wies sogar eine 51 kDa (tTNF) Bande in der Autoradiographie auf. Die Analyse bestätigte die Ergebnisse der vorhergehenden Untersuchung, dass die ADP-Ribosylierung von Wildtyp-TNF und TNF_R82K, _R107K, _R120K, _R179K und _R207K in löslicher und membrangebundener Form stattfindet und dass mTNF mehr ADP-Ribosylierungsstellen besitzt als sTNF. Trotz regelrechtem Expressionsnachweis von TNF_R214K im FACS zeigt sich wiederholt die ausbleibende Detektion der Variante in Western Blot Analysen nach Immunpräzipitation. Möglicherweise erkennt der verwendete Antikörper

sein Epitop nicht aufgrund von Strukturveränderungen im Rahmen der erfolgten Mutation. P2X7, als Positivkontrolle der ADP-Ribosylierung, konnte in dieser Analyse bei fehlender Detektion bzw. Expression ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

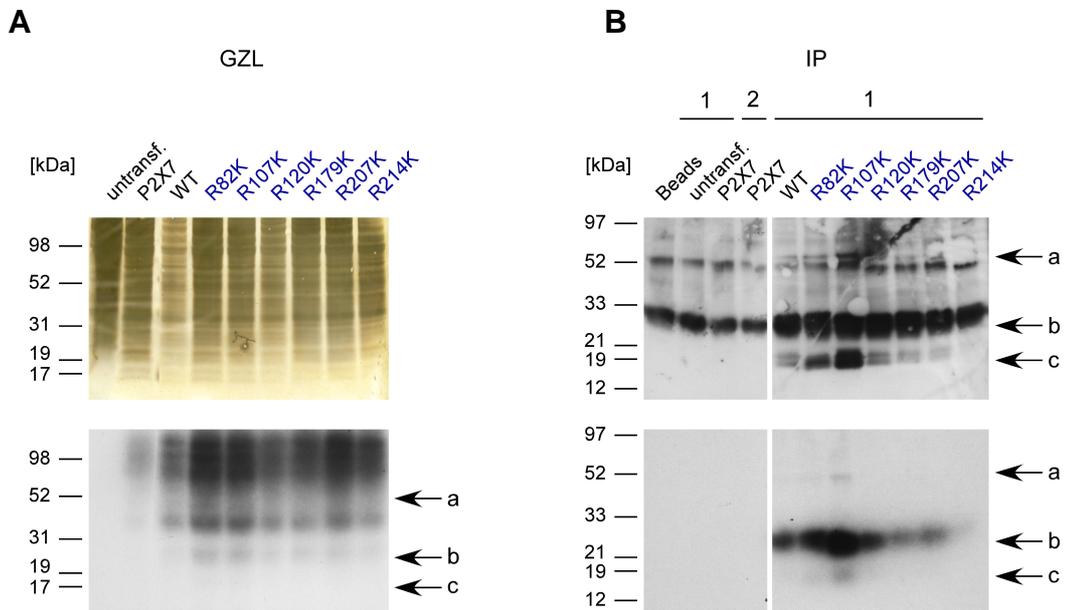


Abb.4.11: Analyse der ADP-Ribosylierung von Wildtyp-TNF und TNF-Varianten mit Einzelsubstitution der nicht konservierten Arginine. HEK293-Zellen wurden jeweils mit hART1, sowie mit P2X7 oder Wildtyp-TNF bzw. TNF-Einzelmutanten transient ko-transfiziert. Nach einem Tag wurden die Zellen geerntet und je ein Aliquot mittels FACS auf die Expression von hART1, TNF und P2X7 kontrolliert. Der Rest der Zellen wurde für 30 Minuten bei 37°C mit je 5 µCi $^{32}\text{P-NAD}^+$ inkubiert. Nicht inkorporiertes $^{32}\text{P-NAD}^+$ wurde durch wiederholtes Waschen entfernt. Die Zellen wurden lysiert, und ein Aliquot der Gesamtzelllysate wurde per SDS-PAGE größenfraktioniert. Der Rest der Lysate wurde mit einem TNF-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und ebenfalls per SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF- und NC-Membran per Western Blot wurden die Membranen zum einen einer Silberfärbung unterzogen, zum anderen wurde mittels Immunodetektion mit einem TNF-spezifischen Antikörper die Expression überprüft. Anschließend konnte inkorporierte Aktivität mittels Autoradiographie detektiert werden. A: Ganzzelllysate; oberes Bild: Silberfärbung, unteres Bild: Autoradiographie. B: Immunpräzipitate; 1: Immunpräzipitation mit Anti-human-TNF-Antikörper_{Human}. 2: Immunpräzipitation mit Anti-P2X7-Antikörper; oberes Bild: Immunodetektion, unteres Bild: Autoradiographie. A: Spur 1: Untransfizierte HEK293-Zellen; Spur 2: P2X7+hART1; Spuren 3-9: TNF_WT/82/R107K/120/179/207/214+hART1; B: Spur 1: Protein G Magnetbeads; Spur 2: Untransfizierte HEK293-Zellen; Spuren 3-4: P2X7+hART1; Spuren 5-11: TNF_WT,_82,_R107K,_120,_179,_207,_214+hART1; Spur 9: Untransfizierte HEK293-Zellen; a: tTNF, 51 kDa. b: mTNF, 26 kDa. c: sTNF, 17 kDa.

4.3.2 Analyse von ADP-Ribosylierungsstellen im membranständigen „Stiel“ des TNF

Im Abschnitt 4.3.1 konnte die ADP-Ribosylierung von Wildtyp-TNF und TNF_R82K, _R107K, _R120K, _R179K, _R207K bis auf TNF_R214K sowohl in den sezernierten 17 kDa (sTNF) als auch in den membranständigen 26 kDa (mTNF) nachgewiesen werden.

In diesem Abschnitt wird von der bisherigen These, dass es sich bei der ADP-Ribosylierungsstelle um ein einzelnes humanspezifisches Arginin handelt abgewichen. Die zwei Arginine der Stielregion (R60, R65) werden in die folgenden Mutationsanalysen einbezogen, da sowohl die 17 kDa (sTNF) als auch die 26 kDa (mTNF) ADP-ribosyliert werden und die vorhergehenden Studien vermuten lassen, dass transmembranäres TNF mehr ADP-Ribosylierungsstellen besitzt als lösliches TNF. Der folgende Abschnitt schildert die Klonierung der Arginin-Mutanten in einen HA-getagten Expressionsvektor und die zielgerichtete Mutagenese der zwei Arginine der Stielregion. Ähnlich wie in Abschnitt 4.3.1.2 wurden die TNF-Einzelmutanten im FACS auf ihre Zelloberflächenexpression und ihre Antikörperbindungsfähigkeit überprüft. Folgend wurden HEK293-Zellen mit TNF-Wildtyp oder TNF-Einzelmutanten und hART1 ko-transfiziert und mittels radioaktivem Ribosylierungsassay und etheno-ADP-Ribosylierungsassay auf die ADP-Ribosylierung hin untersucht.

Durch die Verwendung eines HA-getagten Expressionsvektors konnten alternative Antikörper zur Detektion und Immunpräzipitation verwendet werden, um die Analyse von TNF_R214K, sowie der Stielregion zu ermöglichen.

4.3.2.1 Klonierung von TNF in den peGFP.HA Vektor und *in vitro*-Mutagenese von Argininen des Stielbereichs

Aus den in Abschnitt 4.3.1.1. hergestellten pCMV.Sport6-Konstrukten mit dem Wildtyp und den Einzelmutanten (R82K/R107K/R120K/R179K/R207K/R214K) wurden die TNF-Inserts amplifiziert und in den peGFP.HA-Zielvektor kloniert. Des Weiteren erfolgte die zielgerichtete Mutagenese der Arginine der Stielregion (R60K/R65K) mit dafür entworfenen Mutageneseprimern. Der Erfolg der Mutationen wurde mittels Sequenzierung kontrolliert.

Die Abb. 4.12 und Abb. 4.13 zeigen die Klonierung von humanem TNF-Wildtyp und –Einzelbasemutanteninserts in den pEGFP.HA-Vektor und die Linearisierung

der Vektoren nach zielgerichteter Mutagenese nicht konservierter und konservierter Arginine im peGFP.HA.TNF-Konstrukt.

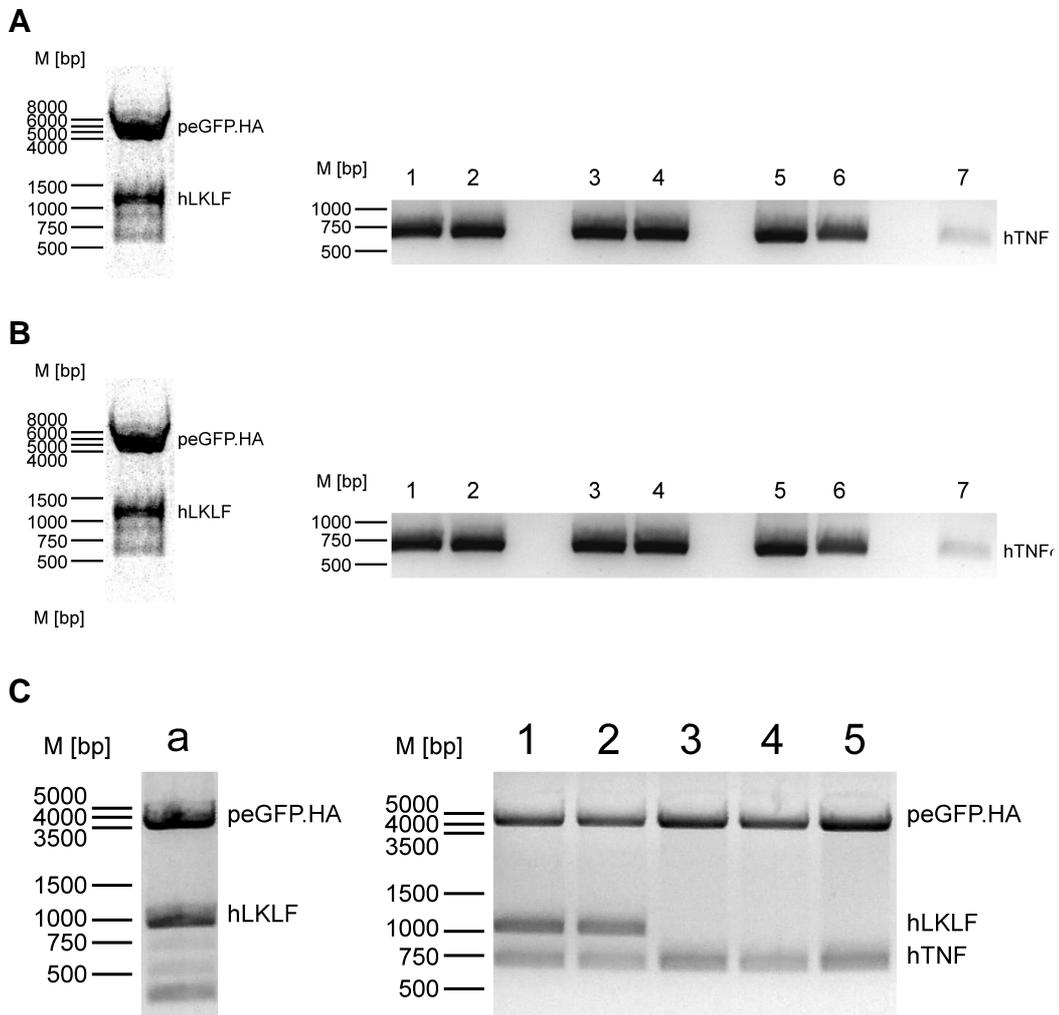


Abb.4.12: Klonierung von humanen TNF-Varianten in den pEGFP.HA-Vektor. Zur Klonierung von humanem TNF-Wildtyp und -Einzelmutanten wurde jeweils die gewünschte kodierende Sequenz aus dem pCMV.Sport6-Vektor mittels zweier Primer mit eingebauten Restriktionsschnittstellesequenzen, *Xma* I am 5' und *Not* I am 3' Ende, mittels einer PCR amplifiziert. Anschließend wurde der Zielvektor peGFP.HA.hLKLF und das Amplifikat sequentiell mit *Not* I (A) und *Xma* I (B) verdaut, und das gewünschte Insert bzw. der Zielvektor jeweils elektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt. Der Vektor und die Inserts wurden abermals elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem Programm KODAK Digital Science 1D wurden die Mengenverhältnisse für die Ligation berechnet. Nach der Ligation wurden die Vektoren in *E.coli* transformiert und ausplattiert. Nach der DNA Plasmidpräparation erfolgte der *Xma* I/ *Not* I Doppelverdau (C). Dieser zeigte, dass vierzehn der sechzehn verdauten Plasmidpräparationen das richtige Insert (3-5) trugen und zwei (1-2) das Insert des parental Vektors (a). Die Basenfolge der mutierten TNF-Inserts inklusive der Schnittstellen wurde zur Kontrolle sequenziert. A-B: V: Zielvektor; 1-7: TNF-Wildtyp und TNF-Einzelmutanten-Inserts (R82K, R107K, R120K, R179K, R207K, R214K).

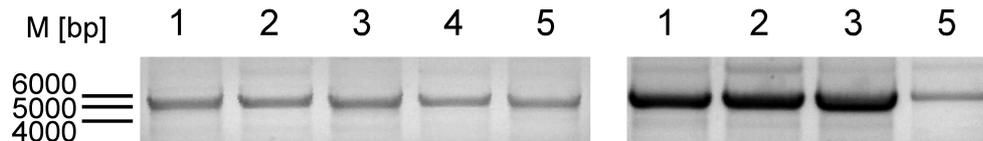


Abb.4.13: Zielgerichtete Mutagenese nicht konservierter und konservierter Arginine im peGFP.HA.TNF-Konstrukt. Das Plasmid peGFP.HA.TNF wurde jeweils mit den entworfenen Vorwärts- und Rückwärtsprimern, welche ein für Arginin (R) kodierendes Triplet zu einem für Lysin (K) kodierendes Triplet umwandeln in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Anschließend erfolgte der Verdau mit *Dpn* I und die elektrophoretische Auftrennung der neuen Konstrukte zur Erfolgskontrolle. Die Vektoren wurden in *E.coli* transformiert, ausplattiert, und Vorkulturen zur Plasmidpräparation angesetzt. Die Basenfolge der mutierten TNF-Inserts wurde zur Kontrolle sequenziert. 1: R60K. 2: R65K. 3: R82K. 4: R120K. 5: R214K.

4.3.2.2 Expression und Detektion der TNF-Einzelmutanten auf HEK293-Zellen

Nach erfolgter Herstellung der peGFP.HA-TNF-Konstrukte und Kontrolle der Sequenzen wurde ähnlich wie im Abschnitt 4.3.1.2 die Zelloberflächenexpression der TNF-Einzelmutanten auf HEK293-Zellen verglichen und die Auswirkung der Mutation auf das Bindungsverhalten der verwendeten Antikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz überprüft.

Nachweis der Expression mittels FACS

Zum Nachweis der Expression von Wildtyp-TNF und TNF-Einzelmutanten wurden HEK293-Zellen transient mit den peGFP.HA-TNF-Konstrukten transfiziert und mit spezifischen Antikörpern gegen TNF und Fluorochromgekoppelten Zweitantikörpern inkubiert. Zur Detektion von TNF wurden unterschiedliche Antikörper (Nr.169; Nr.192; Nr.206; Tab. 3.1) verwendet. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK293-Zellen mitgeführt. In der FACS-Analyse (Abb. 4.14) wurde erfolgreich die Expression von Wildtyp-TNF und TNF-Einzelmutanten auf HEK293-Zellen mit den drei spezifischen Anti-human-TNF-Antikörpern nachgewiesen, wobei sich keine bedeutsame Differenz der MFI der TNF-Einzelmutanten im Vergleich zum Wildtyp herausstellte. Es zeigte sich isoliert eine geringere Bindungsaffinität des Antikörpers Nr. 169 zu TNF_R107K, die möglicherweise auf eine veränderte Konformation der Antikörperbindungsstelle zurückzuführen ist.

Des Weiteren wiesen die mit Antikörper Nr.206 (Infliximab) inkubierten Proben, wie bereits in Abschnitt 4.3.1.2 aufgefallen, durchgängig eine geringere MFI auf

als die anderen beiden Antikörper. Infliximab Nr. 206 wurde in den weiteren Studien zur indirekten Immunfluoreszenz nicht mehr verwendet.

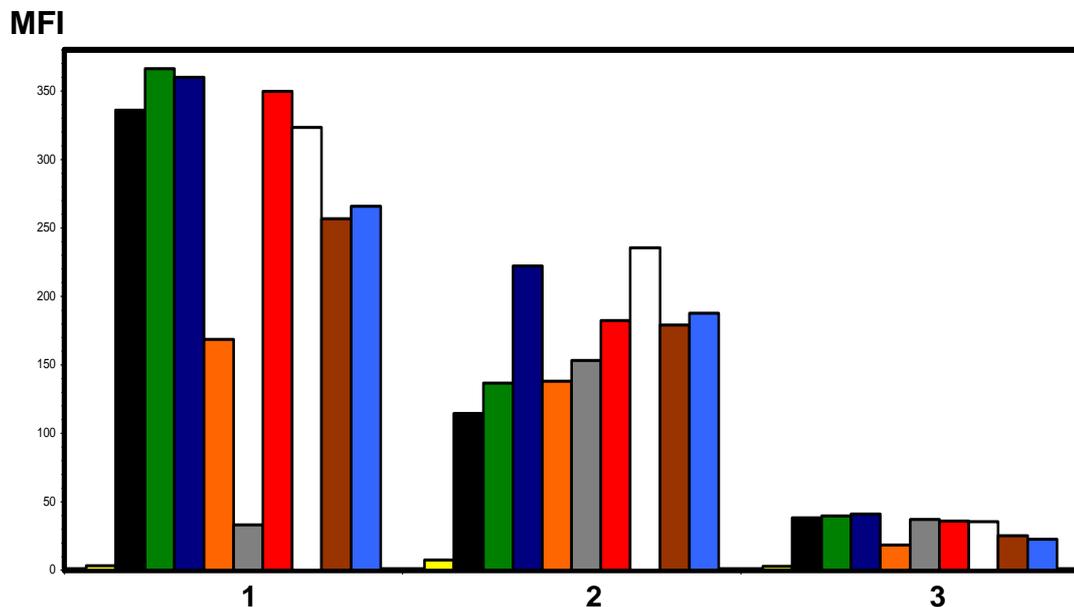


Abb.4.14: FACS-Analyse des Expressionsniveaus von Wildtyp-TNF und TNF-Einzelmutanten auf HEK 293-Zellen nach transienter Transfektion. HEK 293-Zellen wurden entweder untransfiziert oder nach transienter Transfektion mit TNF und TNF-Einzelmutanten mit spezifischen gegen TNF gerichteten Antikörpern inkubiert. Die Expression bzw. die Affinität der Antikörper wurde mittels FACS verglichen. Balkendiagramm: Gelb: Untransfizierte Zellen; Schwarz: Wildtyp-TNF; Grün: TNF_R60K; Blau: TNF_R65K; Orange: TNF_R82K; Grau: TNF_R107K; Rot: TNF_R120K; Weiss: TNF_R179K; Braun: TNF_R207K; Hellblau: TNF_R214K; 1: Anti-human-TNF-Antikörper_{Maus} (Nr. 169). 2: Anti-human-TNF-Antikörper_{Ziege} (Nr. 192). 3: Anti-human-TNF-Antikörper_{Human} (Nr. 206).

4.3.2.3 ADP-Ribosylierung von TNF durch die hART1

Im folgenden Abschnitt wird die Lokalisation der potentiellen ADP-Ribosylierungsstellen in der Stielregion von TNF (stTNF) bzw. von transmembranärem TNF (mTNF) und löslichem TNF (sTNF) vergleichend untersucht. TNF-Wildtyp und -Einzelmutanten im peGFP.HA-Vektor wurden jeweils mit hART1 auf HEK293-Zellen transient ko-transfiziert, mittels FACS auf Ihre Expression hin überprüft, und zum Nachweis der ADP-Ribosylierung wurde sowohl die radioaktive ADP-Ribosylierung mit radioaktiv markiertem NAD^+ als auch der etheno-ADP-Ribosylierungsassay angewandt.

Nachweis der ADP-Ribosylierung von TNF auf HEK293-Zellen mittels radioaktiv markiertem NAD^+

Im folgenden Abschnitt werden zwei Autoradiographie-Analysen gezeigt.

Bei beiden Untersuchungen wurden HEK293-Zellen mit hART1 und Wildtyp-TNF bzw. TNF-Einzelmutanten transient ko-transfiziert und die regelrechte Expression im FACS überprüft. Nach Inkubation mit $^{32}\text{P-NAD}^+$ erfolgte die Immunpräzipitation mit einem HA-Tag-spezifischen Antikörper. Die Immunpräzipitate wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Immunodetektion der PVDF-Membranen erfolgte mit einem HA-Tag-spezifischen Antikörper und von denselben Membranen wurde eine Autoradiographie angefertigt.

Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen von Proteinen und ADP-Ribose wurden wie in den vorherigen Untersuchungen Protein G Magnetbeads ohne gekoppelten Antikörper mit den Lysaten inkubiert und mitgeführt. Die Protein G Magnetbeads wiesen im Western Blot ein bekanntes eigenes Hintergrundbandenmuster auf. In beiden Untersuchungen (Abb. 4.15, Abb. 4.16) konnte per Immunodetektion und -Präzipitation mit einem HA-Tag-spezifischen Antikörper die Expression von Wildtyp-TNF und den TNF-Einzelmutanten (_R60K, _R65K, _R82K, _R107K, _R120K, _R179K, _R207K und _R214K) nachgewiesen werden. Es zeigte sich jeweils ein Bandenmuster bei 11 kDa (stTNF) und 26 kDa (mTNF). Die ADP-Ribosylierung von Wildtyp-TNF und TNF_R60K, _R65K, _R82K, _R107K, _R120K, _R179K, _R207K und _R214K konnte in der dazugehörigen Autoradiographie erfolgreich bestätigt werden.

In der ersten Untersuchung zeigte sich ein Muster radioaktiv markierter Banden bei 26 kDa (mTNF) und ein sehr schwaches Signal bei 11 kDa (stTNF). Im Vergleich zu Wildtyp-TNF wiesen die mTNF-Banden der Mutanten R65K, R82K, R107K, R179K und R207K ein schwächeres ADP-Ribosylierungs-Signal auf. Eine Korrelation zwischen der Menge des detektierten Immunpräzipitats und der Stärke der ADP-Ribosylierung ließ sich hierbei nicht nachvollziehen. Ein Vergleich der ADP-Ribosylierungsstärke von stTNF war bei sehr schwachem Signal nicht möglich. Das Ektoenzym ENPP2 (Ekto-Nukleotidpyrophosphatase/Phosphodiesterase) konnte hier als Positivkontrolle der ADP-Ribosylierung und der Aktivität der hART1 bestätigt werden.

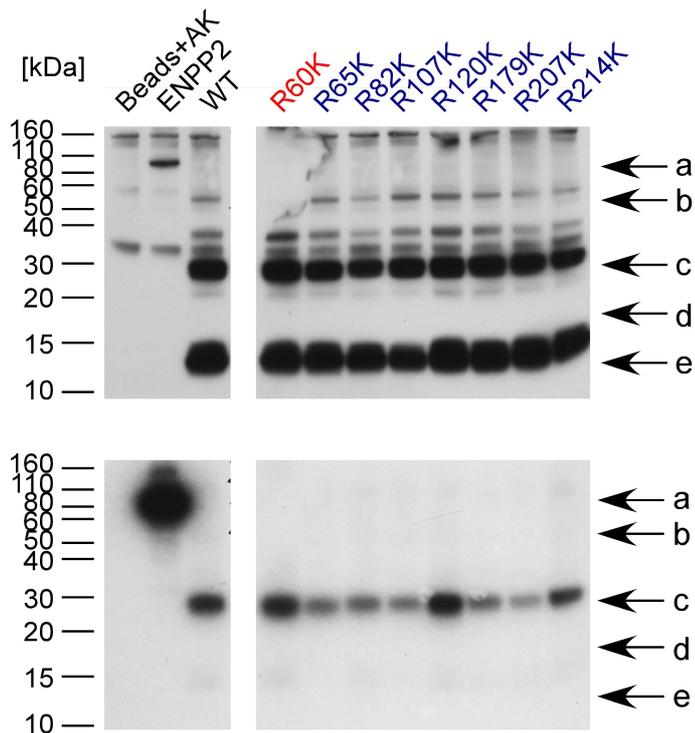


Abb.4.15: Analyse der ADP-Ribosylierung von Wildtyp-TNF und TNF-Varianten mit Einzelsubstitution der Arginine. HEK293-Zellen wurden jeweils mit hART1, sowie ENPP oder Wildtyp-TNF bzw. TNF-Einzelmutanten transient ko-transfiziert. Nach einem Tag wurden die Zellen geerntet und je ein Aliquot mittels FACS auf die Expression von hART1, TNF und ENPP kontrolliert. Der Rest der Zellen wurde für 30 Minuten bei 37°C mit je 5 µCi ^{32}P -NAD⁺ inkubiert. Nicht inkorporiertes ^{32}P -NAD⁺ wurde durch wiederholtes Waschen entfernt. Die Zellen wurden lysiert, und die Lysate mit einem HA-Tag-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden per SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden ebenfalls Antikörper-gekoppelte Protein G Magnetbeads aufgetragen. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran per Western Blot wurde die Membran mittels Immunodetektion (Oberes Bild) mit einem HA-Tag spezifischen Antikörper auf die Expression überprüft. Anschließend konnte inkorporierte Aktivität mittels Autoradiographie (Unteres Bild) detektiert werden. a:ENPP2, 99 kDa. b: tTNF, 51 kDa. c: mTNF, 26 kDa. d: sTNF, 17 kDa. e: stTNF, 11 kDa.

Die zweite Untersuchung (Abb. 4.16) zeigte ebenfalls ein Muster radioaktiv-markierter Banden bei 26 kDa (mTNF) und ein schwächeres Signal bei 11 kDa (stTNF). Im Vergleich zum Wildtyp wiesen die mTNF-Banden von R65K, R120K und R179K in Korrelation ein gleichstarkes Signal auf. Die R60K Mutante wies ein schwächeres Bandensignal auf, welches jedoch mit der Signalstärke seiner Immunodetektion korrelierte. Beim Vergleich der ADP-Ribosylierungsstärke von stTNF zeigten R60K, R65K und R207K kein nachvollziehbares Signal, wobei hier ebenfalls die schwache Immunodetektion der R60K Mutante zu beachten ist. ENPP2 konnte als Positivkontrolle der ADP-Ribosylierung bestätigt werden.

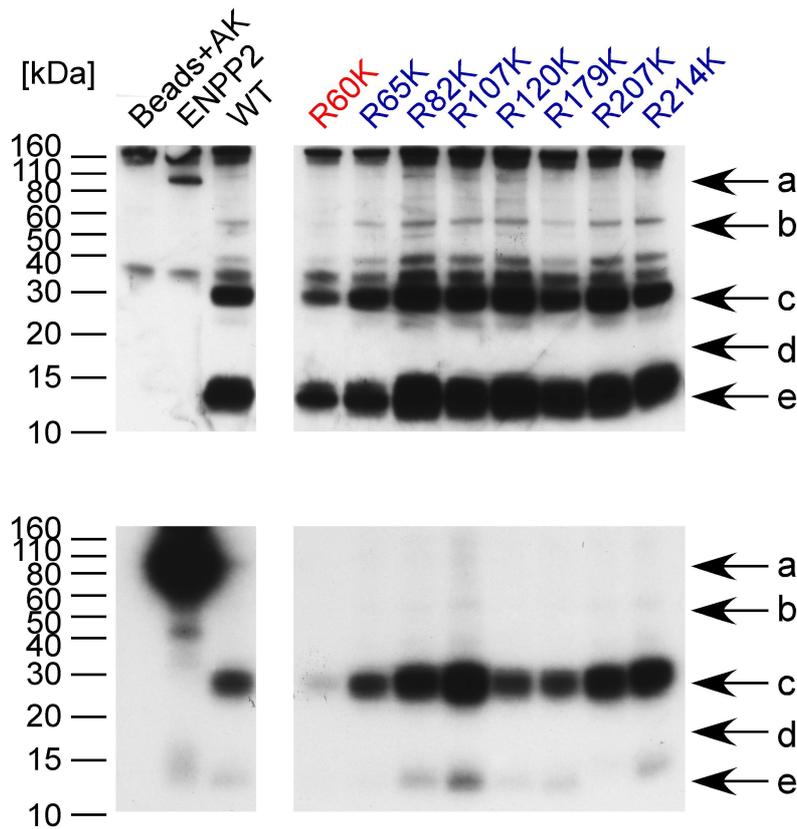


Abb.4.16: Analyse der ADP-Ribosylierung von Wildtyp-TNF und TNF-Varianten mit Einzelsubstitution der Arginine. HEK 293-Zellen wurden jeweils mit hART1, sowie mit ENPP oder Wildtyp-TNF bzw. TNF-Einzelmutanten transient ko-transfiziert. Nach einem Tag wurden die Zellen geerntet und je ein Aliquot mittels FACS auf die Expression von hART1, TNF und ENPP kontrolliert. Der Rest der Zellen wurde für 30 Minuten bei 37°C mit je 5 µCi ^{32}P -NAD⁺ inkubiert. Nicht inkorporiertes ^{32}P -NAD⁺ wurde durch wiederholtes Waschen entfernt. Die Zellen wurden lysiert, und die Lysate mit einem HA-Tag-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden per SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden ebenfalls Antikörper-gekoppelte Protein G Magnetbeads aufgetragen. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran per Western Blot wurde die Membran mittels Immunodetektion (Oberes Bild) mit einem HA-Tag-spezifischen Antikörper auf die Expression überprüft. Anschließend konnte inkorporierte Aktivität mittels Autoradiographie (Unteres Bild) detektiert werden. a: ENPP2, 99 kDa. b: tTNF, 51 kDa. c: mTNF, 26 kDa. d: sTNF, 17 kDa. e: stTNF, 11 kDa.

Aufgrund der unterschiedlichen Bindungsmuster des in diesen Untersuchungen verwendeten HA-Tag-spezifischen Antikörpers und des in Abschnitt 4.3.1.3 verwendeten TNF-spezifischen Antikörpers lassen sich Thesen zur Lokalisation der ADP-Ribosylierungsstellen aufstellen. Anhand der Autoradiographie-Analysen in Abschnitt 4.3.1.3 und der oben aufgeführten Untersuchungen ist festzustellen, dass TNF mindestens eine ADP-Ribosylierungsstelle in der Stielregion als auch in sezernierter Form besitzt. Des Weiteren lässt sich eine Summation der ADP-Ribosylierung von tmTNF anhand eines stärkeren

Autoradiographiesignals als von sTNF und stTNF nachvollziehen, was die These von der Existenz mehrerer ADP-Ribosylierungsstellen bestätigt.

Nachweis der ADP-Ribosylierung von TNF auf HEK293-Zellen mit dem IG4-Antikörper

Zum alternativen Nachweis und Bestätigung der ADP-Ribosylierung aller TNF-Einzelmutanten wurde nachfolgender etheno-ADP-Ribosylierungsassay durchgeführt (Abb. 4.17). Hierfür wurden HEK293-Zellen mit hART1 und Wildtyp-TNF bzw. den TNF-Einzelmutanten transient ko-transfiziert. Nach Inkubation mit etheno-NAD erfolgte die Immunpräzipitation je eines Aliquots der Lysate mit einem Etheno-Adenosin-spezifischen Antikörper. Die Immunpräzipitate und Ganzzellysate wurden mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Immunodetektion der PVDF-Membranen erfolgte mit einem HA-Tag-spezifischen Antikörper.

Die Immunodetektion der Ganzzellysate bestätigte die Expression von Wildtyp-TNF und TNF-Einzelmutanten. Es zeigte sich jeweils das erwartete Bandenmuster bei 11 kDa (stTNF) und 26 kDa (mTNF). Die Silberfärbung der Ganzzellysate zeigte eine qualitativ gleichmäßige Proteinbeladung. Als Negativkontrolle der Immunodetektion wurden untransfizierte Zellen mitgeführt. Nach Inkubation der Zellen mit etheno-NAD wurden die Lysate mit einem Etheno-Adenosin-spezifischen Antikörper präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit einem HA-Tag-spezifischen Antikörper detektiert. Mit dieser Methode konnte die ADP-Ribosylierung von Wildtyp-TNF und der Mutanten R60K, R65K, R82K, R107K, R120K, R179K, R207K und R214K dargestellt werden. Hier zeigten sich ADP-ribosylierte Banden nur bei 26 kDa (mTNF). Im Vergleich zum Wildtyp wiesen die Banden von R82K, R107K, R120K und R207K ein diskret abgeschwächtes Signal auf. Das Signal von R179K ließ sich in diesem Versuch nicht verwerten. ENPP2 konnte als Positivkontrolle der ADP-Ribosylierung bestätigt werden.

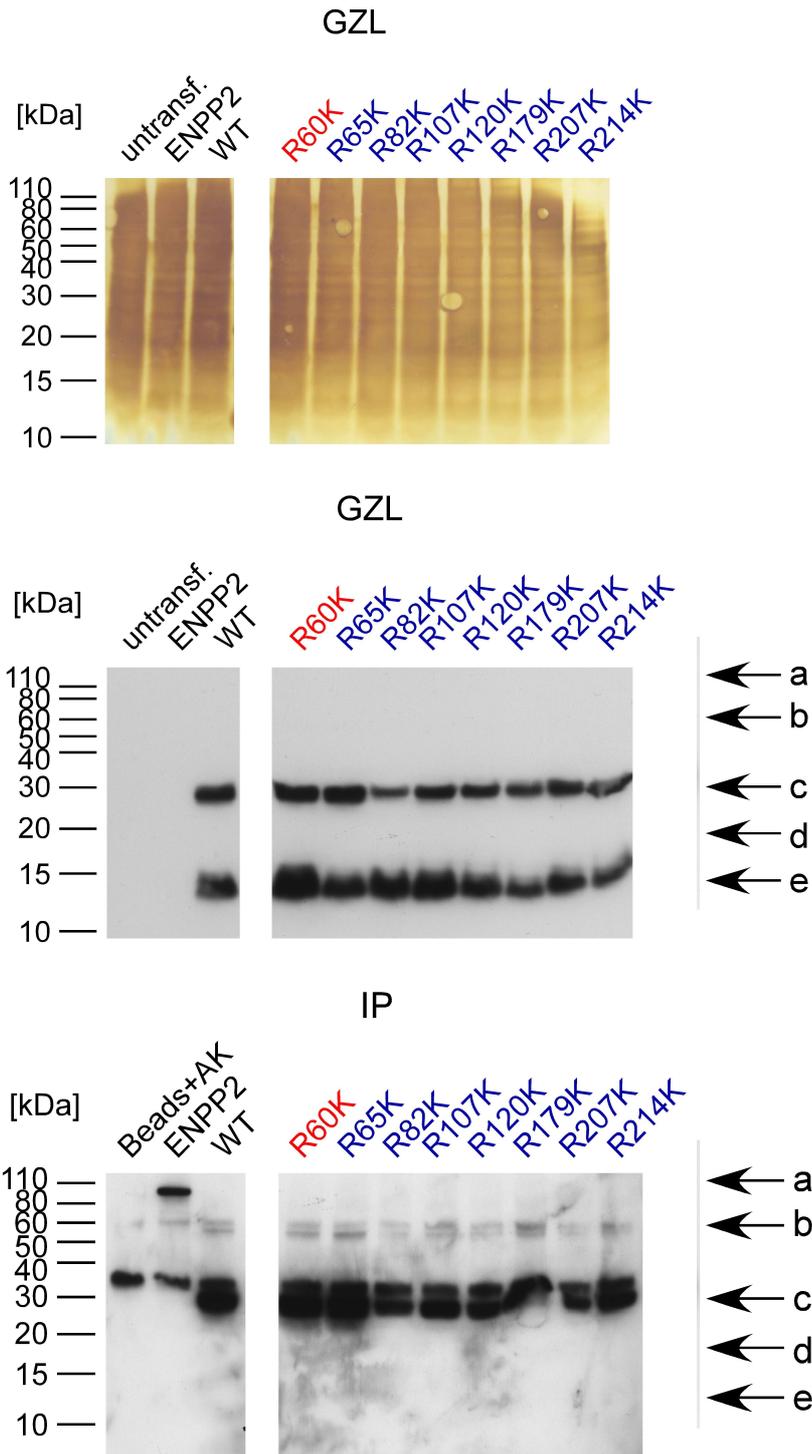


Abb.4.17: Analyse der etheno-ADP-Ribosylierung von Wildtyp-TNF und TNF-Varianten mit Einzelsubstitution der Arginine. HEK293-Zellen wurden jeweils mit hART1, sowie mit ENPP2 oder Wildtyp-TNF bzw. TNF-Einzelmутanten transient ko-transfiziert. Nach einem Tag wurden die Zellen geerntet und für 30 Minuten bei 4°C mit je 50 µM etheno-NAD inkubiert. Nicht inkorporiertes etheno-NAD wurde durch wiederholtes Waschen entfernt. Die Zellen wurden lysiert und je ein Aliquot der Lysate mit einem Etheno-Adenosin-spezifischen Antikörper (1G4) immunpräzipitiert. Die Lysate und Immunpräzipitate wurden per SDS-PAGE größenfraktioniert. Zur Kontrolle wurden ebenfalls Lysate von untransfizierten Zellen oder Antikörper-gekoppelte Protein G Magnetbeads (Spur 1) aufgetragen. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran per Western Blot wurden die Membranen mittels Immunodetektion mit einem HA-Tag

spezifischen Antikörper auf die Expression (Bild 2) bzw. mit einem Etheno-Adenosin-spezifischem Antikörper auf ADP-Ribosylierung (Bild 3) überprüft. Die NC-Membran der Ganzzelllysate wurde einer Silberfärbung (Bild 1) unterzogen, um die Beladung der Spuren abschätzen zu können. Bild 1: Silberfärbung; Bild 2: Ganzzelllysate; Bild 3: Immunpräzipitate; a: ENPP2, 99 kDa. b: tTNF, 51 kDa c: mTNF, 26 kDa. d: sTNF, 17 kDa. e: stTNF, 11 kDa.

ADP-ribosyliertes stTNF konnte mit dieser Methode nicht detektiert werden. Möglicherweise ist die Bindungsfähigkeit des HA-Tag-spezifischen Antikörpers in der Stielregion durch den bereits gebundenen Etheno-Adenosin-spezifischen Antikörper an etheno-ADP-Ribose in der Stielregion gestört. Dies gibt einen zusätzlichen Hinweis auf eine ADP-Ribosylierungsstelle in der Stielregion. Hierbei stellt sich jedoch die Frage, warum der HA-Tag-spezifische Antikörper mTNF binden kann, welches vermutlich ebenfalls gebundenen Etheno-Adenosin-spezifischen Antikörper an etheno-ADP-Ribose in der Stielregion trägt.

5. Diskussion

Aufgrund seiner zentralen Rolle bei einer Vielzahl immunregulatorischer Mechanismen und der Anwendung von Anti-TNF-Therapeutika im klinischen Alltag steht TNF schon seit Jahren im Fokus der Wissenschaft. Die post-translationalen Modifikationen dieses Zytokins sind noch weitgehend ungeklärt. Vorangegangene Studien zeigten, dass TNF ein Zielprotein der humanen ADP-Ribosyltransferase 1 (hART1) darstellt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Domäne von TNF sowohl in löslicher als auch membranständiger Form bzw. in der Stielregion durch die Arginin-spezifische hART1 ADP-ribosyliert werden kann, und die extrazelluläre Domäne mehrere ADP-Ribosylierungsstellen trägt. Der Aufbau der Diskussion folgt dem Aufbau des Ergebnisteils. Im ersten Teil wird die Untersuchung der ADP-Ribosylierung von TNF *ex vivo* und mögliche funktionelle Konsequenzen besprochen. Im zweiten Teil werden Erfolge und Probleme bei der Identifikation der ADP-Ribosylierungsstellen von TNF dargestellt und Lösungsvorschläge besprochen. Zum Schluss werden Perspektiven für weiterführende Arbeiten gegeben, die zusätzliche Einblicke in die Interaktion zwischen hART1 und TNF erlauben könnten.

5.1 TNF als Zielprotein der hART1 auf HEK293-Zellen

Als Basis dieser Arbeit konnte die Zelloberflächenexpression der hART1 und von humanem TNF mittels indirekter Immunfluoreszenz und Western Blot bestätigt werden. Die Western Blot Analysen zeigten, dass sich mittels Immunpräzipitation prozessiertes TNF (sTNF, 17 kDa), transmembranäres TNF (mTNF, 26 kDa) als auch TNF-Trimer (tTNF, 51 kDa) nachweisen lassen. Hingegen zeigte die Immunodetektion der Ganzzellsate nur sTNF und mTNF.

Zur Untersuchung der ADP-Ribosylierung von TNF erfolgte die transiente Ko-Transfektion von hART1 und TNF in HEK293-Zellen. Durch Verwendung von chemisch (etheno-NAD) und radioaktiv markiertem NAD⁺ konnte die ADP-Ribosylierung von TNF durch die hART1 verifiziert werden. Die eukaryotische mono-ADP-Ribosyltransferase überträgt die ADP-Ribosegruppe von NAD spezifisch auf Argininreste. Da die humane ART1 ein GPI-verankertes,

membranständiges Ektoenzyme [Okazaki & Moss 1998]. ist, liegt der Hauptfokus der enzymatischen Aktivität auf extrazellulären Oberflächenproteinen.

Das transmembranäre TNF-Molekül besteht aus 233 Aminosäuren, von denen elf Arginine sind. Zwei Arginine liegen in der Stielregion und neun Arginine in dem sezernierten Teil. Ohne die dreidimensionale Struktur zu berücksichtigen, stehen somit elf potentielle ADP-Ribosylierungsstellen der hART1 zur Verfügung, von denen in dieser Arbeit zunächst wie in der Einleitung Abschnitt 1.4 beschrieben aufgrund des Sequenzvergleichs von humanem und murinem TNF zunächst die nicht-konservierten Arginine der sezernierten Form, und im zweiten Teil aufgrund der gewonnen Erkenntnisse zusätzlich die beiden Arginine der Stielregion untersucht wurden. Die Lokalisation der ADP-Ribosylierungsstellen konnte im Rahmen dieser Arbeit eingegrenzt werden.

5.2 Lokalisation der ADP-Ribosylierungsstellen im TNF

Der Hauptteil dieser Arbeit widmet sich der Charakterisierung der ADP-Ribosylierungsstelle in TNF. Der Sequenzvergleich in Abb. 1.5 (Abschnitt 1.4) zeigt, dass in der Ektodomäne von TNF elf Arginine vorhanden sind. Davon sind vier Arginine zwischen Maus und Mensch konserviert und sieben Arginine nicht konserviert. Unter der Annahme, dass es sich um eine isolierte ADP-Ribosylierungsstelle und um ein nicht-konserviertes Arginin der löslichen Form von TNF handelt, erfolgte zunächst die zielgerichtete Mutagenese der sechs humanspezifischen Arginine (R82, R107, R120, R179, R207, R214) von löslichem TNF zu Lysin. Da Lysin keine Ziel-Aminosäure von ARTs darstellt, sollten die Akzeptorstellen der ADP-Ribosylierung auf diese Weise ausgeschaltet werden. Der Effekt der Mutation auf die TNF-Struktur sollte durch den Austausch zu Lysin, als eine sehr konservative Mutation gering gehalten werden (die beiden Aminosäuren besitzen die gleiche Ladung und unterscheiden sich in nur wenigen Atomen voneinander). Diese nicht-konservierten Arginine befinden sich in der trimeren löslichen TNF-Form auf der Moleküloberfläche und kommen somit als potentielle ADP-Ribosylierungsstellen in Frage.

Der erste Teil der Mutationsanalysen (Abschnitt 4.3.1.3) mit dem pCMV. Sport6. TNF-Konstrukt zeigte, dass TNF sowohl transmembranär als auch löslich ADP-ribosyliert wird und sTNF mindestens eine ADP-Ribosylierungsstelle besitzen muss. Die ADP-Ribosylierung konnte nie vollständig durch eine Einzelmutation

unterdrückt werden. Eine quantitative Aussage über eine verminderte ADP-Ribosylierung war aufgrund leichter Unterschiede in der Zelloberflächenexpression und Proteinbeladung nicht definitiv zu treffen. Die Mutante TNF_R214K ist in den ersten beiden Mutationsanalysen aufgrund fehlender Immunodetektion zu vernachlässigen. Ein Hinweis auf mehrere ADP-Ribosylierungsstellen ergab sich u.a. aus der Signalstärke der radioaktiv-markierten Banden. mTNF zeigte reproduzierbar ein stärkeres Signal in der Autoradiographie als sTNF, so dass man hier auf einen Summationseffekt der radioaktiv-markierten gebundenen ADP-Ribose schließen kann. Alternativ ist eine abgeschwächte Affinität der hART1 zu sTNF denkbar, die zu einer geringeren ADP-Ribosylierung führt. Somit gaben die ersten Mutationsanalysen Hinweise auf die Lage und Menge der ADP-Ribosylierungsstellen. Aufgrund der oben diskutierten Ergebnisse rückten die beiden Arginine der Stielregion in den zusätzlichen Fokus der Arbeit.

Die Mutationsanalysen des zweiten Teils (Abschnitt 4.3.2.3) mit dem peGFP.HA.TNF-Konstrukt erfolgten weiterhin unter Einbezug der sechs nicht konservierten Arginine von sTNF, als auch einem konservierten und einem nicht konservierten Arginin (R60, R65) der Stielregion. Des Weiteren wurde ein neuer Vektor mit HA-Tag verwendet, um die Stielregion mittels HA-Tag-spezifischem Antikörper detektieren zu können. Im Rahmen dieser Studien wurde gezeigt, dass TNF mindestens eine ADP-Ribosylierungsstelle in der Stielregion besitzen muss. Per Autoradiographie konnte ADP-Ribosylierte TNF-Stielregion (stTNF) nachgewiesen werden. Die Stärke der ADP-Ribosylierung zeigte wiederholt einen Summationseffekt der ADP-Ribosylierung von mTNF. Die ADP-Ribosylierung konnte wie in den vorherigen Mutationsanalysen nie vollständig unterdrückt werden. Es zeigte sich eine Abschwächung der ADP-Ribosylierung von mTNF und stTNF der TNF-Einzelmutanten, die nicht reproduzierbar war und variierte und somit keinen Rückschluss auf bestimmte ADP-Ribosylierungsstellen zu ließ.

Im Rahmen der Dissertationsarbeit von S. Laing 2010 und u.a. der massenspektrometrischen Untersuchungen wurden Arginin R82 und R108, eine konservierte Aminosäure, 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. Die Mutationsanalysen der vorliegenden Dissertation legen nahe, dass es noch eine potentielle ADP-Ribosylierungsstelle in der Stielregion (R60, R65) von TNF gibt, die bisher noch nicht identifiziert wurde. Im Weiteren bleibt zu untersuchen, ob alle ADP-Ribosylierungsstellen im TNF gleichermaßen modifiziert werden und ob die NAD-Konzentration hierfür substantiell ist. Darüber hinaus bleibt noch zu untersuchen, in wie weit sich die ADP-Ribosylierung auf die Bindungsaffinität zu TNFR und auf die Struktur des Proteins auswirkt.

5.3 Zusammenfassung und Ausblick

TNF spielt eine essentielle Rolle bei einer Vielzahl biologisch-immunologischer Funktionen. Neben der Apoptoseinduktion induziert und reguliert TNF proinflammatorische Antworten des Immunsystems. Während die initiale TNF-Produktion zu einer adäquaten inflammatorischen Antwort führt, kann seine systemische Freisetzung eine akute Schocksymptomatik hervorrufen [Tracey et al. 1986; Beutler & Cerami 1988; Kumar et al. 1996]. Die inadäquate Ausschüttung des Zytokins wird mit Krankheitsbildern assoziiert, wie Morbus Crohn [Aggarwal B.B. 2003; Lin et al. 2008] und Rheumatoider Arthritis. Der Einsatz von Anti-TNF-Therapeutika hat Einzug in den klinischen Alltag als eine etablierte Behandlungsoption genommen. Die Therapeutika wirken in erster Linie über die Neutralisierung von sTNF. Die posttranslationale Modifikation und Regulationsmechanismen von TNF sind noch weitgehend ungeklärt. Die Identifikation der ADP-Ribosylierungsstellen dieses Zytokins könnte in weiteren Analysen Aufschluss über die Funktion seiner ADP-Ribosylierung geben. So führt die ADP-Ribosylierung von Integrin $\alpha 7$ bei mikromolaren NAD^+ -Konzentrationen zu einer verstärkten Bindung des $\alpha 7\beta 1$ -Heterodimers an seinen Liganden Laminin [Zolkiewska & Moss 1993]. Die verstärkte Bindung des modifizierten Lamininrezeptors an seinen Liganden stellt, ähnlich der P2X7-Aktivierung, eine Reaktion ART-exprimierender Zellen in Situationen dar, in denen NAD^+ vermehrt als Substrat zur Verfügung steht. Bei Gewebeverletzungen und Muskelerkrankungen geht die Plasmamembranintegrität der Muskelzelle verloren und NAD^+ wird über Zellyse oder stimulierte intakte Zellen vermehrt in den Extrazellularraum freigesetzt. Die ADP-Ribosylierung führt zur notwendigen verstärkten Interaktion von Zelladhäsionsmolekülen wie dem Laminindimer und

seinem Rezeptor. Die NAD^+ -Konzentration scheint nicht nur die Aktivität der hART1, sondern auch an ihre Spezifität gekoppelt zu sein. Bei NAD^+ -Konzentrationen im unteren mikromolaren (<10) Bereich ist die ADP-Ribosylierung von Integrin $\alpha 7$ auf einen bestimmten Aminosäuresequenzabschnitt beschränkt, bei höheren Konzentrationen (75-100M) kommt es zur zusätzlichen ADP-Ribosylierung in einem anderen Aminosäuresequenzabschnitt [zusammengefasst in Zolkiewska A. 2005].

In gleicher Weise ist die NAD^+ -Konzentrationsabhängige mono- und mehrfach-ADP-Ribosylierung von TNF denkbar. Ebenso ist denkbar, dass die ADP-Ribosylierung das Bindungsverhalten von TNF an TNFR1 und TNFR2 beeinflusst.

TNF ist ein transmembranäres Protein und ist in seiner homotrimeren Form biologisch aktiv. Hierbei kann TNF sowohl membrangebunden als auch in löslicher Form interagieren. TNF steht mit $\text{TNF}\beta$ in Konkurrenz um seine Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 [Hehlhans &Pfeffer 2005]. Das membrangebundene Trimer vermittelt z.B. B-Zellaktivierung und Zytotoxizität. Das membranintegrierte TNF-Trimer kann proteolytisch durch Metalloproteasen wie TACE von der Zelloberfläche freigesetzt werden [Gearing et al. 1994; Black et al. 1997]. Im unteren nanomolaren Bereich dissoziiert das Trimer in seine TNF-Monomere. Dies führt zur Verminderung seiner Rezeptorbindungsaffinität und Bioaktivität [Smith&Baglioni 1987, Corti et al. 1992].

Zusammenfassend stellt die ADP-Ribosylierung von TNF einen potentiell bedeutsamen Regulationsmechanismus der posttranslationalen Modifikation dar. Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse legen die Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur Funktion der posttranslationalen Modifikation von TNF durch hART1. Die Nutzung des Detektionsverfahrens mit HA-Tag-spezifischem Antikörper und radioaktiv markiertem $^{32}\text{P-NAD}^+$ hat sich als nützliches Analyseverfahren erwiesen.

Die potentielle ADP-Ribosylierungsstelle in der Stielregion sollte durch weitere vergleichende Mutationsanalysen mit Einzel- und Mehrfachmutanten identifiziert werden z.B. durch gleichzeitige Mutation von Arginin R60, R82 und R108 im Vergleich zu R65, R82 und R108. Nachfolgende Studien sollten klären, ob der Grad der ADP-Ribosylierung, bzw. die Affinität der hART1 zu bestimmten ADP-

Ribosylierungsstellen von der NAD-Konzentration und von der TNF-Form (löslich, transmembranär) abhängig ist.

Des Weiteren wäre nach Identifizierung aller ADP-Ribosylierungsstellen von großem Interesse, inwiefern die ADP-Ribosylierung von TNF die Bindung an seine Rezeptoren und deren intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden beeinflusst.

6. Zusammenfassung

Dem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) wird eine zentrale Rolle in der angeborenen und adaptiven Immunantwort zugeschrieben. Bisher ist wenig über die posttranslationale Modifikation dieses pleiotropen Zytokins bekannt. In vorgehenden Studien wurde gezeigt, dass humaner TNF durch humane ADP-Ribosyltransferase 1 (hART1) *in vitro* speziesspezifisch ADP-ribosyliert wird. Die ADP-Ribosylierung ist eine reversible posttranslationale Modifikation von Proteinen mit immunregulatorischem Effekt. Die ADP-Ribosegruppe wird von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) unter Freisetzung von Nikotinamid auf eine spezifische Akzeptoraminosäure des Zielproteins übertragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden TNF und hART1 auf HEK293-Zellen exprimiert und die ADP-Ribosylierung von TNF mittels SDS-PAGE/Autoradiographie untersucht. Dabei ließen sich Modifikationen sowohl der Stielregion (stTNF), als auch von löslichem TNF (sTNF) nachweisen. Einzelmutationen der 6 nicht konservierten Arginine (R) des sTNF (R82, R107, R120, R179, R207, R214) verhinderten weder die ADP-Ribosylierung von TNF in transmembranärer noch in löslicher Form.

Auch Einzelmutationen unter Einbezug eines konservierten und eines nicht konservierten Arginins der Stielregion verhinderten nicht die ADP-Ribosylierung von stTNF und sTNF. Die vorliegende Dissertation zeigt, dass TNF mehrfach ADP-ribosyliert wird und jeweils mindestens eine ADP-Ribosylierungsstelle in der Stielregion (R60, R65) von TNF und sTNF (R82, R107, R120; R179, R207, R214) liegt.

Diese Ergebnisse sind wichtige Grundlage zur Identifikation aller ADP-Ribosylierungsstellen in TNF und für weiterführende Studien bezüglich der Auswirkung der posttranslationalen Modifikation von TNF auf seine Bioaktivität und sein Bindungsverhalten zu seinen Rezeptoren.

6.1 Abstract

TNF plays a central role in the innate and adaptive immune response. However, little is known about the posttranslational modification of this pleiotropic cytokine. Preexisting studies indicated, that *in vitro* human TNF is ADP-ribosylated by human ADP-ribosyltransferase 1 (hART1). ADP-ribosylation is a reversible posttranslational protein modification with an immunoregulatory effect, whereby the ADP-ribose moiety from nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) is transferred to a specific acceptor amino acid of a target protein.

In the context of this thesis TNF and hART1 were expressed on HEK293 cells, and the ADP-ribosylation of TNF by hART1 was analysed by SDS-PAGE/Autoradiography. Modifications were found both in stalk region (stTNF) and in soluble TNF (sTNF). Single mutations of the 6 non-conserved arginines (R) of sTNF (R82, R107, R120, R179, R207, R214) did not prevent ADP-ribosylation. Similarly, single mutations including one conserved and one non-conserved arginine of the TNF-stalk did not completely prevent the modification.

This thesis shows that TNF is ADP-ribosylated at multiple sites and that at least one ADP-ribosylation site is located in the TNF-stalk (R60, R65) and sTNF (R82, R107, R120; R179, R207, R214).

These results are an important basis for the identification of all ADP-ribosylation sites in TNF and for continuing studies relating to the effects of the posttranslational modification of TNF to its bioactivity and its interaction with its receptors.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen und Anglizismen

3D	Dreidimensional
ADAM	<i>α-Disintegrin and Metalloproteinase</i>
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADPR	ADP-Ribose
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
AP	<i>Activator protein</i>
ARH	ADP-Ribosyl-Hydrolase
BSA	Bovines Serumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cFLIP	<i>Caspase-8 FLICE inhibitory Protein</i>
CRD	Cysteinreiche Domäne (<i>cysteine rich domain</i>)
DcR	Decoyrezeptor
DD	Todesdomäne (<i>Death domain</i>)
DISC	<i>Death inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Mischung gleicher Stoffmengen der vier Desoxynukleosid-Triphosphate für die PCR
DT	Diphtherie-Toxin
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eEF	Eukaryontischer Elongationsfaktor
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
eNAD	etheno-NAD (<i>Nikotinamid-1,N6-Etheno-Adenin- Dinukleotid</i>)
ENPP2	<i>Ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 2</i>
ETA	Exotoxin A

FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	<i>Fas associated DD protein</i>
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinthiocyanat
FLAG-Tag	Rekombinant eingefügtes Epitop
FSC	Vorwärtsstreuung (<i>forward scatter</i>): gibt bei durchflusszytometrischen Analysen Aufschluss über die Größe der Zellen
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GTP	Guanosintriphosphat
GvHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
hART 1	Humane ADP-Ribosyltransferase 1
HEK	Humane embryonale Nierenzelllinie (<i>human embryonic kidney fibroblast-like cells</i>)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HNP	<i>Human neutrophile peptide</i>
HRP	<i>Horseradish-Peroxidase</i>
HVEM	<i>Herpes virus entry mediator</i>
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IKK	<i>Inhibitor of NFκB (IκB)-kinase-kinase</i>
IL	Interleukin
JNK	c-Jun-N-terminale-Kinase
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kit	Vorgefertigtes Reagenzsystem
L	Ligand
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
mAb	Monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
mADP	Mono-Adenosindiphosphat
MAP	<i>Mitogen-activated-protein</i>

mART	Mono-ADP-Ribosyltransferasen
MEF	<i>Myocyte-specific enhancer factor</i>
MES	2-Morpholinoehansulfonsäure
MFI	Mittlere Floureszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MOPS	3-(N-morpholino)propane sulfonic acid
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
mTNF	Membranständiges TNF
NaCl	Kochsalz
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADase	NAD-Glykohydrolase
NC	Nitrocellulose
NFATp	<i>Nuclear factor of activated T cells transcription factor</i>
NFκB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NICD	NAD-induzierter Zelltod (<i>NAD-induced cell death</i>)
OPG	Osteoprotegerin
P2X7	Purinorezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF-BB	<i>Platelet-derived growth factor-BB</i>
PE	Phycoerythrin
pH	pH-Wert: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration an H ₃ O ⁺ -Ionen
PI	Propidiumiodid
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase
PG	Prostaglandin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIP	<i>Receptor interacting protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPM	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur

SA	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SSC	Seitwärtsstreuung (<i>side scatter</i>): gibt bei durchflusszytometrischen Analysen Aufschluss über die Granularität der Zellen
sTNF	Löslicher (<i>soluble</i>) TNF
stTNF	TNF–Stielregion (<i>Stalk</i>)
TACE	Metalloprotease, die TNF von der Zelloberfläche abspaltet (<i>TNF-α converting enzyme</i>)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TAT	<i>Transactivator of transcription</i>
THD	<i>TNF-homology domain</i>
TIM	<i>TRAF interacting motifs</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TRADD	<i>TNFR-associated protein with death domain</i>
TRAF	<i>TNFR-associated factor</i>
TRAPS	TNFR-assoziiertes periodisches Syndrom
TRIS	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)
tTNF	TNF-Trimer
WT	Wildtyp

7.2 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

8. Literaturverzeichnis

- Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV, Harkins RN. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 1985; 260: 2345-2354.
- Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat.Rev.Immunol.* 2003; 3 (9): 745-756.
- Aktories, K und Barbieri, JT. Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nature reviews* 2005; 3, 397-410
- Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays.* 2004;26:882–93.
- Balducci E, Horiba K, Usuki J, Park M, Ferrans VJ, Moss J. Selective expression of RT6 superfamily in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Sep; 21(3):337-46.
- Banner DW, D'Arcy A, Janes W et al. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell.* 1993; 73 (3), 431-445.
- Baud L, Oudinet JP, Bens M, Noe L, Peraldi MN, Rondeau E, Etienne J, Ardaillou R. Production of tumor necrosis factor by rat mesangial cells in response to bacterial lipopolysaccharide. *Kidney Int.* 1989; 35: 1111–1118.
- Berg D, Lehne M, Müller N, Siegmund D, Münkler S, Sebald W, Pfizenmaier K, Wajant H. Enforced covalent trimerization increases the activity of TNF ligand family members TRAIL and CD95L. *Cell Death Differ.* 2007; 14: 2021-2034.
- Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD et al. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature.* 1985; 316 (6028): 552-554. a
- Beutler B, Mahoney J, Le Trang N et al. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J. Exp. Med.* 1985; 161 (5): 984-995. b
- Beutler B, Milsark IW und Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science.* 1985; 229 (4716):869-871. c
- Beutler B, Cerami A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem.* 1988; 57:505-18. Review.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor alpha from cells. *Nature.* 1997; 385 (6618): 729-733.
- Braren R, Glowacki G, Nissen M, Haag F, Koch-Nolte F. Molecular characterization and expression of the gene for mouse NAD⁺:arginine ecto-mono(ADP-ribosyl)transferase, Art1. *Biochem J.* 1998 Dec 15; 336 (Pt 3):561-8
- Browning JL, Ngam-ek A, Lawton P, DeMarinis J, Tizard R, Chow EP, Hession C, O'Brine-Greco B, Foley SF und Ware CF. Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell.* 1993; 72:847–856.
- Calabrese F, Carturan E, Chimenti C, Pieroni M, Agostini C, Angelini A, Crosato M, Valente M, Boffa GM, Frustaci A, Thiene G. Overexpression of TNF

- alpha and TNF alpha receptor I in human viral myocarditis: clinicopathologic correlations. *Mod Pathol.* 2004; 17(9): 1108-1118.
- Carroll MC, Katzman P, Alicot EM, Koller BH, Geraghty DE, Orr HT, Strominger JL, Spies T. Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84: 85350- 85359.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975; 72 (9): 3666-3670.
- Collier RJ. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon.* 2001; 39:1793–803.
- Corda D und Di Girolamo M. Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *Embo J.* 2003; 22(9): 1953-8.
- Corti A, Fassina G, Marcucci F, Barbanti E and Cassani G. Oligomeric tumour necrosis factor alpha slowly converts into inactive forms at bioactive levels. *Biochem.J.* 1992; 284 (Pt 3): 905-910.
- Dayer JM, Beutler B und Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J. Exp. Med.* 1985; 162 (6): 2163-2168.
- Del Vecchio M, Balducci E. Mono ADP-ribosylation inhibitors prevent inflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *Mol Cell Biochem.* 2008 Mar; 310(1-2):77-83.
- Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Jun-Aug; 14(3-4):193-209. Review.
- Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA Jr, O'Connor JV. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med.* 1986 Jun 1; 163(6):1433-50.
- Donnelly LE, Rendell NB, Murray S, Allport JR, Lo G, Kefalas P, Taylor GW, and MacDermot J. Arginine-specific mono(ADP-ribosyl)transferase activity on the surface of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *Biochem J.* 1996 April 15; 315(Pt 2): 635–641.
- Eck MJ, Beutler B, Kuo G, Merryweather JP, Sprang SR. Crystallization of trimeric recombinant human tumor necrosis factor (cachectin). *J Biol Chem.* 1988; 263: 12816- 12890.
- Eck MJ, Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor alpha at 2,6 Å resolution: implications for receptor binding. *J Biol Chem.* 1989; 264: 17595-17605.
- Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2002 May; 2(5):364-71.
- Feldmann M. Many cytokines are very useful therapeutic targets in disease. *J Clin Invest.* 2008 Nov; 118(11):3533-6. Review.
- Flynn JL, Goldstein MM, Chan J et al. Tumor necrosis factor alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity* 1995; 2:561–72.
- Friedrich M, Böhlig L, Kirschner RD, Engeland K und Hauschildt S. Identification of two regulatory binding sites which confer myotube specific expression of the mono-ADP-ribosyltransferase ART1 gene. *BMC Mol Biol.* 2008; 9:91.

- Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ et al. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82 (24):8667-8671.
- Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M et al. Processing of tumour necrosis factor alpha precursor by metalloproteinases. *Nature*. 1994; 370 (6490): 555-557.
- Genth-Zotz S, Bolger AP, Anker SD. Tumor-Nekrose-Faktor alpha bei chronischer Herzinsuffizienz. *Herz*. 2001; 26:437-46
- Giroir BP, Brown T, Beutler B. Constitutive synthesis of tumor necrosis factor in the thymus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 4864-4868. a
- Giroir BP, Johnson JH, Brown T, Allen GL, Beutler B. The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. *J Clin Invest*. 1992; 90: 693-698. b
- Glowacki G, Braren R, Firner K, Nissen M, Kuhl M, Reche P, Bazan F, Cetkovic-Cvrlje M, Leiter E, Haag F und Koch-Nolte F. The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Sci*. 2002; 11: 1657-1670
- Haag F, Koch-Nolte F, Kuhl M, Lorenzen S, Thiele HG. Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species. *J Mol Biol*. 1994; 243: 537-46.
- Hassa PO, Haenni SS, Elser M, und Hottiger MO. Nuclear ADPribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006; 70: 789-829
- Hassa, PO und Hottiger, MO. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front Biosci*. 2008; 13: 3046-82.
- Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. 2005; 115: 1-20.
- Higuchi M, Higashi N, Taki N, Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol*. 1990; 144: 1425-1431.
- Honjo T, Nishizuka Y, Hayaishi O. Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J Biol Chem*. 1968; 243:3553-3555.
- Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000 Aug 1; 50(3):184-95. Review.
- Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, P. L. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation*. 1999; 99(11):1492-8.
- Jones EM, Baird A. Cell-surface ADP-ribosylation of fibroblast growth factor-2 by an arginine-specific ADP-ribosyltransferase. *Biochem J*. 1997 Apr 1; 323 (Pt 1):173-7.
- Kahl S, Nissen M, Girisch R, Duffy T, Leiter EH, Haag F, Koch-Nolte F. Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. *J Immunol*. 2000 Oct 15; 165(8):4463-9

- Kaufman MR, Jia J, Zeng L, Ha U, Chow M, Jin S. Pseudomonas aeruginosa mediated apoptosis requires the ADP-ribosylating activity of exoS. *Microbiology*. 2000; 146 (Pt 10):2531–41.
- Kefalas P, Yadollahi-Farsani M, Saxty BA, MacDermot J. Arginine-specific ADP-ribosyltransferase of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes: cDNA cloning and identification of a polymorphic site in the coding region. *Biochem Soc Trans*. 1998 Feb; 26(1):S81.
- Kim C, Slavinskaya Z, Merrill AR und Kaufmann SHE. Human α -defensins neutralize toxins of the mono-ADP-ribosyltransferase family. *Biochem J*. 2006 October 15; 399(Pt 2): 225–229.
- Kisich KO, Higgins M, Diamond G und Heifets L. Tumor Necrosis Factor Alpha Stimulates Killing of Mycobacterium tuberculosis by Human Neutrophils. *Infect Immun*. 2002; 70(8): 4591–4599.
- Koch-Nolte F, Petersen D, Balasubramanian S, Haag F, Kahlke D, Willer T et al. Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADPRibosyl)- transferases and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins. *J Biol Chem*. 1996; 271: 7686–93.
- Koch-Nolte F, Glowacki G, Bannas P, Braasch F, Dubberke G, Ortolan E et al. Use of genetic immunization to raise antibodies recognizing toxin-related cell surface ADP-ribosyltransferases in native conformation. *Cell Immunol*. 2005; 236:66–71.
- Krebs C, Koestner W, Nissen M, Welge V, Parusel I, Malavasi F et al. Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine. *Anal Biochem*. 2003; 314: 108–15.
- Kriegler M, Perez C, Defay K, Albert K, Albert T, Lu SD. A novel form TNF-cachectin in a cell-surface cytotoxic transmembrane protein. Ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*. 1988; 53: 45-53.
- Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med*. 1996; 183: 949-958.
- Kuprash DV, Alimzhanov MB, Tumanov AV, Grivennikov SI, Shakhov AN, Drutskaya LN, Marino MW, Turetskaya RL, Anderson AO, Rajewsky K, Pfeffer K, Nedospasov SA. Redundancy in tumor necrosis factor and lymphotoxin signaling in vivo: mice with inactivation of the entire TNF/LT locus versus single-knockout mice. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 8626-34.
- Laing, Sabrina (2005). Molekulare Charakterisierung der humanen Ekto-ADP-Ribosyltransferase 1 und ihre Identifizierung auf primären Zellen. Diplomarbeit Fachbereich Chemie. Universität Bielefeld.
- Laing, Sabrina (2010). Die strukturelle und funktionelle Charakterisierung der ADP-Ribosylierung von humanem Tumor-Nekrose-Faktor durch ADP-Ribosyltransferase-1. Dissertation Fachbereich Biologie. Universität Hamburg.
- Lehrer RI, Lichtenstein AK und Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol*. 1993; 11:105–128.
- Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, M P. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*. 1990; 26:236-41.

- Lin J, Ziring D, Desai S, Kim S, Wong M, Korin Y, Braun J, Reed E, Gjertson D und Singh RR. TNF α blockade in human diseases: An overview of efficacy and safety. *Clin Immunol.* 2008 Jan; 126(1):13-30
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001; 104: 487-501.
- Loetscher H, Gentz R, Zulauf M, Lustig A, Tabuchi H, Schlaeger EJ, Brockhaus M, Gallati H, Manneberg M, Lesslauer W. Recombinant 55-kDa. tumor necrosis factor (TNF) receptor. Stoichiometry of binding to TNF alpha and TNF beta and inhibition of TNF activity. *J Biol Chem.* 1991; 266: 18324-18329.
- Marino MW, Dunn D, Grail M, Inglese Y, Noguchi E, Richards A, Jungbluth H, Wada M, Moore B, Williamson S, Old LJ. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 8093-8098.
- Moss J, Zolkiewska A, Okazaki I. ADP-ribosylarginine hydrolases and ADP-ribosyltransferases. Partners in ADPRibosylation cycles. *Adv Exp Med. Biol.* 1997; 419:25-33.
- Moss J, Balducci E, Cavanaugh E, Kim HJ, Konczalik P, Lesma EA, Okazaki IJ, Park M, Shoemaker M, Stevens LA, Zolkiewska A. Characterization of NAD: arginine ADP-ribosyltransferases. *Mol Cell Biochem.* 1999 Mar; 193(1-2):109-13. Review.
- Naismith JH und Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem.Sci.* 1998; 23 (2): 74-79.
- Nash PT und Florin TH. Tumour necrosis factor inhibitors. *Med.J.Aust.* 2005; 183 (4): 205- 208.
- Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray P. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure homology and chromosomal location. *Nucleic Acids Res.* 1985; 13: 6361-6373.
- Okazaki IJ, Kim HJ, McElvaney NG, Lesma E, Moss J. Molecular characterization of a glycosylphosphatidylinositol-linked ADP-ribosyltransferase from lymphocytes. *Blood* 1996; 88:915-921.
- Okazaki IJ, Moss J. Glycosylphosphatidylinositol-anchored and secretory isoforms of mono-ADP-ribosyltransferases. *J Biol Chem.* 1998; 273:23617-23620.
- Okazaki, IJ und Moss, J. Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored, secreted and intracellular vertebrate mono-ADP-ribosyltransferases. *Annu Rev Nutr.* 1999; 19:485-509
- Okazaki IJ, Zolkiewska A, Nightingale MS, Moss J. Immunological and structural conservation of mammalian skeletal muscle glycosylphosphatidylinositol-linked ADP-ribosyltransferases. *Biochemistry.* 1994; 33:12828-12836.
- Okuda K, Sakumoto R. Multiple roles of TNF super family members in corpus luteum function. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003 Nov 10; 1:95. Review.
- Paone G, Stevens LA, Levine RL, Bourgeois C, Steagall WK, Gochuico BR und Moss J. ADP-ribosyltransferase-specific modification of human neutrophil peptide-1. *J Biol Chem.* 2006 Jun 23; 281(25):17054-60.
- Paone G, Wada A, Stevens LA, Matin A, Hirayama T, Levine RL und Moss J. ADP ribosylation of human neutrophil peptide-1 regulates its biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 99: 8231-8235
- Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V und Kollias G. 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.* 1996; 184:1397–1411.
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS et al. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature.* 1984; 312 (5996): 724-729.
- Piguet PF, Grau GE, Allet B, Vassalli P. Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. *J Exp Med.* 1987 Nov 1; 166(5):1280-9.
- Reed C, Fu ZQ, Wu J, Xue YN, Harrison RW, Chen MJ and Weber IT. Crystal structure of TNF-alpha mutant R31D with greater affinity for receptor R1 compared with R2. *Protein Eng.* 1997; 10 (10): 1101-1107.
- Richard JF, Petit L, Gibert M, Marvaud JC, Bouchaud C, Popoff MR. Bacterial toxins modifying the actin cytoskeleton. *Int Microbiol.* 1999; 2:185–94.
- Roach DR, Briscoe H, Saunders B, France MP, Riminton S, Britton WJ. Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J Exp Med.* 2001; 193:239–46.
- Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol.* 2002 May 1; 168(9):4620-7.
- Saxty BA, Yadollahi-Farsani M, Upton PD, Johnstone SR und MacDermot J. Inactivation of platelet-derived growth factor-BB following modification by ADP-ribosyltransferase. *Br J Pharmacol.* 2001 August; 133(8): 1219–1226.
- Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, Deterre P, Haag F, Koch-Nolte F. NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity.* 2003 Oct;19(4):571-82.
- Seman M, Adriouch S, Haag F, Koch-Nolte F. Ecto- ADP-ribosyltransferases (ARTs): emerging actors in cell communication and signaling. *Curr Med Chem.* 2004; 11: 857–72.
- Smith RA, Baglioni C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem.* 1987; 262: 6951-6954.
- Smith SC, Allen PM. Neutralization of endogenous tumor necrosis factor ameliorates the severity of myosin-induced myocarditis. *Circ Res.* 1992 Apr; 70(4):856-63.
- Son JH, Cha SW. Anti-TNF-alpha Therapy for Ankylosing Spondylitis. *Clin Orthop Surg.* 2010 Mar; 2(1):28-33.
- Stauber GB, Aggarwal BB. Characterization and affinity cross-linking of receptors for human recombinant lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) on a human histiocytic lymphoma cell line, U-937. *J Biol Chem.* 1989 Feb 25; 264(6):3573-6.
- Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, DL. M. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation.* 1996; 93(4):704-11.
- Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science.* 1986; 234 (4775): 470-474.
- Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT, Kuo GC, Beutler B, Cotran RS, Cerami A, et al. Cachectin/tumor necrosis factor

- induces cachexia, anemia, and inflammation. *J Exp Med*. 1988 Mar 1; 167(3):1211-27.
- Tsuchiya M, Shimoyama M. Target protein for eucaryotic arginine-specific ADP-ribosyltransferase. *Mol Cell Biochem*. 1994 Sep;138(1-2):113-8.
- Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*. 1992; 10:411-52. Review.
- Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem*. 1991; 266: 7313-7316.
- Ware CF. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 787-819.
- Yadollahi-Farsani M, Kefalas P, Saxty BA, MacDermot J. Polymorphic forms of human ADP-ribosyltransferase-1 differences in their catalytic activities revealed by labeling of membrane-associated substrates. *Eur J Biochem*. 1999; 262: 342-8.
- Zhang G. Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding. *Curr Opin Struct Biol*. 2004 Apr;14(2):154-60. Review.
- Zolkiewska A. Ecto-ADP-ribose transferases: cell-surface response to local tissue injury. *Physiology* (Bethesda). 2005 Dec; 20:374-81. Review.
- Zolkiewska A, Moss J. Integrin alpha 7 as substrate for a glycosylphosphatidylinositol-anchored ADP-ribosyltransferase on the surface of skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. 1993; 268:25273-6.
- Zolkiewska A, Nightingale MS und Moss J. Molecular characterization of NAD:arginine ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992; 89: 11352-11356

9. Danksagung

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Friedrich Haag für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation, die Überlassung des interessanten Themas, seine hervorragende Betreuung und seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen Phasen der vorliegenden Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Friedrich Nolte für seine freundliche Unterstützung und seine Ratschläge.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Gudrun Dubberke für die Einarbeitung in die experimentellen Methoden und für viele praktische Tipps.

Frau Fabienne Seyfried, Herrn Dr. Stefan Kernstock, Herrn Dr. Jan Reyelt, Nicole Schwarz, Janusz Wesolowski, Marion Nissen, Cary McMillan, Björn Rissiek und allen Mitarbeitern am Institut für Immunologie möchte ich für die hilfreichen wissenschaftlichen Ratschläge und für die schöne Zeit im Labor danken.

Ich danke Mark Tominschek und meiner Familie, Irmgard Pilz, Annika Pilz und Ulrich Pilz, für ihr Verständnis und Ermutigung in allen Lebenslagen.

10. Lebenslauf

Der Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Ausgabe meiner Doktorarbeit.

11. Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: