

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Immunologie
Direktor Prof. Dr. Bernard Fleischer

**Molekulare und funktionale Charakterisierung
der ADP-Ribosylierung der IL-2 Rezeptoruntereinheit CD25
und des homophilen Interaktionsmoleküls CD229**

Dissertation

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

Vorgelegt von

Cary MacMillan

aus Hamburg

unter der Betreuung von Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 05.02.2018**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Friedrich Nolte

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Andreas Guse

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Das Immunsystem	6
1.1.1 Die unspezifische Immunantwort	6
1.1.2 Die spezifische Immunantwort	7
1.2 Die ADP-Ribosylierung – eine posttranslationale Proteinmodifikation	8
1.2.1 Die biochemische Reaktion der ADP-Ribosylierung	8
1.2.2 Die verschiedenen ARTs und deren Struktur.....	10
1.2.3 Die ADP-Ribosylierung im Kontext des Immunsystems	12
1.2.4 Nachweismethoden der ADP-Ribosylierung	14
1.3 CD25 – Die α-Kette des heterotrimeren Interleukin-2-Rezeptors	16
1.4 CD229 – Ein homophiles Interaktionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie ...	17
2 Zielsetzung und Fragestellung	19
3 Materialien und Methoden	20
3.1 Materialien	20
3.1.1 Laborgeräte.....	20
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	20
3.1.3 Chemikalien.....	21
3.1.4 Medien	22
3.1.5 Lösungen, Puffer, Säulen und Kits	23
3.1.6 Enzyme	25
3.1.7 Vektoren	25
3.1.8 Primer	25
3.1.9 Antikörper.....	26
3.1.10 Bakterienstamm.....	28
3.1.11 Zelllinien.....	28
3.1.12 Mausstamm	28
3.2 Methoden	28
3.2.1 Methoden der Zellbiologie.....	28
3.2.2 Methoden der Molekularbiologie	33
3.2.3 Immunologische Methoden	38

3.2.4 <i>In silico</i> Recherche	40
3.2.5 Proteinbiochemie.....	40
4 Ergebnisse.....	44
4.1 Analyse der Expression und ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen.....	44
4.1.1 Durchflusszytometrische Expressionsanalyse von ART2.2-targets auf Lymphomzellen	44
4.1.2 Analyse der ADP-Ribosylierung von ART-Zielproteinen auf Lymphomzellen	46
4.1.3 Nachweis von ART2-Zielproteinen auf Maus-Tregs und konventionellen T- Zellen mittels ³² P-NAD	48
4.2 Identifikation der Zielarginine der ADP-Ribosylierung in msCD229.....	51
4.2.1 3D-Modellierung von msCD229 auf die 3D-Kristallstruktur des strukturverwandten NK-T-B-Antigen (NTB-A).....	51
4.2.2 Zielgerichtete Mutagenese der extrazellulären Arginine in msCD229 zu Lysin	54
4.2.3 Expression der mutierten msCD229-Varianten und Analyse der ADP- Ribosylierung durch ART2	56
4.3 Etablierung von Verfahren zur funktionellen Untersuchung der ADP- Ribosylierung von CD25 und CD229	61
4.3.1 Untersuchung des Einflusses der ADP-Ribosylierung von CD25 auf die Phosphorylierung von STAT5 in IL-2-abhängigen CTLL-2-Zellen.....	61
4.3.2 Klonierung und Expression von msCD229 msIgG1-Fc- Fusionsproteinen.....	64
5 Diskussion	67
5.1 Die Physiologie der ADP-Ribosylierung und NAD-Freisetzung	67
5.2 Die ADP-Ribosylierung von Membranproteinen.....	68
5.3 Funktionelle Konsequenzen der ADP-Ribosylierung	70
5.4 Ausblick und weiterführende Untersuchungen.....	73
Zusammenfassung	75
Abstract.....	76
Verzeichnisse	77
Abkürzungsverzeichnis.....	77
Anglizismen	78
Literaturverzeichnis	80

Abbildungsverzeichnis	87
Anhänge	88
Alignment mouse (oben) und human (unten) CD229	88
Alignment mouse (oben) und human (unten) CD25	88
Aminosäuresequenz huNTB-A	89
Modellierung der Domänen V1C2 von msCD229 auf huNTB-A.....	89
Modellierung der Domänen V3C4 von msCD229 auf huNTB-A.....	91
Plasmide	95
Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.....	98
Danksagung	99
Eidesstattliche Erklärung	101

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus zellulären und löslichen Komponenten, welches den Körper vor dem schädlichen Einfluss von Pathogenen und entarteten körpereigenen Zellen schützt. Zu den Pathogenen gehören unter anderem Viren, Bakterien sowie verschiedene ein- und mehrzellige Parasiten und deren Toxine. Ohne das Immunsystem wäre der Körper in einer Umgebung, in der diverse Organismen um Energie in Form von Nährstoffen und um Lebensraum kämpfen, nicht in der Lage, sich durchzusetzen. Im Immunsystem wird zwischen der zellgebundenen und der löslichen humoralen Immunantwort unterschieden. Die zellgebundene Immunantwort basiert auf einem direkten Zell-Zell-Kontakt und der Freisetzung löslicher Substanzen. Die humorale Antwort wird vor allem von löslichen Proteinen getragen, welche mit den zu bekämpfenden Organismen interagieren und diese abtöten, inaktivieren oder für die Abwehrzellen opsonieren. Das Immunsystem lässt sich in das unspezifische und das spezifische Immunsystem unterteilen. Das unspezifische Immunsystem ist der erste Schritt bei der Abwehr von Pathogenen.

1.1.1 Die unspezifische Immunantwort

Die unspezifische Immunantwort hat die Aufgabe, schnell auf Substanzen und Organismen zu reagieren, welche dem Körper Schaden zufügen könnten. Die Hauptträger der zellulären unspezifischen Immunantwort sind Granulozyten und Makrophagen. Bei der Abwehr von Keimen werden zunächst Granulozyten rekrutiert, welche die Keime phagozytieren und mittels toxischer Verbindungen abtöten. Zusätzlich können diese durch Signalmoleküle wie Interleukine und Chemokine den Entzündungsprozess verstärken und andere Abwehrzellen, u.a. Makrophagen, anlocken. Makrophagen phagozytieren ähnlich wie Granulozyten Pathogene und töten diese in intrazellulären Vesikeln mit niedrigem pH-Wert durch Enzyme, wie z.B. Proteasen und toxische Substanzen, ab. Makrophagen präsentieren Teile der phagozytierten Keime mittels ihrer MHC-II-Oberflächenproteine den Helfer-T-Zellen (Th-Zellen) des spezifischen Immunsystems. Diese aktivieren dann durch weitere Signalmoleküle andere Zellen des Immunsystems, u.a. auch die spezifische Immunabwehr. Der nicht zellgebundene Teil der unspezifischen Immunantwort besteht aus verschiedenen

löslichen Proteinen. Wichtiger Bestandteil ist das C-reaktive Protein (CRP), welches bei Entzündungen im Körper vermehrt in der Leber produziert wird. Es ist in der Lage an Bakterien zu binden und dadurch das Komplementsystem zu aktivieren. Das Komplementsystem ist ebenfalls eine zur unspezifischen Immunantwort gehörende Kaskade bestehend aus Enzymen, welche zum Ziel hat, einen Membranangriffskomplex zu bilden. Die dabei gebildete Pore lysiert den pathogenen Keim durch Zerstörung des osmotischen Gleichgewichts und des Membranpotentials. Bei der Aktivierung des Komplementsystems entstehen außerdem Spaltprodukte, welche die Entzündungsreaktion verstärken und Abwehrzellen mittels Chemotaxis anzulocken vermögen.

1.1.2 Die spezifische Immunantwort

Die spezifische Immunantwort ist in der Lage, Pathogene sehr genau anhand ihrer Zusammensetzung und Oberflächeneigenschaften zu unterscheiden. Dies ist wichtig, um eine gezielte Abwehr zu gewährleisten. Hauptträger der spezifischen zellulären Immunantwort sind T-Zellen und B-Zellen. Beide Zellarten gehen aus im Knochenmark wachsenden hämatopoetischen Stammzellen hervor. B-Zellen reifen im Knochenmark, T-Zellen reifen im Thymus. Dabei wird die Antigenpezifität von B- und T-Zellen zufällig durch somatische Rekombination hergestellt. Die Zellen durchlaufen eine Selektion, welche dafür sorgt, dass die Zellen körpereigene Bestandteile nicht angreifen, trotzdem aber mit körpereigenen Strukturen wie den MHC-Komplexen interagieren können. Eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der spezifischen Immunantwort spielen dendritische Zellen. Diese kommen als interdigitierende dendritische Zellen (IDC) im peripheren Gewebe mit Pathogenen in Kontakt. Nachdem sie Antigene dieser Pathogene phagozytiert haben, wandern die IDC in die Follikel des nächstgelegenen drainierenden Lymphknoten. In den Lymphknoten präsentieren sie den T-Lymphozyten mittels MHC die aufgenommenen Antigenfragmente und aktivieren dort T-Zellen mit dem passenden T-Zellrezeptor. Weitere Effektorzellen der spezifischen Immunantwort sind die Plasmazellen. Wenn eine B-Zelle mit ihrem spezifischen Antigen in Kontakt kommt, wird diese aktiviert. Folgt darauf die Interaktion mit einer CD4⁺ T-Zelle, bilden beide durch deren Zell-Zell-Kontakt die sogenannte „Immunologische Synapse“ und die B-Zelle differenziert sich zu einer Antikörper produzierenden Plasmazelle. Antikörper erkennen ein spezifisches Epitop auf dem abzuwehrenden Pathogen. Im weiteren Verlauf der Immunabwehr kommt es zu einem Antikörperklassenwechsel. In der frühen Phase der Immunantwort werden zunächst

pentamere Antikörper der Klasse IgM produziert, im weiteren Verlauf werden monomere Antikörper der Klasse IgG produziert. Antikörper markieren Pathogene für Fresszellen. Makrophagen können die so markierten Pathogene leichter mittels ihrer Rezeptoren für den Fc-Teil der Antikörper erkennen. Außerdem sind die Fc-Teile der Antikörper in der Lage, das Komplementsystem zu aktivieren und somit die Keime zu lysieren. Über multiple Bindungsstellen sind Antikörper in der Lage, Pathogenaggregate zu generieren und diese hierdurch unschädlich zu machen. Bei intrazellulären Keimen werden $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen rekrutiert, welche mittels ihres T-Zellrezeptors mit MHC-I-Molekülen auf kernhaltigen Zellen interagieren, um so zu erkennen, ob die Zelle körperfremde Antigene enthält. Ist dies der Fall, wird die Zelle lysiert (Schütt & Bröker 2006). Eine weitere Untergruppe von T-Zellen besitzt die Eigenschaft, entzündungshemmend zu wirken. Diese T-Zellen werden regulatorische T-Zellen (Tregs) genannt. Ihre Hauptaufgabe liegt in der körpereigenen Toleranzentwicklung und deren Aufrechterhaltung. Tregs sind somit in der Lage, durch ihre immunsupprimierenden Funktionen Autoimmunreaktionen zu verhindern (Miyara & Sakaguchi 2007). Mausmodelle, bei denen genetisch oder pharmakologisch selektiv Tregs depletiert wurden, zeigen verstärkt Autoimmunsymptomaten (Lahl et al. 2007). Tregs können dabei sowohl über Zell-Zell-Kontakte, als auch über lösliche Substanzen Zielzellen in ihrer Funktion beeinflussen (Sakaguchi et al. 2013; Siewert et al. 2008; Bopp et al. 2007).

In dieser Arbeit werden zwei funktionell relevante T-Zelloberflächenmoleküle näher charakterisiert. Der Fokus liegt dabei auf der posttranslationalen Modifikation dieser Proteine durch eine ADP-Ribosyltransferase.

1.2 Die ADP-Ribosylierung – eine posttranslationale Proteinmodifikation

1.2.1 Die biochemische Reaktion der ADP-Ribosylierung

Bei der ADP-Ribosylierung handelt es sich um eine kovalente Modifikation von Proteinen und deren Substraten. Das dieser enzymatischen Reaktion zugrundeliegende Substrat ist Nicotinamidadenindinukleotid (NAD), welches vor allem im Zellinneren vorkommt und als Koenzym und Oxidationsmittel für zahlreiche Reaktionen innerhalb der Zelle dient. Strukturell ist NAD ein über eine Phosphodiesterbindung verknüpftes Dinukleotid, bei welchem die beiden Basen Adenin und Nicotinamid jeweils N-glykosidisch mit dem C1-Atom eines Riboseringes verbunden sind. Es kommt in positiv geladener Form als NAD^+

und nach Übertragung eines Hydridions in reduzierter Form als NADH vor. Der Einfachheit halber wird NAD^+ in dieser Dissertation ohne das Plus für die positive Ladung als NAD bezeichnet. Die für diese enzymatische Reaktion benötigten Enzyme, ADP-Ribosyltransferasen (ARTs), nutzen die energiereiche Bindung zwischen ADP-Ribose und Nicotinamid, um die ADP-Ribose-Gruppe je nach Enzym spezifisch auf eine Aminosäure, DNA, ein Antibiotikum oder auf ein Wassermolekül zu übertragen. Bei der posttranslationalen ADP-Ribosylierung von Proteinen bekannte Zielaminosäuren sind Arginin, Asparagin, Cystein, Diphthamid, Lysin, Threonin und Glutamat. Bei der Spaltung der N-glykosidischen Bindung des NADs wird eine Energie von -34,3 kJ/mol frei, welche für die Übertragung des ADP-Riboserestes genutzt wird. Die ADP-Ribosylierung von Proteinen wird von mono-ADP-Ribosyltransferasen (mARTs oder ARTs) als mono-ADP-Ribosylierung und durch poly-ADP-Ribosyltransferasen (pARTS oder PARPs) als poly-ADP-Ribosylierung katalysiert (Koch-Nolte et al. 2008; Hottiger et al. 2010). PARPs können ADP-Ribose auf andere proteingebundene ADP-Ribosereste übertragen und bilden so große verzweigt-kettige poly-ADP-Ribose-Strukturen. Die auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten membranständig vorkommende ART2.2 ist eine mono-ADP-Ribosyltransferase und katalysiert die ADP-Ribosylierung von verschiedenen Zelloberflächenproteinen an Argininresten (**Abb.01**).

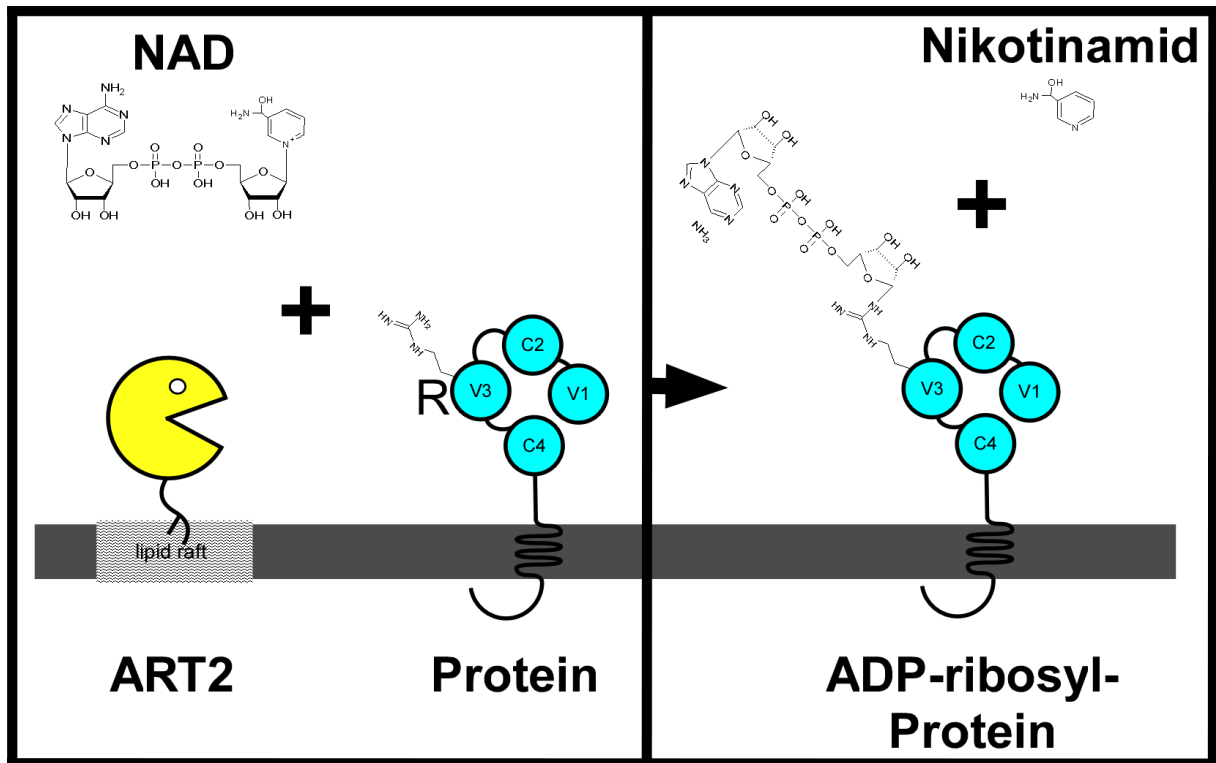


Abb.01 Die ADP-Ribosylierungsreaktion: Bei der ADP-Ribosylierung spaltet die ART das Substrat NAD zu ADP-Ribose und Nicotinamid. Bei dieser exothermen Reaktion wird die ADP-Ribose kovalent mit einer Aminosäure eines Zielproteins (blau) verknüpft. Strukturell ähneln ARTs einem „Pacman“ mit einer tiefen, maul-artigen NAD-Bindungstasche.

1.2.2 Die verschiedenen ARTs und deren Struktur

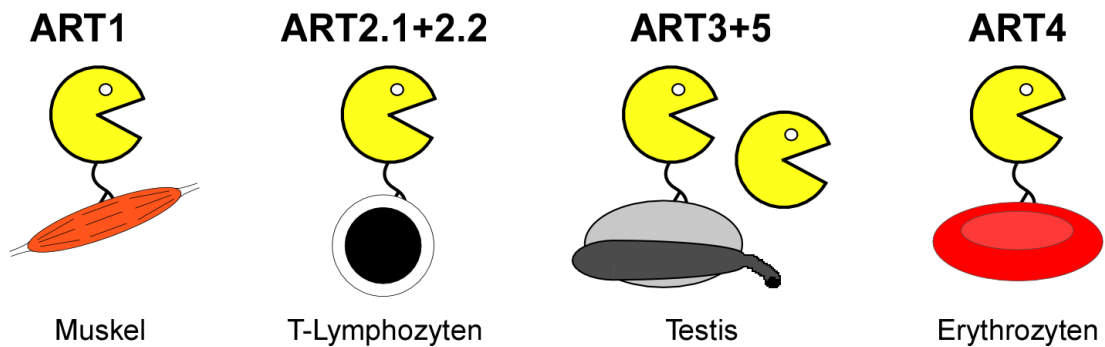
Die zuerst beschriebenen ADP-Ribosyltransferasen waren bakterielle Toxine wie beispielsweise das Diphtherietoxin von *Corynebakterium diphtheriae* (Honjo et al. 1968). Dieses Toxin nutzt das NAD der eukaryoten Zelle und ADP-ribosyliert den eukaryoten Elongationsfaktor 2 (EF-2) an einem Diphthamid-Rest (Robinson et al. 1974; Ness et al. 1980). Auf diesem Wege hemmt es die Proteinbiosynthese der Zelle. Mittlerweile wurden viele weitere bakterielle Toxine mit ART-Aktivität beschrieben.

In Säugetieren sind bisher zwei ART-Familien bekannt, die aus bis zu 17 Proteinen bestehende intrazelluläre PARP-Familie sowie eine Familie von membranständigen ARTs: ART1, ART2, ART3, ART4, ART5 (**Abb.02**) (Koch-Nolte et al. 2006). In der Maus existieren zwei Unterformen der ART2, die ART2.1 und die ART2.2 (Koch-Nolte et al. 2005). Sie werden auf Chromosom 11 kodiert (Koch-Nolte et al. 1993). Im Menschen ist die ART2 durch ein vorzeitiges Stopcodon inaktiviert. Die ART1 kommt im Skelettmuskelgewebe, Herzmuskelgewebe, auf Granulozyten und Epithelien vor. Die ART2.1 und ART2.2 kommen auf Lymphozyten und Makrophagen, die ART3 kommt im

Hodengewebe, Muskelgewebe und Gehirn vor. Die ART4 findet sich auf Erythrozyten und bildet dort das sogenannte Dombrock-Blutgruppenantigen (Gubin et al. 2000). Die ART5 ist von den bekannten extrazellulären ARTs die einzige, die nicht über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)- Anker membranassoziiert ist, sondern wahrscheinlich sezerniert wird. Die 3D-Struktur der ART2 der Ratte hat sechs konservierte β -Stränge, welche dem Ober- und Unterkiefer eines Pacmans ähneln (C Mueller-Dieckmann et al. 2002). In ARTs ist im Allgemeinen ein Glutamat auf dem fünften β -Strang konserviert, welches für die katalytische Aktivität von Bedeutung ist (Carroll & Collier 1984). Die Familie der ADP-Ribosyltransferasen kann je nach weiter konserviertem Sequenzmotiv in zwei Unterfamilien unterteilt werden: Die PARPs, Diphtherietoxin und die Rifampin-spezifische ART enthalten das Sequenzmotiv H-Y-E. Die argininspezifischen ADP-Ribosyltransferasen wie die ART2.2 der Maus enthalten wie auch das Cholera-toxin und Clostridiumtoxin das stark konservierte R-S-EXE-Sequenzmotiv (Koch-Nolte et al. 1996; Koch-Nolte et al. 2001). Die ART2.1 der Maus enthält verglichen mit der ART2.2 ein zusätzliches Disulfidpaar, welches wahrscheinlich eine zusätzliche Disulfidbrücke ausbildet. Die Reduktion der Disulfidbindung erhöht die Aktivität des Enzyms deutlich (Hara et al. 1999; Hara et al. 2000). In dieser Arbeit wurde vor allem die argininspezifische ekto-ADP-Ribosyltransferase ART2.2 der Maus untersucht, welche im Ergebnisteil der Einfachheit halber als ART2 bezeichnet wird (Hottiger et al. 2010).

Die Spezifität der ART 2.2 wird dadurch eingeschränkt, dass die ART 2.2 mit sogenannten Lipid-rafts assoziiert. Lipid-Rafts sind Membranmikrodomänen, die reich an Sphingolipiden und Cholesterin sind. Diese assoziieren zu „Flößen“, die in der Zellmembran schwimmen und beinhalten konstitutiv Proteine, welche spezielle Membrananker, z.B. GPI Anker, besitzen (Simons & Ikonen 1997). Die unterschiedliche Verteilung der Membranproteine hat einen Einfluss auf deren Signaltransduktion (Simons & Toomre 2000). Außerdem spielen Lipid-Rafts eine wichtige Rolle für Proteine der Immunologischen Synapse und des T-Zell-Rezeptors (Bromley et al. 2001). Die ART2.2 selbst besitzt einen GPI-Anker (Hollmann et al. 1996), welcher bewirkt, dass das Protein insbesondere in Lipid-Rafts vorkommt (Bannas et al. 2005).

Säugetier



Prokaryoten

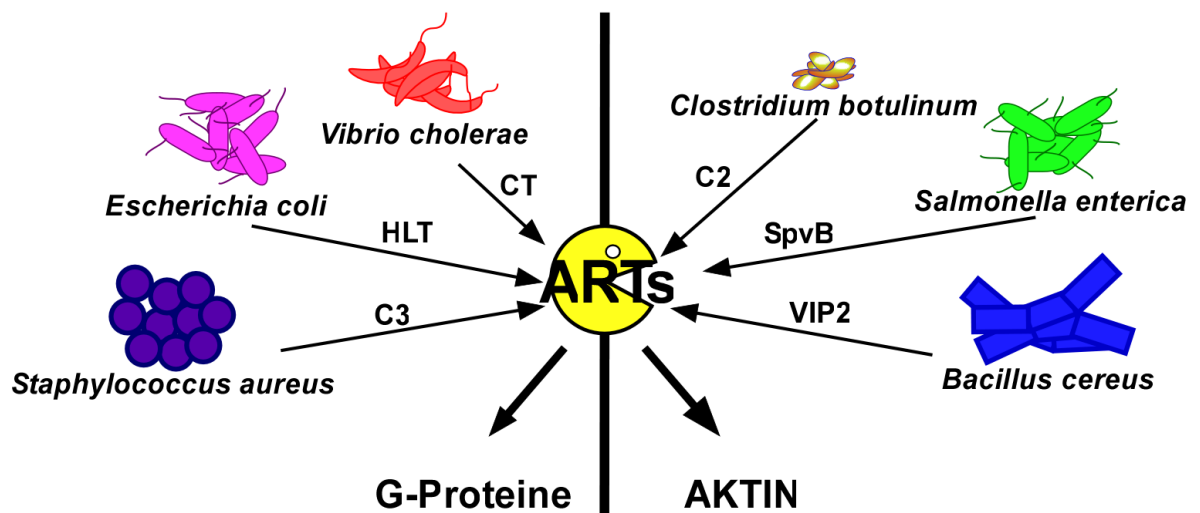


Abb.02 Die Familie der R-S-E ARTs in Eu- und Prokaryoten: **Oben:** Im Säugetier sind fünf verschiedene ekto-ARTs bekannt. Die ART1 kommt vor allem im Muskelgewebe, die ART2 auf T-Lymphozyten, die ART3 und die sezernierte ART5 im Testis vor. Die ART4 kommt auf Erythrozyten vor. **Unten:** In Bakterien haben ARTs vor allem die Funktion von Toxinen. **Unten links:** Die Toxine C3 aus *Staphylococcus aureus*, Hitzelabiles Toxin (HLT) aus *Escherichia coli* und Cholera toxin (CT) aus *Vibrio cholerae* ADP-ribosylieren G-Proteine. **Unten rechts:** Die Toxine C2 aus *Clostridium botulinum*, SpvB aus *Salmonella enterica* und VIP2 aus *Bacillus cereus* ADP-ribosylieren Aktin. Modifiziert nach (Koch-Nolte et al. 2006).

1.2.3 Die ADP-Ribosylierung im Kontext des Immunsystems

ARTs erfüllen in Bakterien vor allem die Funktion von Toxinen. Dabei sind die Ziele der bakteriellen ADP-Ribosylierung recht unterschiedlich. Die argininspezifischen Toxine C2 von *Clostridium botulinum*, VIP2 von *Bacillus cereus* und SpvB von *Salmonella enterica* ADP-ribosylieren das Zytoskelettprotein Aktin. Cholera toxin (CT) von *Vibrio cholerae*

und das hitzelabile Enterotoxin von *Escherichia coli* haben heterotrimere G-Proteine als Ziel (**Abb.02**) (Glowacki et al. 2002). Dass ARTs in Bakterien nicht nur Toxine bilden, sondern für den eigenen Stoffwechsel der Bakterien relevante Funktionen übernehmen, konnte am Beispiel der Stickstofffixierung in *Rhodospirillum rubrum* gezeigt werden. Dabei kann der Nitrogenase-Komplex durch ADP-Ribosylierung mittels der Dinitrogenase-Reduktase-ADP-Ribosyltransferase (DRAT) inaktiviert werden. Durch eine De-ADP-Ribosylierung mittels der Dinitrogenase-Reduktase-ADP-Glykohydrolase (DRAG) wird der Enzymkomplex wieder aktiviert (Ludden 1994).

In höher entwickelten Lebewesen wie der Maus und dem Menschen kommen ADP-Ribosyltransferasen in mehreren Kompartimenten und Geweben vor. Immunzellen der Maus exprimieren zwei Subtypen der ART2, welche vor allem auf T-Zellen und Makrophagen vorkommen (Hong et al. 2009). Da ART2 im Menschen als Pseudogen vorliegt, exprimieren humane Immunzellen kein ART2, jedoch konnte die ART1-Expression auf humanen regulatorischen T-Zell-Subpopulationen nachgewiesen werden (Cortés-García et al. 2016). Dabei ist bekannt, dass ARTs verschiedene Zielproteine auf der Zelloberfläche ADP-ribosylieren können. Somit kann der extrazelluläre NAD-Spiegel die Funktion von T-Lymphozyten beeinflussen. CD8⁺ T-Lymphozyten werden in ihrer zelltoxischen Aktivität und Proliferation durch NAD gehemmt (Wang et al. 1994). Ein weiterer ART-vermittelter Mechanismus ist der NAD-induzierte Zelltod (NICD). Dabei ADP-ribosyliert die murine ART2 den ligandengesteuerten Ionenkanal P2X7 an dem Arginin R125 (Adriouch et al. 2001; Adriouch et al. 2007; Seman et al. 2004). P2X7 wird dadurch aktiviert und für mono- und divalente Kationen durchlässig (Kawamura et al. 2005). Dabei kommt es zu einer Lipidumverteilung in der Membran mit der Externalisation von Phosphatidyl-Serin. Zudem schrumpfen die Zellen zunächst, nehmen anschließend an Volumen zu und lysieren schließlich (Taylor et al. 2008). Der NICD betrifft dabei vorwiegend naive T-Zellen, da aktivierte und T- Gedächtniszellen die ART2 von ihrer Oberfläche abstoßen (Kahl et al. 2000). Bei einer Entzündung wird NAD aus geschädigten Zellen freigesetzt. Daneben kann NAD auch gezielt durch Kanäle wie dem Halbkanal Connexin 43 freigesetzt werden (Bruzzone et al. 2001; Contreras et al. 2002). Dies führt bei einer Entzündung in vivo zu einer Verminderung der Zahl der naiven T-Lymphozyten in den drainierenden Lymphknoten (Adriouch et al. 2007). Sehr empfindlich auf extrazelluläres NAD reagieren auch regulatorische T-Zellen „Tregs“ (Aswad et al. 2005; Hubert et al. 2010). B-Lymphozyten exprimieren keine ART2 und haben eine sehr starke Expression von CD38, welches den NICD verhindert (Krebs et al. 2005). CD38 reguliert

dabei das extrazelluläre NAD-Angebot. CD38 ist somit gegenüber den membrabständigen ARTs kompetitiv in Bezug auf das Substrat NAD. Es bildet Metabolite, welche selbst zellmodulierend wirken können (Lund et al. 1995; Lund et al. 1998). Die genetische Inaktivierung der ART2 bzw. die des P2X7-Rezeptors verhindert den NICD naiver T-Zellen (Ohlrogge et al. 2002; Solle et al. 2001). ART2- bzw. P2X7-defiziente Tiere zeigen einen milderen Verlauf bei experimentellen Autoimmunerkrankungen wie der durch Concanavalin-A induzierten Hepatitis und der durch Peptidimmunisierung induzierten Encephalomyelitis (EAE) (Kawamura et al. 2006; Matute et al. 2007). Die Inhibition der ART2 unter Zuhilfenahme eines rekombinant hergestellten Schwere-Ketten-Antikörpers verringerte die Inzidenz von Autoimmundiabetes im Mausmodell (Scheuplein et al. 2010). Zusammenfassend wird deutlich, dass die Reaktion der ADP-Ribosylierung eine bedeutende Rolle in der Modulation des Immunsystems von Säugetieren spielt.

1.2.4 Nachweismethoden der ADP-Ribosylierung

Um die ADP-Ribosylierung eines Zielproteins nachzuweisen, stehen verschiedene markierte Formen von NAD zur Verfügung. Erstere ist eine isotonenveränderte Form (^{32}P -NAD), bei der ein radioaktives Phosphatatom eingebaut ist. ^{32}P -NAD ist ein β -Strahler, welcher mittels Autoradiographie detektierbar ist. Da es bisweilen keine verfügbaren Antikörper gegen ADP-Ribose oder ADP-ribosylierte Aminosäuren gibt, wird ein chemisch verändertes NAD genutzt, welches an Adenin eine Ethenogruppe trägt, das sogenannte Etheno-NAD (eNAD). Zur Detektion von eNAD steht der Antikörperklon 1G4 zur Verfügung (Young & Santella 1988) (**Abb.03**). Das ^{32}P -NAD wird genutzt, um Zielproteine mittels ^{32}P -ADP-ribosylierung zu markieren. Nach Lyse der Zellen, Immunpräzipitation des Proteins und folgender SDS-PAGE kann die ADP-Ribosylierung des jeweiligen Zielproteins autoradiographisch nachgewiesen werden. Das eNAD wird in ähnlicher Weise genutzt: Hier wird das Gel nach der SDS-PAGE im Western-Blott mittels 1G4-Antikörper auf eADP-ribosylierte Zielproteine hin untersucht. Zudem kann der 1G4-Antikörper im FACS genutzt werden, sodass eine generelle eADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen nachgewiesen werden kann (Krebs et al. 2003).

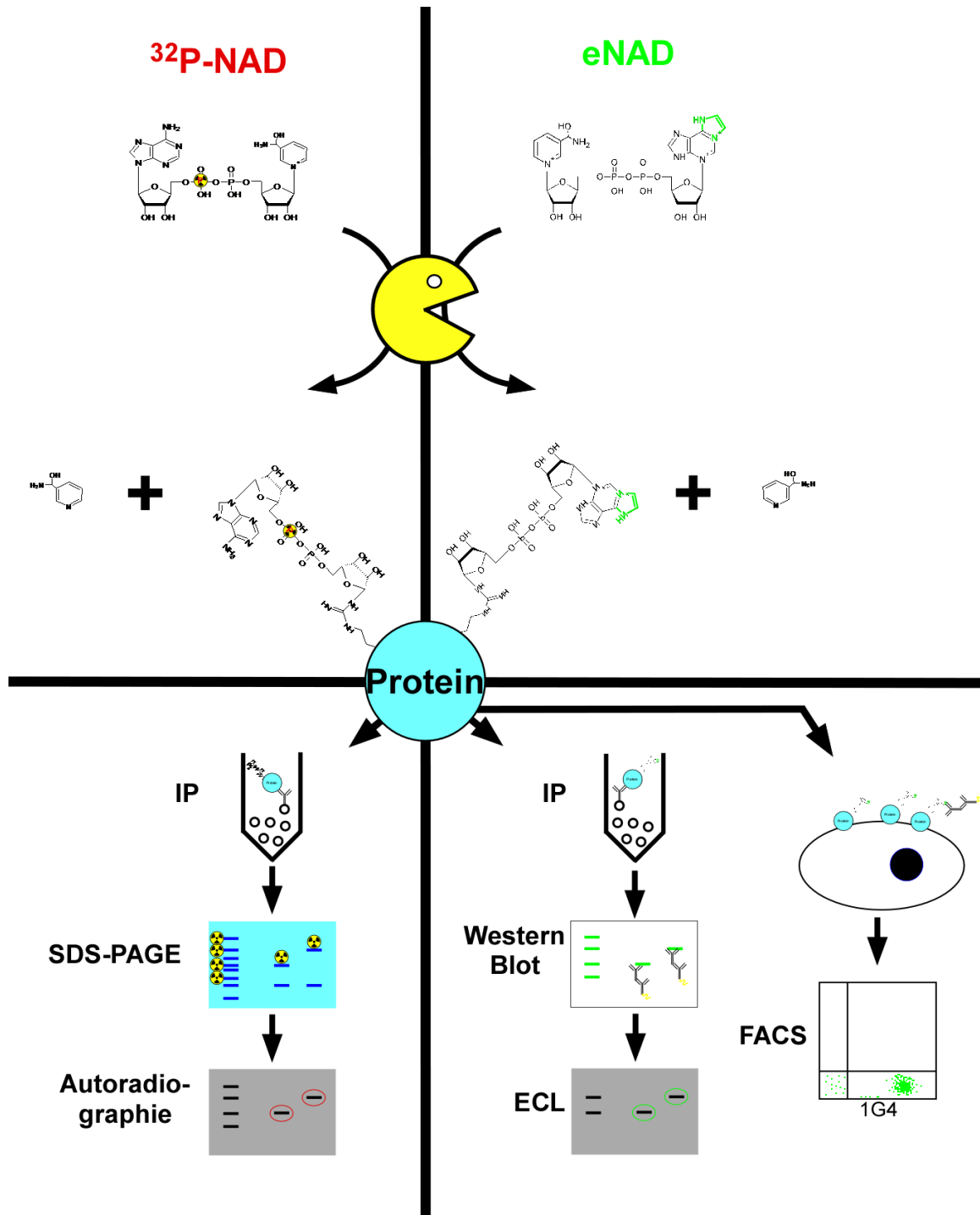


Abb.03 Methoden zum Nachweis der ADP-Ribosylierung: Zum Nachweis der ADP-Ribosylierung von Proteinen kann das physikalisch veränderte radioaktive ^{32}P -NAD oder das chemisch veränderte eNAD genutzt werden. Das zu untersuchende Protein wird nach ADP-Ribosylierung immunpräzipitiert (IP) und in einer SDS-PAGE größenfraktioniert. ^{32}P -NAD kann mittels Autoradiographie detektiert werden (links). Nach Western-Blotting auf eine Membran kann eADP-ribosyliertes Protein mit dem 1G4-Antikörper durch eine ECL-Reaktion nachgewiesen werden (Mitte rechts). Alternativ können Zellen mittels 1G4-Antikörper angefärbt und im FACS gemessen werden (rechts).

1.3 CD25 – Die α -Kette des heterotrimeren Interleukin-2-Rezeptors

CD25 ist die alpha-Untereinheit (IL-2R α) des heterotrimeren Interleukin-2 (IL-2)-Rezeptorkomplexes. Dieser besteht aus einer Alpha- (CD25), einer Beta- (CD122) und Gamma- (CD132) Untereinheit. CD25 ist ein etwa 50kDa großes Protein, welches in der Maus aus 247 Aminosäuren (AS) besteht und vor allem auf aktivierten und regulatorischen T-Zellen vorkommt. Es besteht aus zwei extrazellulären, strangvertauschten Domänen, Sushi I (DI, von AS 1-68) und Sushi II (DII, von AS 98-161), welche miteinander verzahnt sind. Die IL-2-Bindung wird dabei über die Domäne DI vermittelt. CD25 selbst hat eine sehr kleine zytosolische Domäne (AS 236-247), die nicht direkt die Signaltransduktion ins Zellinnere vermittelt (Wang & Smith 1987). Die 3D-Kristallstruktur zeigt, dass CD25 ähnlich einem „L“ geformt ist (Rickert et al. 2005). Dabei bestimmt CD25 maßgeblich die Spezifität der Signaltransduktion, da die beiden Rezeptoruntereinheiten CD122 und CD132 eine niedrige Affinität zu IL-2 besitzen. Die hohe Affinität wird allein durch den trimeren Rezeptorkomplex mit CD25 gewährleistet (Gaffen 2001; Rickert et al. 2005). Im Gegensatz zur IL-2-Bindung erfolgt die Signaltransduktion über die CD122- und CD132-Untereinheiten (Nakamura et al. 1994). Sowohl CD122 als auch CD132 sind bei der Signaltransduktion anderer Zytokine wirksam: CD122 und CD132 bei IL-15, CD132 bei IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21. Bei der Aktivierung des IL-2-Rezeptorkomplexes werden mehrere Signalkaskaden aktiviert. Einer der bekannten Wege ist die Aktivierung der Januskinasen JAK1 und JAK3, zweier Tyrosinkinase, welche die CD122-Kette phosphorylieren und zu einer Rekrutierung des Transkriptionsfaktors STAT5 führt. Dieser wird anschließend selbst phosphoryliert, homodimerisiert und transloziert in den Zellkern, um dort als Transkriptionsfaktor zu wirken (Liu et al. 1998). Die STAT5-Phosphorylierung kann mittels eines spezifisch an phospho-STAT5 (pSTAT5) bindenden Antikörpers nachgewiesen werden.

Die IL-2-Signalkaskade ist essentiell für die Expansion und Differenzierung von T-Zellen, insbesondere von Tregs. So neigen CD25-knock-out-Mäuse verstärkt zu hämolytischen Anämien und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Willerford et al. 1995; Letourneau et al. 2009). Diese Autoimmunphänomene sind erklärbar durch einen Mangel an funktionellen Tregs in CD25-ko-Mäusen, welche in Wildtypmäusen immunsuppressiv wirken und die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verhindern (Setoguchi et al. 2005).

1.4 CD229 – Ein homophiles Interaktionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie

Das Zelloberflächenprotein CD229 wurde 1979 erstmalig als Antigen T100 auf Zellen beschrieben (Durda et al. 1979). In der Maus existieren zwei Unterformen von CD229, genannt CD229.1 (Ly9.1) und CD229.2 (Ly9.2). Die meisten Mausstämme wie BALB/c, exprimieren CD229.1. CD229.2 kommt in C57/Bl6-Mäusen vor (Hogarth et al. 1980). CD229 konnte bisher insbesondere auf Lymphozyten und Makrophagen nachgewiesen werden.

CD229 ist ein etwa 100kDa großes Mitglied der CD150-Unterfamilie (Signaling Lymphocyte Activation Molecule: SLAM) (Tovar et al. 2002), welche zur Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) gehört. Sie besitzen ähnlich wie Antikörper globuläre Domänen, welche aus zwei wie in einem „sandwich“ angeordnete β -Faltblättern bestehen, die mittels einer Disulfidbrücke stabilisiert werden (Williams & Barclay 1988). Die β -Faltblätter bestehen aus antiparallel angeordneten β -Strängen. Die Domänen können ihrem Aufbau nach entweder in konstante (C) Domänen oder variable (V) Domänen eingeteilt werden. In Antikörpern vermitteln die C-Domänen Effektorfunktionen. V-Domänen vermitteln in Antikörpern die Bindung an das Antigen. Bei CD229 ähneln die V-Domänen strukturell denen von Antikörpern. Die meisten Mitglieder der CD150-Unterfamilie sind aus zwei Domänen aufgebaut, einer N-terminalen V-Domäne und einer C-terminalen C-Domäne. CD229 bildet hierbei eine Ausnahme: Es besteht aus einer Duplikation dieser Grundstruktur. CD229 enthält vier alternierend angeordnete V- und C-Domänen (V1, C2, V3, C4). Das Mausprotein besteht aus einer mit 46AS langen Signalsequenz und weiteren 646AS. Es hat eine Transmembranregion, gefolgt von einem 180AS langen zytosolischen C-Terminus. Der zytosolische Anteil enthält mehrere Proteinbindungsstellen, unter anderem zwei tyrosinbasierte Motive (Sequenz: T-I/V-Y-X-X-I/V). Das Protein „SLAM Associated Protein“ (SAP, SH2D1A) kann über dieses Motiv intrazellulär an CD229 binden (Sayos et al. 1998; Sayos et al. 2001). Mutationen in SAP führen zu der Erkrankung „X-linked lymphoproliferative disease (XLP)“. Beim XLP ist der Organismus nicht in der Lage, eine Epstein-Barr-Virus-Infektion adäquat zu bekämpfen. Es kommt zu einer unkontrollierten Expansion von CD8⁺ T-Zellen (Czar & Schwartzberg 2001; Morra, Howie, et al. 2001; Nichols et al. 2005; Hare et al. 2006). Symptome der Erkrankung sind eine fulminante Hepatitis, eine Hypogammaglobulinämie, maligne Lymphome, eine aplastische Anämie und die pulmonale lymphoide Granulomatose mit Vaskulitis (Seemayer et al. 1995). Weitere intrazellulär an CD229 bindende Proteine sind EAT-2

(Morra, Lu, et al. 2001) sowie Grb2, welches einen Einfluss auf die T-Zell-Rezeptorsignalkaskade hat (Martin et al. 2005) und AP-2, welches bei der Endozytose von CD229 eine Rolle spielt (Valle et al. 2003).

CD229 ist ein homophiles Interaktionsmolekül. Es kann mit einem zweiten CD229-Protein auf einer benachbarten Zelle interagieren. CD229 wird hierbei in die Peripherie der immunologischen Synapse rekrutiert (Romero et al. 2005). Bei CD229-ko- Mäusen konnte gezeigt werden, dass Th2-Zellen nach Stimulation mit einer abgeschwächten IL-4-Produktion reagieren (Graham et al. 2006). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Mutationen im Gen für CD229 mit der Erkrankung Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) in Verbindung stehen könnten (Cunningham Graham et al. 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CD229 in der „B-Zell chronisch lymphatischen Leukämie“ (B-CLL) überexprimiert wird (Bund et al. 2006). Auch in der Diagnostik und Therapie des Multiplen Myeloms ist das Protein von Bedeutung (Panse et al. 2011).

Aufgrund der oben genannten klinischen immunologischen Szenarien ist die weitere Erforschung der Funktion und insbesondere der Regulation von CD229 von Interesse.

2 Zielsetzung und Fragestellung

Übergeordnetes Ziel dieser Dissertation war es, die funktionellen Auswirkungen der ADP-Ribosylierung von Zielproteinen der ART2 auf T-Zellen besser zu verstehen. ART2 katalysiert eine posttranslationale kovalente Modifikation von Membranproteinen durch die Übertragung der ADP-Ribose-Gruppe von NAD auf Argininreste unter Freisetzung von Nicotinamid. Zwei bekannte ART2-Zielproteine sind die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) und das homophile Interaktionsmolekül CD229.

Hauptziel dieser Arbeit war die Identifikation der Zielarginine der ADP-Ribosylierung von CD229. Hierfür wurden durch zielgerichtete Mutagenese CD229-Mutanten erstellt, bei denen sequenziell Argininreste durch Lysinreste ausgetauscht wurden, da Lysin nicht durch die ART2 ADP-ribosyliert werden kann. Die Untersuchung der Mutanten wurde mit Hilfe von radioaktiv markiertem NAD durchgeführt.

Ferner war es Ziel, T-Lymphomzelllinien, T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen hinsichtlich der Expression von ART2-Zielproteinen, insbesondere CD25 und CD229, zu charakterisieren.

Darüber hinaus sollte ermittelt werden, welchen Einfluss die ADP-Ribosylierung auf die Funktion von CD25 hat. CD25 spielt eine bedeutende Rolle in der klonalen Expansion von T-Zellen. Die Bindung von IL-2 an den heterotrimeren IL-2-Rezeptor (CD25, CD122 und CD132) löst eine Signalkaskade aus, bei der intrazelluläres STAT5 phosphoryliert wird, welches zur Proliferation der Zellen beiträgt. Der Einfluss von extrazellulärem NAD und der damit verbundenen ADP-Ribosylierung von CD25 auf die o.g. Signalkaskade wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Abschließend sollten molekulare Werkzeuge entwickelt werden, um die ADP-Ribosylierung von CD229 untersuchen zu können. CD229 interagiert homophil im Rahmen der Ausbildung der immunologischen Synapse bei der Antigenpräsentation durch Immunzellen. Um den Einfluss der ADP-Ribosylierung auf die homophile Interaktion untersuchen zu können, sollten CD229-Fc-Fusionsproteine generiert werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Laborgeräte

Gerät	Firma
Digitalkamera DP500	Olympus (Hamburg)
Entwicklungsmaschine Fuji FPM 100A	Fuji Photo Film (Düsseldorf)
FACSCalibur	Becton Dickinson, (Heidelberg)
Gelelektrophorese Modell 40-0708	PeqLab (Erlangen)
Gelelektrophorese XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen (Karlsruhe)
Geldokumentation Edas290 & Kamera DC290	Kodak (Stuttgart)
Geldokumentation INFINITY	PeqLab (Erlangen)
Glasgefäße Flaschen, Kolben, e.t.c.	Schott (Mainz)
Heizblock Thermomixer kompakt	Eppendorf (Hamburg)
High Voltage Power Pack P30	Biometra, Göttingen
Inkubator B6060	Heraeus (Hanau)
Inkubator Incubat	Melag (Berlin)
Kontaminationsmonitor Contamat FHT 111 M	Eberline (Erlangen)
Kühltruhe (-80°C) HFC 586 Basic	Heraeus (Hanau)
Magnetrührer RCT S 26	Omnilab (Bremen)
Mikropipetten Typ „Research“	Eppendorf (Hamburg)
Mikrowelle M 637 EC	Miele (Gütersloh)
Mikroskop Axiovert S100	Zeiss (Jena)
PCR-Maschinen TGradient	Whatman Biometra (Göttingen)
Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Photometer SmartSpec 3000	BioRad (München)
Stickstofftank K-Serie	Taylor-Wharton (Husum)
T3000 Thermocycler	Whatman Biometra (Göttingen)
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Transiluminatortisch Typ TI 1	Whatman Biometra (Göttingen)
Ultrazentrifuge, SW40-Rotor	Beckman-Coulter (Krefeld)
Zählkammer, Neubauer Improved	LaborOptik (Friedrichsdorf)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Amersham Hyperfilm, MP	GE Healthcare (München)
Blott-Karton GB 003	Schleicher & Schuell (Dassel)
Combitips	Eppendorf (Hamburg)

Diafiltrationseinheit Vivaspin20 MWCO 10000	Satorius (Göttingen)
Einwegspritzen	Braun (Melsungen)
Erlenmeyerkolben 250 ml	PP Corning, Inc. (USA)
Filme Hyperfilm ECL	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Biomax X-ray film MR; MS	Kodak (Stuttgart)
Filtrationseinheit Steriflip, Stericup	Millipore (USA)
Handschuhe Safeskin	Kimberly-Clark (Koblenz)
Kanülen	Braun (Melsungen)
Kryoröhrchen 1 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Kulturschalen	Greiner (Solingen)
Mikrotiterplatten 96 well V-Boden	Greiner (Solingen)
Nitrocellulosemembran Hybond-C, 0.45 µm	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Parafilm	Pechiney Plastic Pack. (USA)
Polyacrylamid-Gele NuPAGE precast Gele	Invitrogen (Großbritannien)
Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF)	Boehringer Ingelheim (Ingelheim)
Pipettenspitzen verschiedene Größen	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen verschiedene Größen	Eppendorf (Hamburg)
Reagiergefäße 0.2 ml / 1.5 ml / 2.0 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäße 0.2 ml / 1.5 ml / 2.0 ml	Eppendorf (Hamburg)
Röhre (PP) 15 ml, 50 ml Falcon/	BD Biosciences (Heidelberg)
StrataClean resin	Stratagene (USA)
Transformations-Tube round-bottom PP	BD Biosciences (Heidelberg)
Zellkulturflasche, Hyperflask	Corning (USA)
Zellkulturflasche, T-25 Flask	Nunc (Langenselbold)
Zellkulturflasche, T-75 Flask	Nunc (Langenselbold)
Zellkulturschale, 60x15	Nunc (Langenselbold)
Zellkulturschale, 100x15	Nunc (Langenselbold)
Zellsiebe Nitex Membran (70µm Maschenweite)	Cadisch Prec. Meshes Ltd.(UK)
Cellstrainer	Becton Dickinson (Heidelberg)

3.1.3 Chemikalien

Chemikalien	Firma
Adenosin-Diphosphat-Ribose (ADP-R)	Sigma-Aldrich (München)
4-(2-Aminoethyl)-benzonsulfonylfluorid (AEBSF)	MP Biomedicals (USA)
Bovines Serum Albumin (BSA)	England Biolabs (Schwalbach)
Carbenicillin	Serva (Heidelberg)
DNA Typing Grade Agarose	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Desoxy Nucleotid-Tri-Phosphate (dNTPs)	Amersham Pharm. Biotech (Freiburg)
ECL Western blotting detection reagent	Merck (Darmstadt)
EDTA	Fermentas GmbH (St.Leon-Rot)
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	

Geneticin (G418) Milchpulver NAD Natronlauge Novex Sharp Prestained Protein Standard Propidiumjodid Tx100 ³² P-NAD, 1 kCi/mmol, 10mCi/ml, 1mCi ³² P-NAD, 800 Ci/mmol, 5mCi/ml, 1mCi	Gibco Invitrogen (Karlsruhe) Roth (Karlsruhe) Sigma-Aldrich (München) Merck (Darmstadt) Invitrogen (Niederlande) Pharmingen (Hamburg) Serva (Heidelberg) Amersham Pharm. Biotech (Freiburg) Perkin Elmer (USA)
--	--

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

3.1.4 Medien

3.1.4.1 Bakterienkulturmedien

Medium	Firma
LB-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
LB Carbenicillin-Medium: LB-Medium 100 µg/ml Carbenicillin	Invitrogen (Karlsruhe) Serva (Heidelberg)
LB-Agar	Invitrogen (Karlsruhe)
LB Carbenicillin-Agar: LB-Agar 100 µg/ml Carbenicillin	Invitrogen (Karlsruhe) Serva (Heidelberg)

3.1.4.2 Zellkulturmedien

Medium	Firma
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) pH7,4: 0,90mM CaCl ₂ 2,67mM KCl 1,47mM KH ₂ PO ₄ 0,49mM MgCl ₂ 137,93mM NaCl 8,06mM Na ₂ HPO ₄	Invitrogen (Niederlande)
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) DMEM-komplett: 10% FCS 2mM L-Glutamin 10mM HEPES-Puffer 1mM NaPyruvat NEAA	Invitrogen (Niederlande)
Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI):	Invitrogen (Niederlande)

RPMI-komplett:
 10% FCS
 2mM L-Glutamin
 1mM NaPyruvat
 Ggf. 50U/ml IL-2

3.1.5 Lösungen, Puffer, Säulen und Kits

Lösung, Puffer und Kits	Firma
Anti-FLAG M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Antikörperpuffer, Westernblott: TBS 0,05 % Tween-20 10% Ziegenserum	
BigDyeTerminator: ddNTP dNTP Puffer Taq Polymerase	AppliedBiosystems (USA)
Blockpuffer, Westernblott: TBS 10% Ziegenserum	
Blotpuffer, Westernblott: 0,1% Antioxidans 10% Methanol Transferpuffer	
Coloidal Blue Staining Kit	Invitrogen (Niederlande)
Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG1	Dynal (Hamburg)
Elutionspuffer pH 2.7, Säulenchromatographie: 0,1M Glycin	Merck (Darmstadt)
Endofree Plasmid-Preparation Maxiprep Kit	Qiagen (Hilden)
Endofree Plasmid-Preparation Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom (Berlin)
Gel Dry Drying Solution	Invitrogen (Karlsruhe)
Gelextraktion QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Goat anti-Rat IgG1 Agarose	Sigma-Aldrich (Hamburg)
HEPES-Puffer 1M	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Interleukin-2 (IL-2)	Roche (Grenzach-Wyhlen)
jetPEI Transfektionsreagenz	Polyplus (USA)
Ladepuffer, DNA	MBI Fermentas (Leon-Rot)
Laufpuffer MES, SDS-PAGE: 1mM EDTA 50mM 2-(N-morpholino)-ethansulfonat (MES) 3,5mM SDS 50mM TRIS-Base	Invitrogen (Karlsruhe)

Laufpuffer MOPS, SDS-PAGE:	Invitrogen (Karlsruhe)
20,5mM EDTA	
69,3mM Natriumdodecylsulfat (SDS)	
1M 3-(N-morpholino)-propansulfonat	
1M TRIS-Base	
L-Glutamin 200mM	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
LDS-Ladepuffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Loading Dye, 10x, Agarosegelelektrophorese:	
Glycerol 50%	OMNI Lifescience (Bremen)
TAE, 20x 50%	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Orange G 1Sptl. Sp.	Merck (Darmstadt)
Lysepuffer, Zellyse, SDS-PAGE:	
1mM AEBSF	MP Biomedicals (USA)
2mM EDTA pH8	
1mM NAD	
PBS	Invitrogen (Niederlande)
1% TritonX100	
M2-Agarose, Anti-FLAG from mouse	Sigma-Aldrich (Hamburg)
NaPyruvat 100mM	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Neutralisationspuffer, pH 9, Säulenchromatogr.:	
TrisHCl	Merck (Darmstadt)
Nicht Essenzielle Aminosäuren (NEAA) 100x	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen (Niederlande)
NuPAGE LDS sample buffer	Invitrogen (Niederlande)
NuPAGE MES running buffer	Invitrogen (Niederlande)
NuPAGE MOPS running buffer	Invitrogen (Niederlande)
NuPAGE sample reducing agent	Invitrogen (Niederlande)
NuPAGE SDS PAGE transfer buffer	Invitrogen (Niederlande)
PD-10 Columns	GE Healthcare (München)
Protein A Sepharose	Invitrogen (Karlsruhe)
Protein G Sepharose	Invitrogen (Karlsruhe)
Sequenzierreaktion BigDye Cycle Sequencing Kit	AppliedBiosystems (USA)
Silberlösung, Westernblott:	
0,2% AgNO ₃	
Destilliertes Wasser	
0,8% Fe ₂ SO ₄	
2% NaCitrat	
TAE-Puffer, 20x	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
TBS:	
Destilliertes Wasser	
0,15M NaCl	
0,025M Tris-HCl pH7,4	
Transferpuffer, 20x, Westernblott:	Invitrogen (Niederlande)
0,5M Bicin	
0,5M BIS-TRIS	
1mM Chlorbutanol	
29,5mM EDTA	
Trypsin-like enzyme (TrypLE)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)

Waschpuffer 1, SDS-PAGE: 1mM ADP-Ribose PBS Waschpuffer 2, SDS-PAGE: 1mM ADP-Ribose PBS 1% TritonX100 Waschpuffer, Westernblott: TBS 0,05 % Tween-20 Ziegenserum	Sigma-Aldrich (München) Invitrogen (Niederlande) Sigma-Aldrich (München) Invitrogen (Niederlande) Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
---	--

3.1.6 Enzyme

Enzyme (Aktivität)	Firma
BglIII (10kU/ml)	New England Biolabs (Frankfurt)
DpnI (20kU/ml)	New England Biolabs (Frankfurt)
HindIII (20kU/ml)	New England Biolabs (Frankfurt)
KOD Hot Start DNA-Polymerase	Novagen-Merck (Darmstadt)
NotI (10kU/ml)	New England Biolabs (Frankfurt)
PFU-Turbo DNA-Polymerase	Stratagene (Niederlande)
T4 Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)
XhoI (20kU/ml)	New England Biolabs (Frankfurt)

3.1.7 Vektoren

Vektor (größe)	Firma
pBS (3,2kb)	Stratagene (Niederlande)
pCMV SPORT6 (4,4kb)	Invitrogen (Niederlande)
pME (3,4kb)	DNAX Research Institute (USA)

3.1.8 Primer

Primer Name/Mutation	Sequenz (5'-3')
M13f	TGTA AACGACGGCCAGT
M13r	CAGGAAACAGCTATGAC
msLy9BgIII f	GAGCCagatctAAGGAAACACCTCCAACAG
msLy9V1C2XhoI r	TCTGGActcgagTGTGCAGAATTGCCAGAT
msLy9V1C2HindIII r	TCTGGAAaGCTttTGTGCAGAATTGCCAGAT
msLy9V1-C4XhoI r	GCAGGAGCtcgAgCCTCTTGTTCCTCTCAGG
msLy9V1-C4HindIII r	GCAGGAaagctttCCTCTTGTTCCTCTCAGG

msCD229R59Kf	CAAAGGATATAATGGC AA ACTCAAAGTCAGCGAAG
msCD229R59Kr	CTTCGCTGACTTTGAGTTTGCCATTATATCCTTTG
msCD229R146Kf	CAGTACAGCTGGACCA AA GAGGACACCC
msCD229R146Kr	GTATTTAAATGGGTGTCCTC TTT GGTCCAGCTG
msCD229R161Kf	GGAAGCCACACCCT CA AGGTTTCCCAGAGTGTC
msCD229R161Kr	GACACTCTGGGAAAC CTT GAGGGTGTGGCTTCC
msCD229R190Kf	CAGCTCCCAACCTGT CAA AATCTGGCAATTCTGC
msCD229R190Kr	GCAGAATTGCCAGATTTTGACAGGTTGGGAGCTG
msCD229R227Kf	GAATTTCCGGGCCACT AAG GCCACAAAGAATGTTG
msCD229R227Kr	CAACATTCTTTGTGGC CTT AGTGGCCCGAAATTC
msCD229RR200KKf	CTGCACAGGAGCCTCC AAG AAAAAACAGCAGCGGGG
msCD229RR200KKr	CCCCGCTGCTGTTTTTT CTT GGAGGCTCCTGTGCAG
msCD229R224Kf	CTGCCCTTGAATTT AAG GCCACTCGGGCCAC
msCD229R224Kr	GTGGCCCGAGTGGC CTT AAATCCAAGGGCAG
msCD229RR245KKf	CGGTTATCAGCCAAGAAA AG AAAGGAGCAGCAACAGCG
msCD229RR245KKr	CGCTGTTGCTGCTC TTTCTTTTCTT GGCTGATAACCG
msCD229RR254KKf	GCAGCAACAGCGGATTCT AAGAAG AAGCCCAAAGGTTCTGAA
msCD229RR254KKr	CTTCAGAACCCTTTGGGCTT CTTCTT AGAATCCGCTGTTGCTGC
msCD229RR263KKf	CCAAAGGTTCTGAAGAAA AG AAGGTGAGGACCTCTGACCAG
msCD229RR263KKr	CTGGTCAGAGGTCTCAC CTTCTTTTCTT CAGAACCCTTTGG
msCD229R266Kf	GAAGAAAGGAGGGT GAAG ACCTCTGACCAGGAC
msCD229R266Kr	GTCCTGGTCAGAGGT CTT CACCCTCCTTTCTTC
msCD229R297Kf	GCTCAGAGGCCTCC AA AGACCCAGTGTGAG
msCD229R297Kr	CTCACACTGGGGT CTTT GGAGGCCTCTGAGC
msCD229R302Kf	CGAGACCCAGTGT GA AACATTTACCTTGC
msCD229R302Kr	GCAAGGTGAAATG TTT CACACTGGGGTCTCG
msCD229R311Kf	GCTTGTCTACAAG AA ACTGGAGAAGCCCAG
msCD229R311Kr	CTGGGCTTCTCCAG TTTCTT GTAGACAAGC
msCD229R403Kf	GTTCAGGCCCTGAG AAA ACAAGAGGTTTTG
msCD229R403Kr	CAAACCTCTTGTTTT CT CAGGGCCTGAAC
msCD229R406Kf	CCTGAGAGAAACAAG AAG TTTTGGCTCCTGCTC
msCD229R406Kr	GAGCAGGAGCCAAA CTTCTT GTTTCTCTCAGG

Um Restriktionsschnittstellen einzufügen, wurden einzelne Basen ausgetauscht. Diese wurden durch Kleinbuchstaben markiert. Das jeweils für ein Lysin kodierende Triplet in den Mutageneseprimern wurde fett markiert. Alle Primer wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen.

3.1.9 Antikörper

Antigen	Aus	Anti	Konjugat	Klon	Firma
ART1	Ratte	Human	-	R19B82	Inst. f. Immunologie (Hamburg)

ART1	Ratte	Human	Alexa488	RG3	Inst. f. Immunologie (Hamburg)
ART1	Ratte	Human	Alexa488	R19 A3	Inst. f. Immunologie (Hamburg)
ART2	Ratte	Maus	-	R8A102	The Jackson Laboratory (USA)
ART2	Ratte	Maus	Überstand	R8A102	Inst. f. Immunologie (Hamburg)
ART2	Ratte	Maus	FITC	R8A102	The Jackson Laboratory (USA)
ART2	Ratte	Maus	P649	R8A106	Inst. f. Immunologie (Hamburg)
ART2	Ratte	Maus	FITC	R8A102	Inst. f. Immunologie (Hamburg)
CD4	Ratte	Maus	Fl450	RM4-5	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD11a	Ratte	Maus	RPE	Klon 2D7	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD11a	Maus	Human	PE	HI111	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD25	Ratte	Maus	-	PC61	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD25	Ratte	Maus	Überstand	PC61	Inst. f. Immunologie (Hamburg)
CD25	Ratte	Maus	APC	PC61	NatuTec (Frankfurt a. M.)
CD25	Maus	Human	PE	B1.49.9	Beckman Coulter (Krefeld)
CD25	Maus	Human	-	M-A251	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD25	Ratte	Human	APC	M-A251	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD38	Ratte	Maus	FITC	Klon 90	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD38	Ratte	Maus	B585	Klon 90	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD229	Hamster	Maus	-	Ly9.ab3	Immunological Dpt. (Barcelona)
CD229.1	Ratte	Maus	FITC	30CO7	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD229	Ratte	Maus	A647	RG46A27	Inst. f. Immunologie (Hamburg)
CD229	Maus	Human	Überstand	HLy9.1.84	Immunological Dpt. (Barcelona)
CD229	Maus	Human	-	HLy9.1.84	Immunological Dpt. (Barcelona)
CD229	Maus	Human	-	HLy9.1.25	Immunological Dpt. (Barcelona)
eNAD	Maus	-	-	1G4	Inst. f. Immunologie (Hamburg)
eNAD	Maus	-	Alexa488	1G4	Inst. f. Immunologie (Hamburg)
IgG (H+L)	Ratte	Maus	FITC	-	Dianova (Hamburg)
IgG (H+L)	Esel	Maus	PE	-	Dianova (Hamburg)
IgG (H+L)	Ziege	Maus	Peroxidase	-	-
IgG (H+L)	Esel	Ratte	FITC	-	Dianova (Hamburg)
IgG (H+L)	Esel	Ratte	PE	-	Dianova (Hamburg)
IgG (H+L)	Kaninchen	Hamster	FITC	-	Dianova (Hamburg)
IgG (H+L)	Esel	Kaninchen	PE	-	Dianova (Hamburg)

P2X7	Kaninchen	Maus	-	K1G	Inst. f. Immunologie (Hamburg)
P2X7	Kaninchen	Human	Überstand	L4	Inst. f. Immunologie (Hamburg)
P2X7	Kaninchen	Maus	A647	RH23A44	Inst. f. Immunologie (Hamburg)
P2X7	Maus	Human	Alexa488	L4	Inst. f. Immunologie (Hamburg)
STAT5-P	Maus	Human	Alexa647	47	BD Pharmingen (Heidelberg)

3.1.10 Bakterienstamm

Bakterien	Firma
XL10-Gold Ultrakompetente Zellen	Stratagene (Niederlande)

3.1.11 Zelllinien

Zelllinie	Spezies, Zelltyp
CTLL-2	C57BL/6 Maus, Lymphomzelllinie, CTL, IL-2 abhängig
DC27.10	Maus, Hybridomzelllinie, T-Zellen
EL4	C57BL/6 Maus, Lymphom, Thymus
HEK-293	Human, Embryonale Nierenzelllinie
Yac-1	A/Sn Maus, Lymphomzelllinie, CTL

3.1.12 Mausstamm

Maus	Institut
DEREG/Balb/c	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München

Die Mausstämme wurden in der Tierhaltung des UKE gezüchtet.

3.2 Methoden

3.2.1 Methoden der Zellbiologie

3.2.1.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und unter Wasserdampf gesättigter Atmosphäre kultiviert. Suspensionszellen (EL4, Yac-1 und CTLL-2) wurden in

Zellkulturschalen von 10cm Durchmesser und 10ml Medium oder in 20cm Durchmesser und 20ml RPMI- (complete) Medium kultiviert. Die CTLL-2-Zelllinie benötigte zum Wachstum zudem 5U/ml IL-2. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage im Verhältnis von 1:5 bis 1:20 geteilt. Die festwachsenden HEK-293 Zellen wurden in T25 mit 5ml oder in T75 Zellkulturflaschen mit 10ml DMEM- (complete) Medium kultiviert. Zur Teilung der Zellen wurde das Nährmedium abpipettiert, die Zellen mit PBS (-/-) gewaschen und mit Trypsin für einige Minuten abgelöst. Nach dem Abzentrifugieren (1600rpm, 5min) wurden die Zellen in DMEM resuspendiert und im Verhältnis 1:5 bis 1:20 geteilt. Um HEK 293-Zellen am folgenden Tag transfizieren zu können, wurden ca. 700.000 Zellen in einer T25 Zellkulturflasche ausgesät und über Nacht kultiviert.

Die Zellzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

Für die Herstellung größerer Mengen an rekombinanten Proteinen wurden HEK-293-Zellen in eine 500ml Hochhauskultur überführt.

3.2.1.2 Gewinnung von T-Lymphozyten und Tregs aus Lymphknoten und Milz der Maus

DEREG-Mäuse auf Balb/c Hintergrund wurden im Alter von ca. 8 Wochen mit 70% CO₂ betäubt und anschließend mit 100% CO₂ getötet. Hiernach wurden sowohl die Milzen, als auch die cervicalen, axillären, mesenterialen und inguinalen Lymphknoten freipräpariert und in 35mm Petrischalen in 4° kaltem RPMI suspendiert. Die Lymphknoten und Milzen wurden zwischen Nitex-Membranen zerrieben und die Zellsuspension durch ein Zellsieb gegeben, um die Lymphozyten vom restlichen Bindegewebe zu trennen. Aus der Zellsuspension der Milzen wurden die Erythrozyten mittels vierminütiger Inkubation in Greys-Puffer durch osmotische Lyse entfernt. Die osmotische Lyse wurde mit PBS (-/-) 1% BSA gestoppt und die Zellen in RPMI suspendiert. Die B-Lymphozyten wurden aus der Zellsuspension in zwei Zyklen mittels an magnetische Partikel konjugierten anti-Maus-IgG-Antikörper aus dem Schaf entfernt. Die so aufgereinigten Lymphozyten wurden in einem letzten Schritt im FACS auf die grüne Fluoreszenz der Tregs sortiert, um diese von anderen T-Zellen zu trennen.

Genehmigung für die Organentnahme: ORG 153.

3.2.1.3 Transiente Transfektion von HEK-293-Zellen

Um die gewünschten Proteine auf der Zelloberfläche zu exprimieren, wird die für das Protein codierende DNA in den Zellkern eingebracht und kann anschließend transkribiert werden. Hierfür wurde das JetPEI-Reagenz verwendet. Das Reagenz enthält ein kationisches Molekül, welches die anionische DNA bindet und mit ihr an der Zelloberfläche an anionischen Proteoglykanen adheriert. Die DNA wird daraufhin endozytiert. Nach Lyse der Endosomen transloziert die DNA in den Zellkern.

Die Transfektion wurde jeweils mit 5µg Plasmid-DNA pro 1×10^6 HEK-293-Zellen nach Hersteller-Protokoll (qBiogene) durchgeführt. Bei der Kotransfektion mit ART2 wurden 1µg ART2 Plasmid-DNA und 4µg Zielprotein-Plasmid-DNA (z.B. msCD229) verwendet. Die Zellen wurden 24h nach Transfektion im FACS gemessen.

Das Protein msCD229V1C2-Fc wurde zudem in einer Hochhauskultur produziert. Drei T225-Flaschen mit HEK-293-Zellen wurden mit je 20µg Plasmid-DNA nach JetPEI-Protokoll transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen in eine mehrbödige 500ml Hochhauskulturflasche überführt. Nach pH-shift des Mediums (ca. 5 Tage) wurde das Zielprotein aus dem Überstand aufgereinigt.

3.2.1.4 ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen mittels ³²P-NAD und eNAD

Für die Immunpräzipitation wurden je ca. 10^6 Zellen pro zu immunpräzipitierendem Protein sowie ca. 10^6 Zellen für das Gesamtzelllysate geerntet. Die Zellen wurden - falls nicht anders angegeben - für die Radioaktivversuche mit 2,5µCi ³²P-NAD pro 10^6 Zellen, 0,2µM NAD und 1mM ADP-Ribose in 100µl RPMI für 30min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden fünfmal mit 800µl Waschpuffer 1 gewaschen und jeweils bei 2500rpm für 5min zentrifugiert. Für die Detektion mit eNAD wurden die Zellen mit 2,5µM eNAD pro 10^6 Zellen für 10min bei Raumtemperatur inkubiert, dreimal mit 500µl Waschpuffer 1 gewaschen und jeweils bei 2500rpm für 5min zentrifugiert.

3.2.1.5 Zellyse

Triton X-100 ist ein Detergenz, welches Membranproteine aus der Zellmembran löst, ohne diese zu denaturieren. Die proteolytische Spaltung der zu untersuchenden Proteine wird

durch Zugabe des Serinproteaseinhibitors 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfofluorid (AEBSF) und durch den Ca^{2+} und Mg^{2+} Komplexbildner EDTA gehemmt. Die Spaltung von ^{32}P -NAD durch NAD-Hydrolasen (wie z.B. CD38) sowie die Abspaltung der ADP-Ribose von ADP-ribosylierten Proteinen (z.B. durch ADP-Ribosylhydrolasen oder Phosphodiesterasen) kann durch Zugabe von ADP-Ribose gehemmt werden.

Die zu lysierenden Zellen wurden mit 200 μl Lysepuffer pro Immunpräzipitationsansatz versetzt und für 30min bei 4°C oder für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne bei 3000rpm für 4min pelletiert. Der Überstand wurde bei 13000rpm für 5min zentrifugiert um übrige Zellmembranfragmente zu pelletieren. Das Zellysate wurde anschließend für die Immunpräzipitation und SDS-PAGE verwendet (**Abb. 04**).

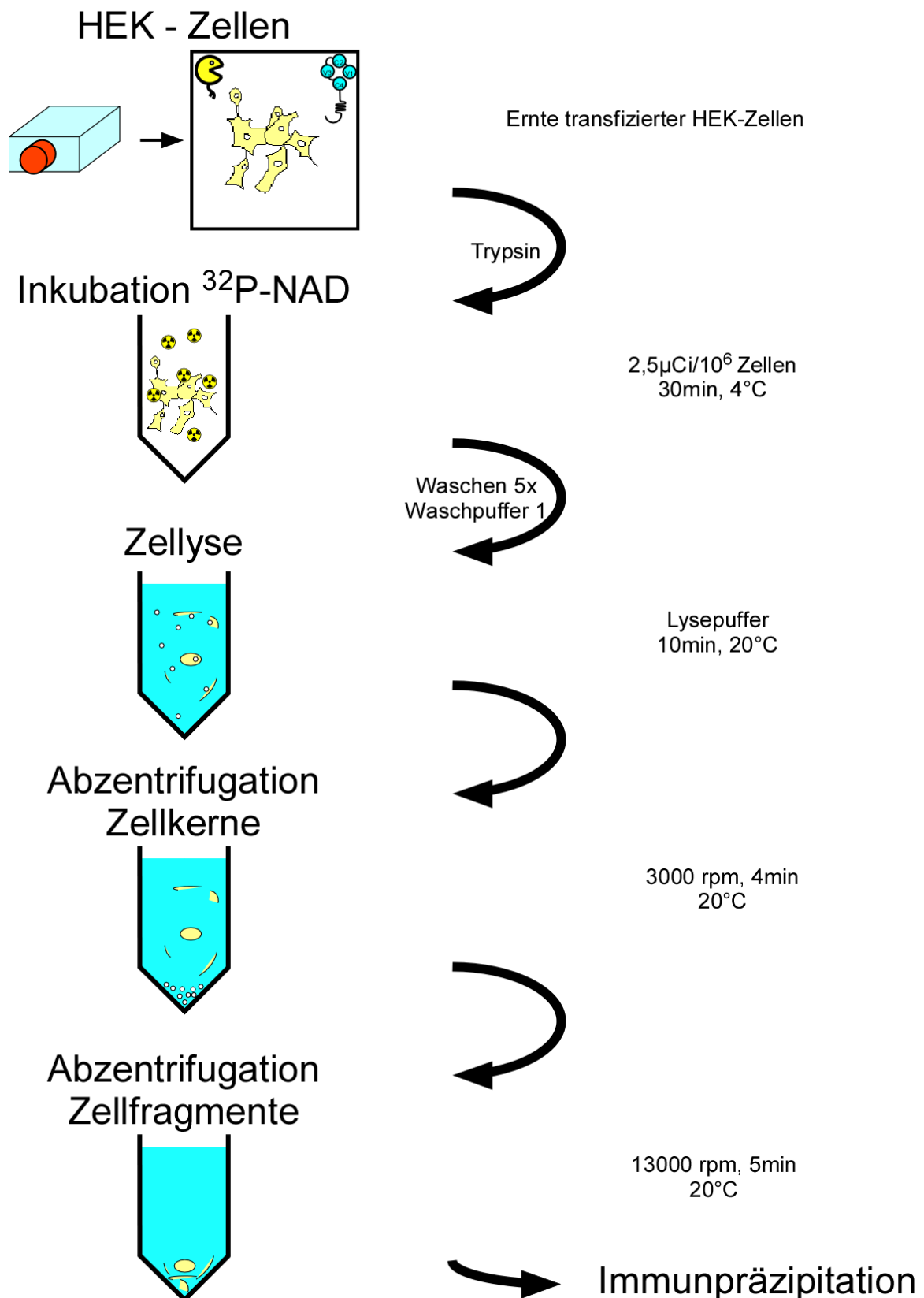


Abb.04 ADP-Ribosylierung mit ^{32}P -NAD: Mit der ART2 und einem Zielprotein transfizierte HEK-Zellen werden mit 2,5 μCi ^{32}P -NAD/ 10^6 Zellen, 1mM ADP-Ribose und 0,4 μM NAD für 30min bei 4°C inkubiert. Nach fünf Waschungen (Waschpuffer) werden die Zellen für 20min bei Raumtemperatur lysiert (Lysepuffer). In zwei weiteren Schritten werden die Zellkerne und die groben Zellfragmente abzentrifugiert. Der Überstand wird für die Immunpräzipitation genutzt.

3.2.2 Methoden der Molekularbiologie

3.2.2.1 PCR-Primer Design

3.2.2.1.1 Mutagenese Primer

Für die zielgerichtete Mutagenese von Arginin zu Lysin in CD229 wurden mehrere im Folgenden aufgeführte Regeln zur Primererstellung berücksichtigt. Es wurden jeweils zwei zueinander komplementäre Primer erstellt. Es wurden ca. 15bp stromauf und ca. 15bp stromab des für das Arginin codierenden Tripletts mit in den Primer einbezogen, sodass die Mutagenese-Primer ca. 33bp lang waren. Zudem wurde darauf geachtet, dass die 5'-Base und die 3'-Base des Primers entweder ein Guanin oder Cytosin war, somit das Annealing am 5'- und 3'-Ende durch 3 Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wurde. Bei der Auswahl des für Lysin codierenden Basentripletts wurde darauf geachtet, dass die Sequenz dem zu mutierenden Arginintriplett möglichst ähnlich war (**Tabelle 01**).

Es wurden in einem Mutagenese-Ansatz 5ng Plasmid-DNA mit dem msCD229-Wildtyp-Protein, je 12,5pmol der beiden Antiparallelen Mutagenese-Primer, 2,5U Pfu Turbo Polymerase, Probenpuffer, 40nmol dNTPs und HPLC Wasser gemischt. Nach der Mutagenese PCR wurde der Ansatz mit 20U DpnI für eine Stunde bei 37°C verdaut.

Tabelle 01

Codon (Arginin)	Korrespondierendes Codon (Lysin)
AGA	AAA
AGG	AAG
CGA	AAA
CGC	AAA
CGG	AAG

3.2.2.1.2 Amplifikations-Primer

Um Fusionsproteine mit entweder vier oder nur zwei N-terminalen extrazellulären Domänen von msCD229 und dem Fc-Teil von msIgG1 Antikörpern zu erstellen, wurden Primer mit den passenden Restriktionsschnittstellen entworfen. Die Primer überlappten mit

der zu amplifizierenden Sequenz. Die 5'-Primer wurden mit einer BglII Schnittstelle, die 3'-Primer mit einer XhoI Schnittstelle erstellt.

3.2.2.1.3 Sequenzierungs-Primer

Mit einer Sequenzierungs-PCR konnte man je ca. 500bp in eine Richtung sequenzieren. Um die Sequenz der Mutanten von msCD229 zu prüfen, wurden jeweils die Mutagenese-Primer verwendet, welche nahe dem gewünschten zu untersuchenden Motiv mit der Plasmid-DNA annealen. Um die 5'- und 3'-Enden zu sequenzieren, wurden jeweils zu dem entsprechenden Vektor passende Vektorprimer verwendet (pCMVSPORT6 für das 5'-Ende M13r und das 3'-Ende M13f).

3.2.2.2 Plasmidvervielfältigung

3.2.2.2.1 Transformation von E.coli

Für die Plasmidvervielfältigung wurden XL10-Gold ultrakompetente E.coli-Zellen (Stratagene) verwendet. Die Bakterien wurden mit 5ng Plasmid-DNA versetzt. Durch einen Hitzeschock für 30s bei 42°C wurde die Aufnahme des Plasmids initiiert. Die erfolgreich transformierten Bakterien konnten mittels eines Antibiotikums selektioniert werden, da die Plasmid-DNA zudem für eine Antibiotikaresistenz kodiert. Es wurde das Transformationsprotokoll vom Hersteller (Stratagene) verwendet.

3.2.2.2.2 Plasmid-DNA-Aufreinigung aus E. coli

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterien beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Sowohl die chromosomale DNA, als auch die Plasmid-DNA denaturieren im alkalischen pH-Bereich. Im Gegensatz zur chromosomalen DNA kann die Plasmid-DNA wieder renaturieren, die chromosomale DNA verklumpt und wird abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA kann anschließend an einer Silica-Matrix gebunden aus dem Lysat herauseluiert und gewaschen werden. Die Plasmid-DNA-Gewinnung wurde mit QIAprep-Kits nach Herstellerprotokoll (Qiagen) durchgeführt. Die Plasmid-DNA-Konzentration wurde mit einer 1/50-Verdünnung im Photometer bei 260nm bestimmt.

3.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Um die Produkte eines Restriktionsverdauens aufzureinigen oder um den Erfolg einer Klonierung zu bewerten, kann die DNA der Größe nach im Agarosegel aufgetrennt werden. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert mit der Doppelstrang-DNA und lässt sich mit UV-Licht nachweisen. Die Agarose 1% in TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) wurde mit 0,1µg Ethidiumbromid versetzt und zu einem Gel gegossen. Die Proben wurden mit 10x Loading-Dye versetzt. Auf die Gele wurden bis zu 50µl Proben/Loading-Dye-Gemisch und 5µl Generuler 1kb DNA Ladder als Marker aufgetragen. Die Gele liefen bei einer Spannung von 50V oder 100V(5V/cm). Anschließend wurden die benötigten Banden ausgeschnitten.

3.2.2.4 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die aufzureinigende DNA wurde unter UV-Bestrahlung mit einem Spatel aus dem Agarosegel ausgestochen. Die DNA wurde mit dem Gel-Extraction-Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

3.2.2.5 Restriktionsverdau von DNA

Plasmid-DNA und DNA-Fragmente wurden mit 10U/µgDNA Restriktionsendonuklease und dem für den Einzel- oder Doppelverdau empfohlenen Puffer (New England Biolabs) für 2h bei 37°C im Inkubator verdaut.

3.2.2.6 Ligation von DNA

Um zwei DNA-Fragmente miteinander zu verbinden, wurde das Enzym T4-DNA-Ligase (Invitrogen) verwendet. Die Ligation erfolgte nach Protokoll in einem molaren Verhältnis von 1:2 (Plasmid:Insert). Die dafür benötigten Mengen von Plasmidbackbone und Insert wurden mit dem Internettool „BioMath Calculator“ (<http://www.promega.com/biomath/default.htm>) berechnet.

3.2.2.7 Polymerase Kettenreaktionen (PCR)

3.2.2.7.1 Sequenzierung mittels PCR

Die DNA-Sequenzierung nutzt das Prinzip, dass DNA-Polymerasen Nukleotidketten nur am 3'OH verlängern können. Wird der Polymerase ein Didesoxynukleotidtriphosphat (ddNTP) (ohne 3'OH) angeboten, wird dieses eingebaut und es kommt dadurch zu einem Kettenabbruch. Somit entstehen Nukleotidketten definierter Länge, welche mittels Elektrophorese aufgetrennt werden können. Werden die vier verschiedenen ddNTP mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, kann man nach Auftrennung mit einem Photodetektor die zuletzt eingebauten Nukleotide erkennen und so auf die Sequenz schließen. Die Sequenzierprogrammabfolge und der Sequenzieransatz wurden wie in den Tabellen angegeben pipettiert (**Tabelle 02**) bzw. durchgeführt (Applied Biosystems; **Tabelle 03**). Anschließend erfolgte eine fraktionierte Fällung mit 100% und 70% Ethanol. Die DNA-Sequenzierung wurde in Auftrag gegeben (UKE Diagnostikzentrum). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SeqMan der Firma DNASTar (Konstanz).

Tabelle 02

Stoff	Menge (insg. 20µl)
BigDye	4µl
DNA	2µl (0,5-4µg)
Primer	2µl (200pmol)
Wasser (Ultrareines)	12µl

Tabelle 03

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min',sec'')	Zyklen
1	96	40''	
2	50	15''	
3	60	4'	28x(Schritt 1-4)
4	4	∞	

3.2.2.7.2 Mutagenese PCR

Für die Herstellung der msCD229 R- (Arginin) zu K- (Lysin) Mutanten wurden jeweils spezifische Mutagenese-Primer benötigt, deren Produktion in Auftrag gegeben wurde (MWG). Die PCR-Programmabfolge und die PCR-Ansätze wurden, wie in den Tabellen angegeben, pipettiert (**Tabelle 04**) und durchgeführt (**Tabelle 05**). Die in Bakterien vervielfachte und damit vorbestehend methylierte Wildtyp-Plasmid-DNA wurde in dem jeweiligen Ansatz für 1h bei 37°C mit 20U des Enzyms DpnI verdaut.

Tabelle 04

Stoff	Menge (insg. 50µl)
DNA (msCD229)	2,5µl (5ng)
dNTPs	1µl (2µmol/nucleotid)
Pfu Turbo Polymerase	1µl (5U)
Primer f	1,5µl (187,5pmol/µl)
Primer r	1,5µl (187,5pmol/µl)
Puffer , Pfu (10x)	5µl
Wasser (HPLC)	37,5µl

Tabelle 05

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min´,sec´´)	Zyklen
1	95	30´´	
2	95	30´´	
3	55	1´	
4	68	7´	17x(Schritt 2-4)
5	68	10´	
6	4	∞	

3.2.2.7.2 Amplifikations PCR

Um den jeweils gewünschten DNA-Abschnitt aus dem jeweiligen Vektor zu amplifizieren, wurden spezifische Primer mit den jeweils benötigten Restriktionsschnittstellen genutzt. Die Sequenzierprogrammabfolge und der Sequenzieransatz wurden wie in den Tabellen angegeben pipettiert (**Tabelle 06**) und durchgeführt (**Tabelle 07**).

Tabelle 06

Stoff	Menge (insg. 50µl)
DNA (msCD229)	3-4µl (50ng)
dNTPs	5µl (2mmol)
MgSO ₄	2µl (25mM)
Pfu Turbo Polymerase	1µl (5U/µl)
Primer f	1,5µl (187,5pmol)
Primer r	1,5µl (187,5pmol)
Puffer , Pfu (10x)	5µl
Wasser (HPLC)	36-37µl

Tabelle 07

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min´,sec´´)	Zyklen
1	94	2´	
2	94	15´´	
3	60	30´´	
4	72	30´´	35x(Schritt 2-4)
5	4	∞	

3.2.3 Immunologische Methoden

3.2.3.1 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Mit der Durchflusszytometrie kann man die Größe, die Granularität von Zellen und mittels an Fluorochromen gekoppelter Antikörper verschiedene Oberflächenproteine auf Zellen nachweisen und ihre Expressionsstärke bestimmen. Das Prinzip beruht darauf, dass die Zellen in einer laminaren Strömung statistisch einzeln an Lasern und Detektoren vorbeifließen. Die messbare Ablenkung des Laserstrahls ist sowohl ein Maß für die Größe (Forward Scatter: FSC), als auch die Granularität (Sideward Scatter: SSC) der Zellen. Mit Laserstrahlen definierter Wellenlänge können die verschiedenen an Antikörper gekoppelten Fluorochrome angeregt werden. Diese wiederum binden im Falle der Expression des Zielantigens auf der Zelloberfläche. In dieser Dissertation wurden die Fluorochrome Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 647, Allophycocyanin (APC), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) eingesetzt.

Bei den FACS-Analysen dieser Arbeit wurden $0,5-1 \times 10^6$ Zellen/FACS-Einzelmessung eingesetzt. Diese wurden für die Antikörperfärbungen in 100µl PBS aufgenommen und mit 0,5-1 µg Antikörper für 45min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 500µl PBS (-/-) gewaschen und bei 1600rpm für 5min zentrifugiert. Wurden Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper zur Detektion der Primärantikörper eingesetzt, wurde der Prozess mit den Sekundärantikörpern wiederholt. Für die Messung wurden die Zellen in 500µl PBS (-/-) aufgenommen. In einigen Versuchen wurden die Zellen mit Propidiumiodid, einem DNA-Farbstoff, inkubiert, um nekrotische und apoptotische Zellen von der Analyse auszuschließen. Zur Messung wurde ein BD FACSCalibur benutzt. Die Messdaten wurden mit dem Programm CellQuest von der Firma Becton Dickinson (Heidelberg) ausgewertet.

3.2.3.2 Nachweis von pSTAT5 im FACS

Um den Einfluss der ADP-Ribosylierung von CD25 auf die Phosphorylierung von intrazellulärem STAT5 zu untersuchen, wurden IL-2-abhängig wachsende CTLL-2-Zellen verwendet. Die Zellen wurden vor dem Versuch zweimal mit IL-2-freiem Medium gewaschen und in diesem für 4h unter IL-2-Entzug inkubiert, um die basale STAT5-Phosphorylierung herunterzuregulieren. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mit 1µg/100µl VHH S+16old (ART2-Inhibitor) inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde mit 50µM NAD inkubiert. Bei einem Teil der Zellen wurde die STAT5-Phosphorylierung mit 20U/ml IL-2 stimuliert. Anschließend wurden alle Zellen mit 2% PFA für 10min bei Raumtemperatur fixiert und mit 100% Methanol für 10min bei 4°C permeabilisiert. Die Zellen wurden dann mit PBS (-/-) 1% BSA gewaschen, um das Methanol zu entfernen und um unspezifische Proteinbindungen abzusättigen. Im Anschluss wurden die Zellen mit Antikörpern u.a. gegen pSTAT5 inkubiert und im FACS gemessen.

3.2.4 *In silico* Recherche

3.2.4.1 DNA-Sequenzalignments

Alignments von Sequenzen wurden mit dem Programm T-Coffee (www.tcoffee.org), BLAST (NCBI) oder mit dem Programm SeqMan von DNAStar durchgeführt. Die Sequenzen wurden, falls nicht anders erwähnt, vom National Center of Biotechnology Information (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bezogen.

3.2.4.2 3D-Strukturmodellierung von msCD229

Bislang ist die 3D-Kristallstruktur von CD229 nicht bekannt. Um eine Vorhersage über die Struktur dieses Proteins zu treffen, wurde die dem CD229 nächst ähnliche bekannte 3D-Kristallstruktur mit dem Programm PSI-PRED/GenThreader und BLAST ermittelt. Das so ermittelte Protein war das humane NTB-A (PDB code 2if7) (Cao et al. 2006). Die 3D-Struktur wurde mit dem Programm SWISS-MODEL anhand des Alignments von msCD229 und NTB-A modelliert. Da NTB-A aus nur zwei Domänen besteht, wurden die zwei N-terminalen Domänen und die beiden C-terminalen Domänen von msCD229 separat modelliert. Die Bearbeitung der Kristallstruktur erfolgte mit dem Programm pyMOL (OpenSource Software der Firma DeLano Scientific, USA).

3.2.5 Proteinbiochemie

3.2.5.1 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation wird eine aus Sepharosekügelchen bestehende Matrix mit Antikörpern gegen spezifische Zielproteine gekoppelt. Diese Antikörpermatrix wird genutzt, um spezifisch Proteine aus einem Proteingemisch zu präzipitieren. Alle verwendeten Matrices wurden vor Verwendung zweimal mit 800µl PBS(-/-) gewaschen und bei 1200rpm für 5min zentrifugiert. Pro 20µl Protein-A-Sepharose, Protein-G-Sepharose oder Anti-Ratten-IgG-Agarose wurden 1µg Antikörper in 200µl PBS(-/-) gekoppelt, indem die Matrix für mindestens 1 Stunde bei 4°C in der Antikörperlösung gerollert wurde. Die Matrix wurde, um die nicht gebundenen Antikörper abzuwaschen, anschließend mit 800µl PBS(-/-) 1% Triton X-100 gewaschen und bei 1200rpm für 5min

zentrifugiert. Um unspezifische Bindungen von Zellbestandteilen/Proteinen an die Matrix auszuschließen, wurden die Zellysate zuvor mit der unkonjugierten Matrix inkubiert (Perclear). Das Zellysat wurde für 1h bei 4°C mit 20µl M2-Sepharose, Protein-A-Sepharose, Protein-G-Sepharose oder Anti-Ratten- IgG-Agarose gerollert. Die Proben wurden bei 2000rpm für 5min zentrifugiert und der Überstand auf die mit Antikörpern konjugierten Matrices gegeben. Diese wurden für 1h bei 4°C gerollert, bei 2000rpm für 5min zentrifugiert und anschließend gewaschen. Gewaschen wurde zweimal für 30sec und zweimal für 15min bei 4°C in 800µl Waschpuffer 2.

3.2.5.2 M2-Agarose-Affinitätschromatographie

Bei der M2-Agarose-Affinitätschromatographie handelt es sich um eine Methode, bei der Proteine mit einem definierten Epitop, dem FLAG-Tag (Peptidsequenz: DYKDDDDK), über den M2-Antikörper an eine Festphase immobilisiert werden. Der FLAG-Tag wird meist N- oder C-terminal zu einer Proteinsequenz hinzugefügt. Die Matrix bestand aus einer 2ml M2-Sepharose-Säule. Die Säule wurde zur Vorbereitung zweimal mit PBS (-/-) gewaschen und äquilibriert. Anschließend wurden die 500ml Überstand aus der Hochhauskultur von msCD229V1C2-Fc zweimal über die Säule gegeben. Die Säule wurde anschließend zweimal mit PBS(-/-) gewaschen. Hierauf folgte einmal die Elution mit 1,5ml Elutionspuffer (Glycin pH 2,7) als Void, in dessen Durchfluss keine nachweisbaren Mengen an präzipitiertem Protein enthalten waren. Anschließend erfolgte die Elution in fünf Schritten à 2ml Elutionspuffer. Der pH-Wert des Eluats wurde jeweils direkt mit 100µl TrisHCl pH 9 neutralisiert. Aliquots der Waschungen des Durchflusses und die Eluate wurden in einer SDS-PAGE aufgetragen und mittels Coomassie gefärbt, um zu bestimmen, in welcher Elutionsfraktion das produzierte Protein vorhanden war. Die Fraktionen mit sichtbarem Produkt wurden mit PD-10-Säulen mittels Gelchromatographie nach Herstellerprotokoll (Pharmagene) in PBS(-/-) umgepuffert und anschließend mittels Zentrifugation durch Größenausschlussfilter (cut-off 10.000Da) in Vivaspins (Sartorius) aufkonzentriert. Für analytische Zwecke wurde in T-25 Flasks produziertes Protein mittels M2-Sepharose immunpräzipitiert. Hierbei wurde das Protein mit 20µl Sepharose aus 1ml Überstand präzipitiert.

3.2.5.3 SDS PAGE-Analysen

Die Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) stellt eine Methode dar, mittels der Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Proteine werden zunächst durch das Detergent SDS unter Hitze und dem reduzierenden Agens Dithiothreitol (DTT), welches Disulfidbrücken auflöst, denaturiert. Das SDS sorgt zudem dafür, dass die Proteine in etwa eine einheitliche Ladung haben. Das Polyacrylamidgel ermöglicht die Proteinauftrennung der Größe nach. 5-30µl der Proben wurden mit dem Probenpuffer DTT bei 70°C für 15min aufgeköcht und anschließend bei 13000rpm anzenrifugiert, um das sich bildende Kondenswasser wieder mit der Probe zu vereinigen und ggf. Matrices bzw. größere Aggregate zu pelletieren. Die Proben wurden dann auf das Gel aufgetragen und bei 200V, 100mA in MOPS-Puffer aufgetrennt. Als Größenstandard wurden 10µl Novex Sharp-Prestained-Protein-Standard mit aufgetragen. Die Gele wurden anschließend Coomassie-gefärbt oder im Westernblot untersucht.

3.2.5.4 Coomassie-Färbung

Um größenfraktionierte Proteine optisch sichtbar zu machen, wurden die Polyacrylamid-Gele nach der Elektrophorese oder nach dem Westernblot über Nacht in Coomassie-Färbelösung auf einem Schüttler gefärbt (Herstellerprotokoll: Novagen Coloidal Blue Staining Kit). Am Folgetag wurde die nicht an Protein gebundene Farblösung mit Aktivkohle in entmineralisiertem Wasser gebunden. Anschließend wurde das Gel in Gel-Drying-Solution geschüttelt, eingeschweißt und getrocknet.

3.2.5.5 Westernblot-Analysen

Beim Westernblot wird ein elektrisches Feld senkrecht zur Gel-Ebene angelegt. Die Proteine wandern damit auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) und Nitrocellulose (NC)- Membran, an der sie haften bleiben. Die PVDF-Membran wurde für 15s mit Methanol aktiviert. In der Blotkammer wurde das Gel inspektorisch luftblasenfrei zwischen die NC- und PVDF-Membran gelegt. Der verbleibende Raum wurde mit in Blotpuffer getränkten Schwämmen und Filterpapieren ausgefüllt. Die Proteine wanderten bei 30V und 100mA für 1 Minute in Richtung der NC-Membran und nach Feldumkehr für 90min in Richtung der PVDF-Membran. Das Gel wurde Coomassie-gefärbt, um die in ihm verbliebene Proteinmenge abzuschätzen. Die unspezifischen Proteinbindungsstellen der PVDF-Membran wurden für

die Antikörperfärbung über Nacht mit Tris-Buffered-Saline (TBS) 10% Ziegen-Serum, bei 4°C auf dem Rollinkubator geblockt.

Anschließend wurden Proteinbanden spezifisch mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern detektiert. Die durch die Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase: HRP) katalysierte Oxidation von Diacylhydrazid-Luminol mittels Wasserstoffperoxid führt zur Emission von Licht (Lumineszenz). Luminol geht dadurch in einen angeregten Zustand über. Die Energie, die bei dem Übergang vom angeregten zum Ruhezustand frei wird, nimmt die Form von Lichtquanten an. Da die Reaktion enzymkatalysiert abläuft, kann man durch Kopplung des Enzyms an Antikörper spezifisch Proteine nachweisen. Die geblockte PVDF-Membran wurde in 9ml TBS(pH8) 0,05% Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20, als Netzmittel) und 1ml Ziegenserum mit 1µg anti-eADP-Ribose-Antikörper (1G4) für 1 Stunde bei 4°C auf dem Rollinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit 20ml TBS 0,05% Tween 20 gewaschen. Dies wurde mit dem Zweitantikörper 1µg anti-Maus-IgG-Peroxidase wiederholt, die Membran wurde anschließend sechsmal gewaschen. Die Membran wurde für 1min mit je 1,5ml Reaktionslösung (Amersham/Gellifesciences) inkubiert und mit Folie abgedeckt. Die Filme wurden für 2s, 10s, 1min, 3min oder 10min belichtet.

3.2.5.6 Silberfärbung

Mit der Silberfärbung wurden auf die NC-Membran geblottete Proteine gefärbt. Hiermit lässt sich die Beladung des Gels nachweisen und die Reinheit der Proteine im Gel abschätzen. Die Färbung wurde mit Silberfärbelösung durchgeführt. Die Membran wurde anschließend gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen, luftgetrocknet und eingeschweißt.

3.2.5.7 Autoradiographie

Bei der Autoradiographie wird die freigesetzte Strahlung z.B. von ³²P-ADP-ribosylierten Proteinen (β-Strahlung) in einem SDS-PAGE-Gel auf einem Fotofilm detektiert. Die getrockneten Gele wurden in eine Filmkassette geklebt. Es wurden Biomax Maximum Resolution/Solution Filme von Kodak oder Amaxa verwendet. Die Filme wurden für 5 bis 168 Stunden bei -80°C belichtet und anschließend entwickelt.

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Dissertation gliedert sich in drei Unterkapitel. Im ersten Teil werden verschiedene Lymphomzelllinien und primäre Lymphozyten der Maus auf die Expression und die ADP-Ribosylierung von bekannten ART-Targets untersucht. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Identifikation der ART2-Zielarginine in CD229. Abschließend wird im dritten Teil der Frage nachgegangen, welchen Einfluss die ADP-Ribosylierung auf die Funktion von CD25 und CD229 hat.

4.1 Analyse der Expression und ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen

Um die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen genauer zu untersuchen, wurden primäre Mauslymphozyten sowie murine und humane Lymphomzelllinien mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie (^{32}P -NAD) auf die ADP-Ribosylierung bekannter ART-targets untersucht. Der Fokus lag hierbei vor allem auf den beiden ART-targets CD25 und CD229. Hierfür wurde zunächst die Expression sowie die allgemeine ADP-Ribosylierung der Zielproteine im 1G4-Versuchsansatz (Krebs et al. 2003) durchflusszytometrisch nachgewiesen (**Abb.05**). Es wurden die radioaktive Nachweismethode (^{32}P -NAD) mit der nicht radioaktiven Nachweismethode (eNAD/1G4-Antikörper) auf Yac-1-Zellen verglichen (**Abb.06**). Anschließend wurde durch Immunpräzipitation untersucht, welche der bekannten ART-targets auf primären Lymphozyten ADP-Ribosyliert werden (**Abb.07**).

4.1.1 Durchflusszytometrische Expressionsanalyse von ART2.2-targets auf Lymphomzellen

Da verschiedene Lymphomzelllinien sich in der Expression von Zelloberflächenproteinen unterscheiden, wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt, welche der bekannten ART2-targets exprimiert werden und wie stark die allgemeine ADP-Ribosylierung ist (**Abb.05**). Hierfür wurden $0,5-1 \times 10^6$ Zellen mit $5-50 \mu\text{M}$ eNAD für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. In einem weiteren Schritt wurden die Zellen bei 4°C mit $0,5-1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ der im Panel angegebenen Antikörper angefärbt.

Es zeigte sich, dass von den untersuchten Zelllinien nur die Yac-1-Zellen endogen ART2 exprimierten (**Abb.05** links). Die DC27.10 und EL4-Zellen zeigten erst nach Transfektion mit der ART2 eine ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen, wobei diese auf den DC27.10-Zellen am stärksten war. Die Transfektion der Zellen mit ART2 hat bei den DC27.10 und den EL4-Zellen keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten ART2-Zielproteine. Nach Transfektion mit ART2 exprimierten EL4-Zellen im Gegensatz zu untransfizierten EL4-Zellen die NADase CD38 (**Abb.05** rechts), was auf einen kompensatorischen Effekt hinweisen könnte. Dies bedingt wahrscheinlich eine Verringerung des Substratangebots für die ART2 (Krebs et al. 2005).

Von den ART2-targets konnte CD25 nur auf den murinen Yac-1-Zellen nachgewiesen werden, welche CD25 stark exprimierten. CD229 konnte auf allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Die Detektion von CD229 erfolgte mit den Antikörperklonen Lyab3 und 30CO7, welche die in den EL4-Zellen exprimierte CD229.1-Isoform erkennen. Das Integrin CD11a, sowie der Ionenkanal P2X7 wurden von allen untersuchten murinen Lymphomzellen exprimiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass bekannte ART2-targets auf den verschiedenen Lymphomzelllinien durchflusszytometrisch nachgewiesen werden konnten. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden ausgewählte Lymphomzelllinien für weitere Versuche ausgewählt.

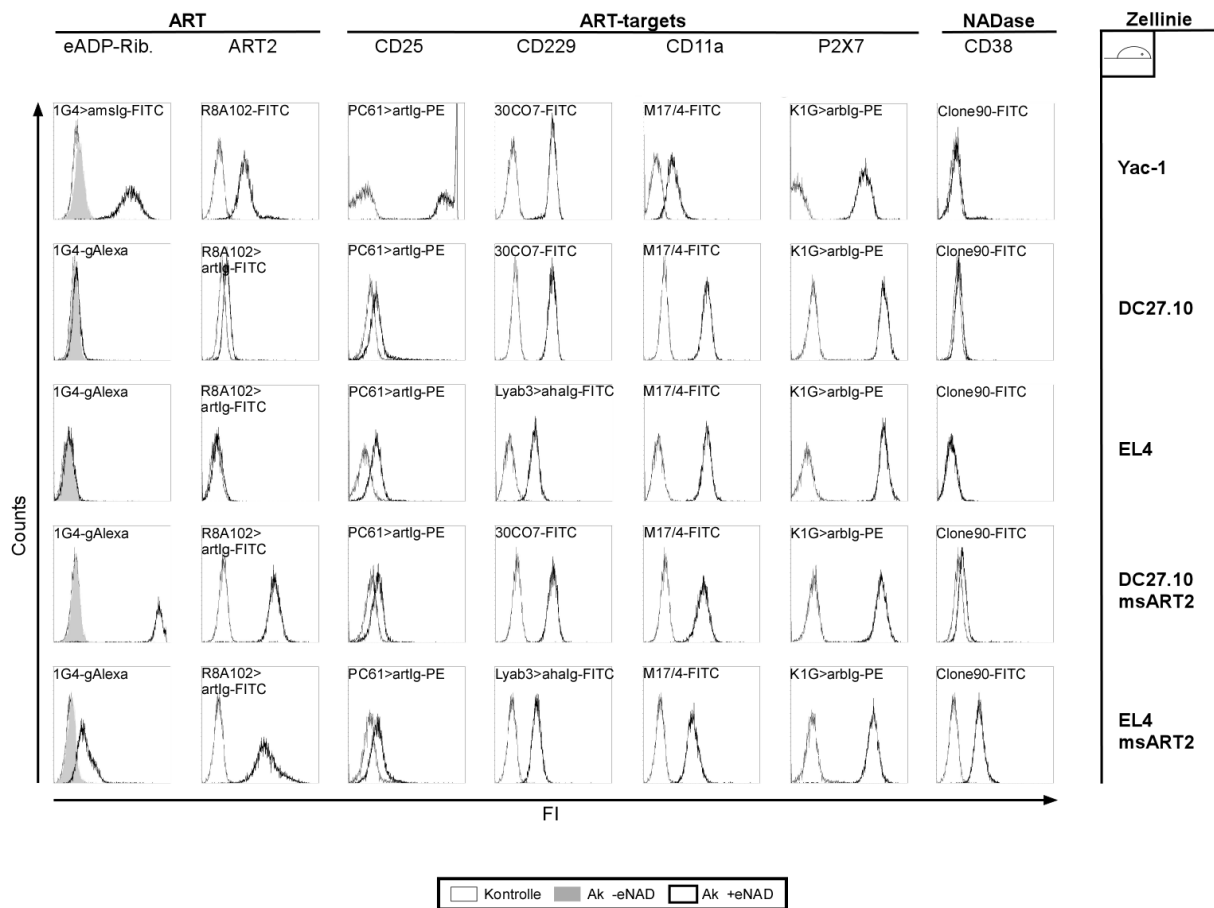


Abb.05 Expressionsanalyse von ART-targets auf Lymphomzelllinien: Maus-Lymphomzelllinien wurden mit den jeweils angegebenen Antikörpern angefärbt und im FACS gemessen. Um die ART-Aktivität (links) zu prüfen wurden die Zellen zuvor mit 5-50µM eNAD für 10 min bei RT inkubiert und mit dem 1G4-Antikörper gemessen. Für die Generierung von ART2 stabil transfizierten Zelllinien wurden sowohl DC27.10-Zellen, sowie EL4-Zellen verwendet (rechts).

4.1.2 Analyse der ADP-Ribosylierung von ART-Zielproteinen auf Lymphomzellen

Zum Nachweis der ADP-Ribosylierung einzelner Zelloberflächenproteine wurden radioaktive und nicht radioaktive Ansätze verwendet. Hierbei wurden Zieloberflächenproteine entweder mit radioaktiver ^{32}P -ADP-Ribose markiert und mittels Autoradiographie detektiert oder mit etheno-ADP-Ribose markiert und mittels 1G4-Antikörper in der Durchflusszytometrie oder im Westernblott detektiert (Young & Santella 1988; Davis et al. 1998). Beide Verfahren wurden an Yac-1-Zellen getestet (**Abb.06**).

Um die ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen auf Yac-1-Zellen radioaktiv nachzuweisen, wurden 3×10^6 Yac-1-Zellen mit $10 \mu\text{Ci}$ ^{32}P -NAD für 10min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 30min bei 4°C lysiert. Das Zelllysate wurde nach dem Preclear sequenziell je zweimal auf CD25 und CD229 immunpräzipitiert. Das

SDS-PAGE-Gel wurde Coomassie-gefärbt und autoradiographiert. Der Film wurde nach 18 Stunden entwickelt.

Im Versuchsansatz mit eNAD wurden 8×10^6 Yac-1 Zellen mit $20 \mu\text{M}$ eNAD für 10min bei Raumtemperatur inkubiert und für 10min bei Raumtemperatur lysiert sowie je zweimal auf CD25 und CD229 immunpräzipitiert. Nach dem Westernblot wurde eine Chemilumineszenzreaktion durchgeführt und der Film nach ca. 3min entwickelt. Zur Vereinfachung der Abbildung wurden die Spuren der Chemilumineszenzreaktion aus zwei verschiedenen Coomassiegelen so angeordnet wie in der Autoradiographie.

Auf dem Film der Autoradiographie sieht man im Gesamtzelllysat mehrere prominente Banden bei 100kDa, 70kDa und bei 50kDa. Vergleicht man dies mit den Immunpräzipitaten, erkennt man, dass es sich bei der Bande um 100kDa um CD229 und bei der Bande um 50kDa um CD25 handelt. Im Gegensatz zu CD229 ist CD25 auch noch im Ansatz der zweiten sequentiellen Präzipitation nachzuweisen, was auf eine relativ hohe Expression von CD25 auf Yac-1-Zellen hindeutet und die FACS-Ergebnisse bestätigt. Nach Coomassiefärbung lassen sich multiple Banden im Gesamtzelllysat nachweisen, wovon nach Immunpräzipitation nur wenige schwach sichtbar sind. Nach Autoradiographie zeigen sich kaum unspezifische Banden, sodass man von einer sehr selektiven Immunpräzipitation ausgehen kann.

Auf dem Film der ECL-Reaktion erkennt man im Ansatz des Gesamtzelllysates mehrere Banden, u.a. von CD229 bei 100kDa und von CD25 bei etwa 50kDa. Mit der chemischen Nachweismethode (eNAD) lassen sich im Prinzip ähnliche Ergebnisse ableiten, wie in der zuvor gezeigten Autoradiographie: Die ADP-Ribosylierung von CD25 und CD229 konnte auch hier mittels Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Jedoch zeigen die Spuren der Immunpräzipitate in der chemischen Nachweismethode weitere, vermutlich unspezifische Banden. Die Präzipitate im ^{32}P -NAD-Ansatz stellen sich im Vergleich zum Hintergrund deutlicher dar. In der Silberfärbung zeigen sich ähnliche Ergebnisse wie zuvor bei der Coomassiefärbung.

Zusammenfassend konnte die ADP-Ribosylierung von CD25 und CD229 in Yac-1-Zellen sowohl mittels Chemilumineszenzreaktion als auch durch die Autoradiographie nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum eNAD-basierten Ansatz zeigt aber der ^{32}P -NAD-Ansatz weniger unspezifische Hintergrundsignale.

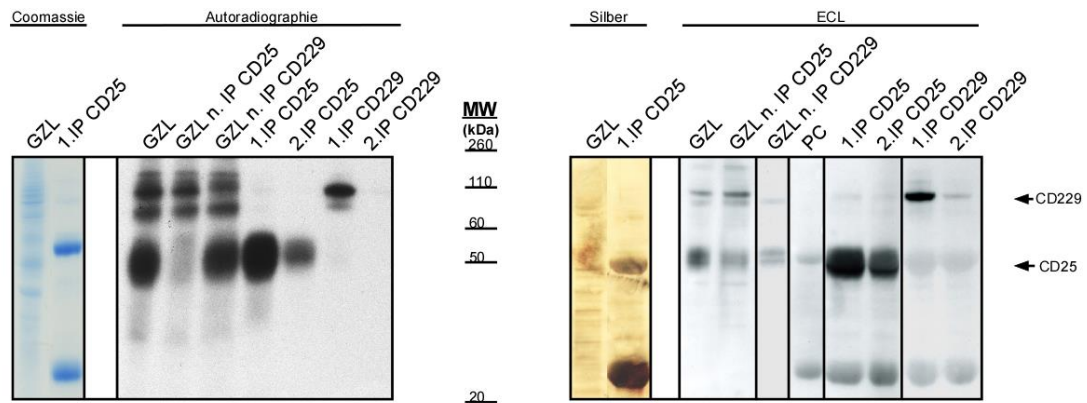


Abb.06 ^{32}P -NAD-Assay und eNAD-Assay mit Yac-1-Zellen: ^{32}P -NAD-Assay(links): 3×10^6 Yac-1-Zellen wurden mit $10 \mu\text{Ci}$ ^{32}P -NAD für 10min bei RT inkubiert und anschließend bei 4°C lysiert. Das Lysat wurde sequenziell je zweimal auf CD25(PC61) und auf CD229(30CO7) präzipitiert sowie nach SDS-Page autoradiographiert. eNAD-Assay(rechts): 8×10^6 Yac-1-Zellen wurden analog zum radioaktivansatz behandelt. Die Inkubation erfolgte mit $20 \mu\text{M}$ eNAD für 10min bei RT. Die Detektion der eADP-ribosylierten Zelloberflächenproteine erfolgte mittels 1G4-Westernblot, der Film wurde nach ECL-Reaktion der Membran für ca. 3min belichtet.

4.1.3 Nachweis von ART2-Zielproteinen auf Maus-Tregs und konventionellen T-Zellen mittels ^{32}P -NAD

Im Immunsystem der Maus wird die ART2 vor allem von T-Lymphozyten exprimiert. T-Lymphozyten teilen sich in mehrere Subpopulationen wie CD4^+ T-Helferzellen, CD8^+ zytotoxische T-Zellen, NKT-Zellen und Tregs auf. Von den genannten T-Zellpopulationen exprimieren Tregs viel CD25. In den folgenden Versuchen wurden Tregs aus DEREГ-Mäusen verwendet, welche eGFP unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors exprimieren. Dies ermöglicht die Identifikation von Foxp3 exprimierenden Tregs aufgrund ihrer eGFP-Expression (Lahl et al. 2007). Im Folgenden wurde die Expression von ART-Zielproteinen sowie die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität auf Tregs und anderen konventionellen T-Zellen verglichen (Abb.07).

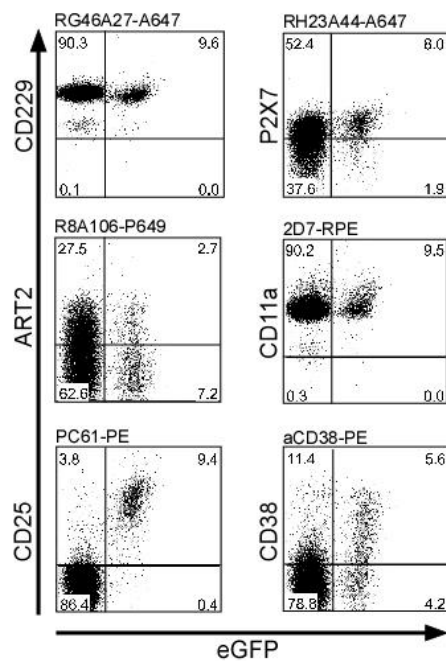
Aus drei DEREГ-Mäusen auf dem Balb/c-Hintergrund wurden die Milzen und die Lymphknoten präpariert und die Tregs und T-Zellen durchflusszytometrisch charakterisiert und anschließend isoliert (nicht dargestellt). Anschließend wurden je 5×10^5 Zellen der beiden Populationen mit $15 \mu\text{Ci}$ ^{32}P -NAD für 30min bei 4°C inkubiert. Nach der Zelllyse wurden die Zielproteine immunpräzipitiert. Aus zwei Ansätzen wurden je CD25 und CD11a sowie P2X7 und CD229 sequenziell immunpräzipitiert und in einer SDS-PAGE größenfraktioniert. Nach Coomassiefärbung erfolgte die Autoradiographie für ca. eine Woche.

Vergleicht man die Expression der ART2-Zielproteine auf Tregs (GFP+) und anderen T-Zellen (GFP-), ist erkennbar, dass ART2, CD229, P2X7 sowie CD11a von beiden Zellpopulationen exprimiert werden. CD25 und CD38 werden vorwiegend von Tregs exprimiert.

Betrachtet man die Autoradiographie des Gesamtzelllysats der Tregs (**Abb.07, B oben**) und der konventionellen T-Zellen (**Abb.07, B unten**), fallen zwei prominente Banden bei etwa 100kDa und 70kDa auf. Außerdem erkennt man eine unscharfe Bande bei 50kDa, welche nur bei den Tregs vorkommt. Nach der Immunpräzipitation wird klar, dass es sich bei der prominenten 100kDa-Bande um CD229 handelt, welches somit ein bevorzugtes Ziel der ART2 auf T-Zellen darstellt. Die schwache Bande bei 50kDa entspricht CD25, welches vorwiegend von Tregs exprimiert wird. Das Intergrin LFA-1 besteht aus den beiden Ketten CD11a und CD18. Die schwache Bande bei 180kDa entspricht CD11a, welche verhältnismäßig schwach ADP-ribosyliert wird. Die zweite Bande bei etwa 95kDa entspricht CD18, welches stärker ADP-ribosyliert wird. Aus beiden Zellpopulationen lässt sich der purinerge Rezeptor und ligandengesteuerte Ionenkanal P2X7 bei etwa 70kDa präzipitieren. Im Gesamtzelllysat kommt bei ca. 70kDa eine weitere prominente Bande zur Darstellung, die keinem der untersuchten Zielproteine zugeordnet werden konnte.

Bei diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Proteine CD11a, CD18, P2X7 und CD229 sowohl in Tregs, als auch in den anderen T-Zellen Ziele der ADP-Ribosylierung sind. CD25 wird wie erwartet vor allem auf Tregs ADP-ribosyliert, was darauf zurückzuführen ist, dass das Protein kaum auf konventionellen T-Zellen exprimiert wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CD229 in T-Zellen ein bevorzugtes Ziel der ART darstellt.

A



B

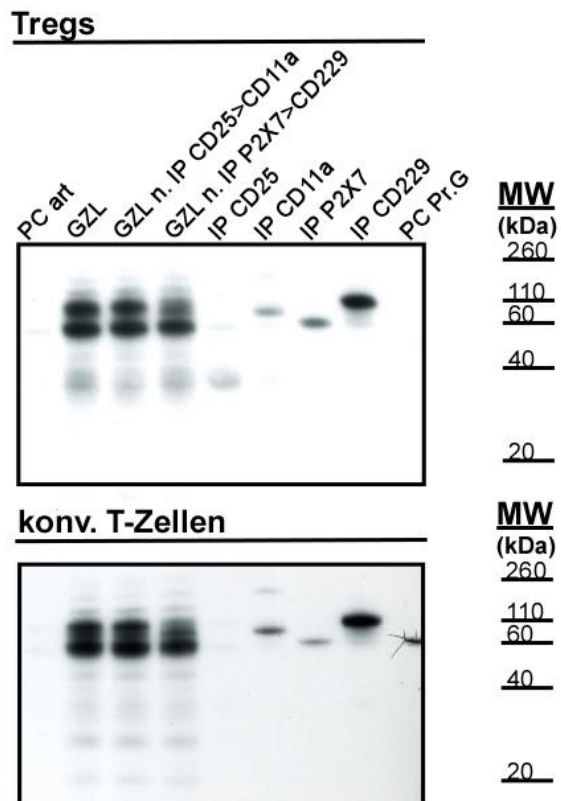


Abb.07 ^{32}P -NAD-Assay mit FACS-sortierten Tregs und konventionellen T-Zellen:
A: Oberflächenexpressionsanalyse von ART2, CD229, P2X7 und CD11a auf CD4^+ T-Zellen. Dargestellt sind T-Helferzellen (eGFP-) und Tregs (eGFP+). **B:** Tregs und T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten von DEREK-Balb/c Mäusen mittels durchflusszytometrischer Sortierung isoliert. Nach Inkubation mit ^{32}P -NAD wurden die T-Zellen lysiert und nach Immunpräzipitation der o.g. Targets autoradiographiert.

Zusammenfassend konnte in den Versuchen dieses Kapitels gezeigt werden, dass mehrere bekannte Zielproteine der ART2-ADP-Ribosylierungsreaktion auf verschiedenen Lymphomzelllinien vorkommen (**Abb.05**). Aus Versuchen mit Yac-1-Zellen wurde ersichtlich, dass die radioaktive Methode bei der Detektion von ADP-ribosylierten Zelloberflächenproteinen etwas weniger unspezifische Hintergrundsignale zeigt, als die eNAD/1G4-vermittelte Detektion. Es konnte zudem gezeigt werden, dass CD25 und CD229 zwei Haupttargets auf Yac-1-Zellen darstellen (**Abb.06**). In einem Versuchsansatz mit ^{32}P -NAD konnte die ADP-Ribosylierung mehrerer bekannter ART2-Zielproteine u.a. auch von CD25 und CD229 auf primären T-Zellen nachgewiesen werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass CD25 auf regulatorischen T-Zellen, CD229 hingegen sowohl auf regulatorischen T-Zellen als auch auf konventionellen T-Zellen ADP-ribosyliert werden.

Zudem stellt CD229 in T-Zellen ein bevorzugtes Ziel der ADP-Ribosylierung durch die ART dar (**Abb.07**).

4.2 Identifikation der Zielarginine der ADP-Ribosylierung in msCD229

In diesem Kapitel wird das in konventionellen und regulatorischen T-Zellen als ein Haupttarget der ART identifizierte Zielprotein msCD229 genauer untersucht. Um einen Einblick in die Struktur von CD229 zu bekommen und mögliche der ART zugängliche Argininreste zu identifizieren, wurde die Sequenz des Proteins auf die 3D-Struktur des verwandten Proteins NTB-A modelliert (**Abb.08**). Anschließend wurden durch zielgerichtete Mutagenese alle Argininreste durch nicht ADP-ribosylierbare Lysinreste ersetzt (**Abb.09**). Daraufhin wurden die hergestellten Mutanten in HEK-Zellen exprimiert (**Abb.10**) und auf ihre ADP-Ribosylierbarkeit (**Abb.11**) untersucht.

4.2.1 3D-Modellierung von msCD229 auf die 3D-Kristallstruktur des strukturverwandten NK-T-B-Antigen (NTB-A)

Das Zelloberflächenprotein msCD229 ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, das homophil interagiert. Da die 3D-Struktur dieses Proteins noch nicht bekannt ist, wurde die Sequenz auf das strukturverwandte Protein NTB-A modelliert, dessen 3D-Struktur bereits bekannt ist und welches eine hohe Sequenzhomologie zu msCD229 aufweist. Hierdurch ist es potentiell möglich, Rückschlüsse auf die Lage der Arginine und ihre Zugänglichkeit zur ADP-Ribosylierung durch die ART2 zu ziehen (**Abb.08**).

NTB-A wurde mittels der Programme Genthreader und BLAST ermittelt. Die Struktur des humanen NTB-A hatte hierbei die größte Übereinstimmung für die ersten beiden Domänen V1 und C2 von msCD229 mit einer Sequenzhomologie von etwa 29% und einem E-Wert von $3,4 \times 10^{-27}$ sowie für die zweiten beiden Domänen V3 und C4 von msCD229 mit einer Sequenzhomologie von etwa 32% und einem E-Wert von $3,1 \times 10^{-27}$. Der E-Wert (Expectancy-Value) gibt dabei an, mit welcher Wahrscheinlichkeit man bei einer Suche eine zufällige, nicht signifikante Übereinstimmung erhalten würde. Je niedriger der Wert, desto signifikanter die Übereinstimmung. Ein E-Wert von 1 bedeutet, dass man wenigstens eine zufällige Sequenzhomologie erwarten würde. Bei NTB-A handelt es sich wie bei msCD229 um ein weiteres Mitglied der SLAM-Unterfamilie, welches ebenfalls homophil interagiert. Anschließend wurden die Sequenzen mittels T-Coffee oder BLAST verglichen.

Da NTB-A nur zwei Immunglobulin-Domänen besitzt, wurde das Alignment separat sowohl für die ersten beiden Domänen als auch für die letzten beiden Domänen in msCD229 durchgeführt. Das Alignment erlaubte eine Zuordnung der Aminosäuren von msCD229 zu den entsprechenden Aminosäuren in der Kristallstruktur von NTB-A. Die eigentliche Modellierung erfolgte mit dem Programm Swissmodel. In den Abbildungen wurden die konservierten Arginine rot und die nicht konservierten blau markiert. Die Qualität der jeweilig modellierten Aminosäure wurde von Swissmodel mittels Anolea (Anolea: atomic mean force potential) bewertet. Hierbei wurde überprüft, ob die energetische Lage der jeweiligen Atome günstig oder eher ungünstig ist. Über diese 3D-Modellierung lassen sich somit potentielle Rückschlüsse bezüglich der Zugänglichkeit der Argininreste für die ART2-katalysierte ADP-Ribosylierung ziehen.

In der Cartoon-Darstellung (**Abb.08, A**) erkennt man, dass die Struktur der Domänen von msCD229 der von klassischen Immunglobulin-Domänen sehr ähnlich ist. Man sieht die vier Immunglobulin Domänen mit zwei V- und zwei C-Domänen.

Betrachtet man die Verteilung der Arginine über die Domänen, so erkennt man, dass in der ersten Domäne eine, in der zweiten Domäne drei, in der dritten Domäne 13 und in der Umgebung der vierten Domäne drei Arginine vorkommen. Es liegt also eine Häufung der Arginine in der dritten Domäne vor. Durch die Surface- (Oberflächen-) Darstellung werden oberflächlich liegende Arginine sichtbar. Da Arginine geladene Aminosäuren sind, befinden diese sich meist an der Proteinoberfläche.

Die erste Domäne V1 enthält nur das R59, welches in Mensch und Maus konserviert ist. Dieses liegt auf einer Schlaufe zwischen einer α -Helix und einem β -Strang. Dabei ist die Seitenkette der Aminosäure auf das Protein selbst zurückgefaltet. In der Oberflächendarstellung scheint dieser Rest in einer leichten Einbuchtung zu liegen, was eine ADP-Ribosylierung an dieser Stelle erschweren könnte.

Die zweite Domäne C2 enthält drei nicht konservierte Arginine R146, R161 und R190. Am zugänglichsten erscheinen dabei R190 und R161. R190 befindet sich zwischen einem β -Strang und einer α -Helix, sein Rest ist nach außen gerichtet. R161 befindet sich auf einem β -Strang, auch sein Rest ist nach außen gerichtet. R146 wird wie in der Cartoon-Struktur sichtbar von zwei Schlaufen überlagert. Alle Arginine der ersten beiden Domänen des Modells liegen in Bereichen, in denen Swissmodel eine gute Vorhersagequalität für die 3D-Proteinstruktur (Anolea) angibt.

Die dritte Domäne V3 enthält die meisten Arginine. Das Doppelargininpaar RR200, wovon das R200 konserviert ist, liegt auf einer Schlaufe, die als Übergang zwischen den Domänen

C2 und V3 dient, welche nicht modelliert werden konnte. Somit lässt sich über diese Arginine keine zuverlässige Aussage bezüglich der Zugänglichkeit treffen. Zudem ist es schwierig, Aussagen über Arginine zu treffen, welche an der Übergangsfläche von C2 zu V3 liegen, da die nicht modellierbaren Aminosäuren der Übergangsschleife diese überlagern könnten. Die Arginine R224 und R227 liegen beide auf einer langen Schleife zwischen zwei β -Strängen. Das R227 ist konserviert. Die Vorhersagequalität von Schleifen ist generell eher schlecht, was für diese beiden Arginine im Anolea bestätigt wurde. Das Doppelargininpaar RR245 liegt auf dem Übergang von einem β -Strang zu einer Schleife. Trotzdem ist die Vorhersagequalität im Bereich dieser beiden Aminosäuren ausreichend. Das R245 von dem Argininpaar ist dabei konserviert und eher zugänglich. Das R246 liegt in einer Vertiefung und ist dadurch potentiell eher schlecht zugänglich. Die nicht konservierte Arginindoublette RR254, welche an einem Übergang von einer Schleife zu einem β -Strang liegt, befindet sich in einem Abschnitt mit ausreichender Vorhersagequalität. Der Rest des Arginins R255 ragt dabei besonders weit aus der Oberflächenebene heraus, was auf eine eher gute Zugänglichkeit hindeutet. Das Argininpaar RR263 liegt auf einer α -Helix. Der Rest des nicht konservierten R263 ist exponiert und somit eher zugänglich, der Rest des konservierten Arginins R264 ist weniger exponiert und somit wahrscheinlich schlechter zugänglich. Auch dieses Argininpaar liegt im Modell im Bereich einer Region ausreichender Vorhersagequalität. Direkt angrenzend liegt das nicht konservierte R266 auf einer Schleife, dessen Rest eher kein gutes Ziel für die ADP-Ribosylierung darstellt. Das nicht konservierte Arginin R297 liegt in einem Bereich mit eingeschränkter Modellqualität. Das nicht konservierte Arginin R302 liegt auf einem β -Strang mit ausreichender Vorhersagequalität. Es erscheint dabei schlecht zugänglich. Am Übergang der Domänen V3 und C4 auf einer Schleife liegt das konservierte R311, wobei die Modellqualität im Bereich dieser Schleife ausreichend ist. Auch der Rest dieses Arginins scheint zugänglich. Die Domäne C4 enthält keine Arginine. Die Arginine R403 und R406 liegen am Übergang zum Transmembrananker, sind also wahrscheinlich schlecht zugänglich, hier aber nicht modelliert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Häufung von Argininen vor allem in der dritten Domäne V3 zu finden ist. Am besten zugänglich erscheinen nach dem Modell die Arginine R161 und R190 in der Domäne C2, die Arginine R245, R255, R263, und R297 in der Domäne V3 und am Übergang der Domäne V3 zu C4 das Arginin R311.

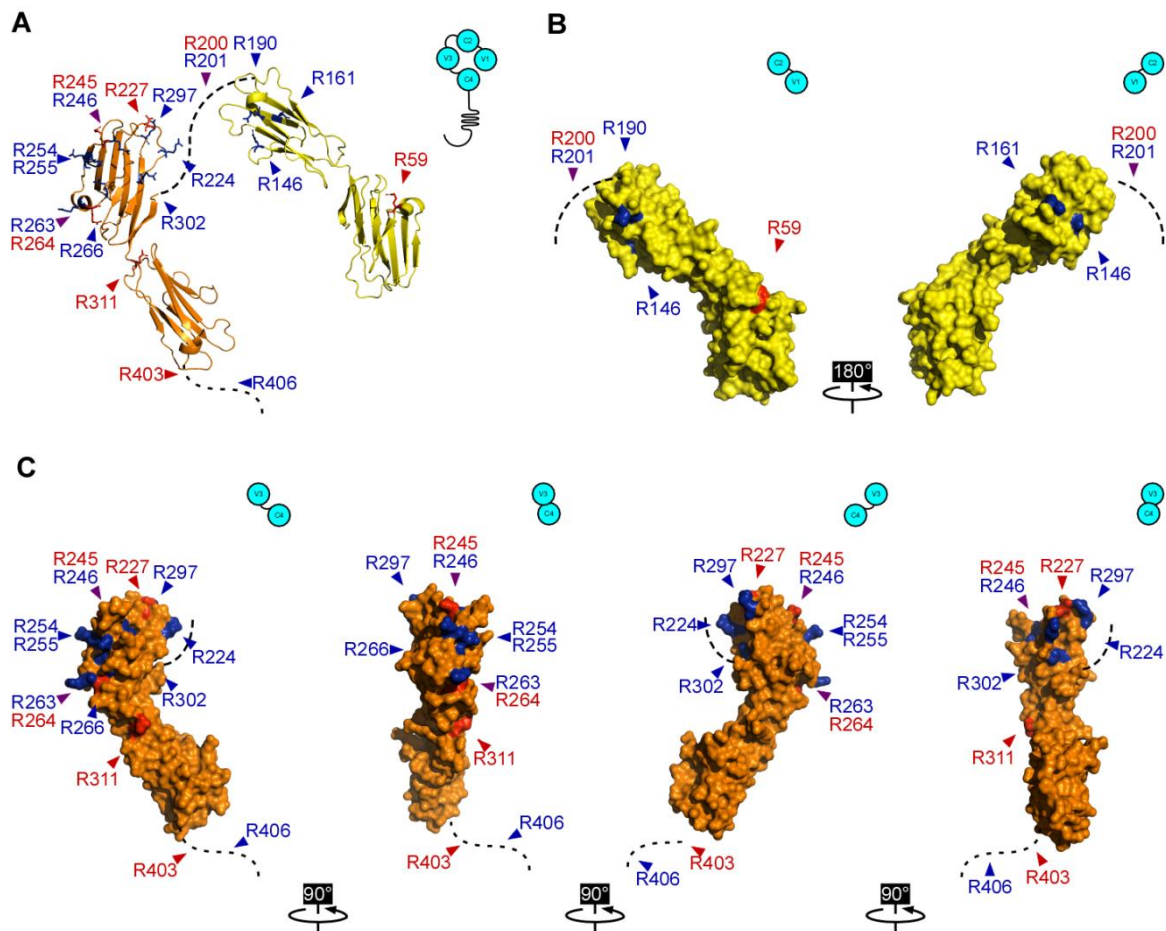


Abb.08 Modellierung der 3D-Struktur von msCD229 auf die Kristallstruktur von NTB-A:
A: Darstellung des Modells als Cartoon. Die Lage der Arginine ist farblich hervorgehoben (konserviert rot, nicht konserviert blau) und nach Lage beschriftet. Es wurden jeweils die Domänen V1, C2 und die Domänen V3, C4 auf den Kristall der zwei Domänen von NTB-A mittels Swissmodel modelliert. Die Lage der Domänen ist schematisch dargestellt (rechts oben in hellblau). **B:** Surface Darstellung der Domänen V1, C2. **C:** Surface Darstellung der Domänen V3, C4. Um alle Argininreste darstellen zu können, wurden die beiden Domänen in 90°-Drehung dargestellt.

4.2.2 Zielgerichtete Mutagenese der extrazellulären Arginine in msCD229 zu Lysin

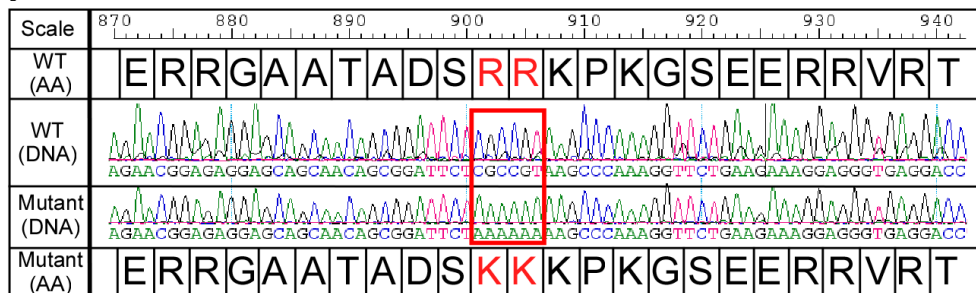
Um herauszufinden, welche Arginine in msCD229 durch die ART2 ADP-ribosyliert werden, wurden die extrazellulären Arginine in msCD229 mittels zielgerichteter Mutagenese durch Lysine substituiert. Das strukturell ähnliche und ebenfalls positiv geladene Lysin wird durch die ART2 nicht ADP-ribosyliert. Das Protein msCD229 enthält 20 Arginine (**Abb.09**).

Hierbei wurden Expressionsvektoren erstellt, bei denen einzelne Arginine oder Argininpaare mutiert wurden. Um einen Austausch der Aminosäuren zu bewirken, wurden zwei homologe antiparallele Primer entworfen, welche anstatt des für Arginin kodierenden

Basentriplets ein für Lysin kodierendes Basentriplett enthielten. Es wurde jeweils das für Lysin kodierende Triplett ausgewählt, welches in seiner Sequenz dem Originaltriplett am ähnlichsten war. Flankiert wurde das Triplett von circa 15 Basen stromaufwärts und -abwärts, um ein gutes Annealing zu ermöglichen. Außerdem endete die letzte Base in beiden Richtungen immer mit einem Guanin oder Cytosin, da diese im Gegensatz zu den zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin oder Thymin drei Wasserstoffbrücken ausbilden. Nach der PCR wurden die Konstrukte in XL-10 Gold ultrakompetente E.Coli transformiert, vervielfältigt und anschließend sequenziert. Die Sequenz der mutierten Arginindublette RR254KK ist als Chromatogramm exemplarisch dargestellt (**Abb.09**). Im Abbildungsteil A ist oben ein Sequenzabschnitt des nicht mutierten msCD229, darunter ein Sequenzabschnitt des mutierten msCD229 dargestellt (**Abb.09, A**). Rot hervorgehoben sind die mutierten Basentriplets. Hierbei wurden die Triplets CGC und CGT jeweils zu AAA mutiert.

Die Expression der verschiedenen Konstrukte in HEK-293-Zellen sowie die ADP-Ribosylierung der mutierten CD229-Varianten wird im folgenden Unterkapitel behandelt.

A



B

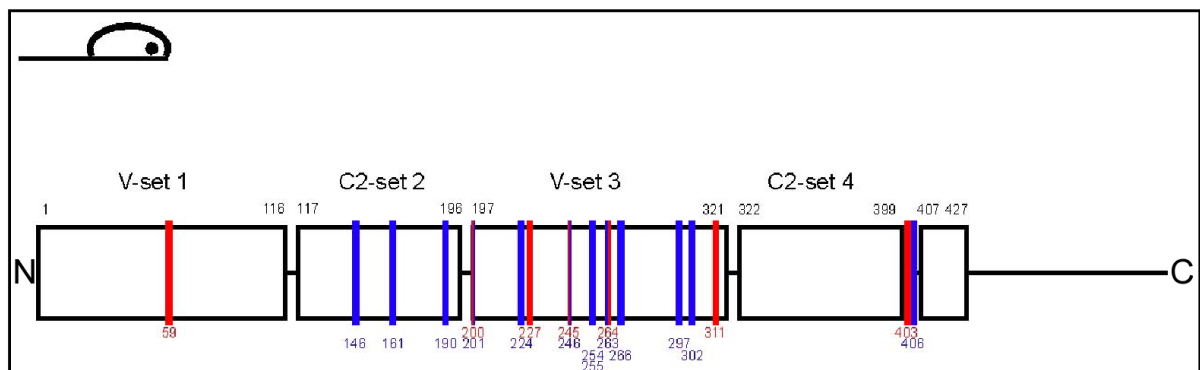


Abb.09 Die zielgerichtete Mutagenese der Arginine zu Lysin in msCD229: **A:** msCD229wt Plasmid-DNA wurde mittels eigens hierfür entworfener Primer mutiert. Hierbei wurden 5ng Template, je 12,5pmol Primer, 2,5U Pfu Turbo, 40nmol dNTPs einer PCR unterzogen. Die übrige Template-DNA wurde mittels 20U DpnI für 1h bei 37°C verdaut und anschließend in XL-10 Gold transformiert. Das Produkt der PCR wurde sequenziert. **B:** Schematisch sind die Domänenstruktur und die Lage der Arginine an einer skalierten und linearisierten Form des msCD229 dargestellt. Die Domänen V1 und V3 sind hierbei am längsten. Die Domäne V3 enthält die meisten Arginine. Die in Mensch und Maus konservierten Arginine sind rot, die nicht konservierten in blau dargestellt.

4.2.3 Expression der mutierten msCD229-Varianten und Analyse der ADP-Ribosylierung durch ART2

Mittels Zielgerichteter Mutagenese in Verbindung mit radioaktivem NAD ist es gelungen, Zielaminosäuren der ADP-Ribosylierung in Zielproteinen der ART2 zu identifizieren. Dies ist z.B. für den purinergen Rezeptor P2X7 gelungen (Adriouch et al. 2007). Dieselbe Methode wird hier angewendet, um die Zielaminosäuren für msCD229 zu identifizieren (**Abb.10+11**).

Je $1,6 \times 10^6$ HEK-293 Zellen wurden mit $1 \mu\text{g}$ ART2 und $4 \mu\text{g}$ msCD229, seinen Mutanten oder pcDNA6 als Leervektor mittels JetPEI kotransfiziert. Ein Teil der Zellen wurde im FACS auf die Expression der transfizierten Proteine überprüft. Hierfür wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen msCD229 (30CO7) und gegen msART2 (R8A102>artIg-FITC) angefärbt (**Abb.10**).

Die übrigen Zellen wurden für 30min bei 4°C mit $2,5 \mu\text{Ci/Ansatz}$ ^{32}P -NAD inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur lysiert. Nach einem Preclear wurde auf msCD229 (30CO7) immunpräzipitiert. Nach Größenfraktionierung der Proteine in der SDS-PAGE wurden die Gele Coomassie-gefärbt und autoradiographiert. Die Coomassiefärbungen sind exemplarisch für msCD229 als Wildtypprotein dargestellt (**Abb.11**).

Die FACS-Messungen sind wie die Autoradiographien nach A, B und C gruppiert. In den Histogramm Plots der ersten Messreihe (**Abb.10, A**) sieht man, dass sowohl msCD229 als auch die Mutanten in ähnlicher Stärke exprimiert werden (obere Zeile). Nur die Zellen der Kotransfektion mit pcDNA6 zeigen wie erwartet kein msCD229 auf ihrer Zelloberfläche. Zur Kontrolle ist die Expressionsstärke des Wildtypproteins dem Plot der jeweiligen Mutante grau unterlegt. Das katalytische Enzym ART2 wird auf allen transfizierten Zellen in ähnlicher Ausprägung exprimiert, wobei es bei der Kotransfektion mit dem Leervektor pcDNA6 zu einer vermehrten Expression der ART2 kommt. Dies liegt nicht an dem Leervektor, da dieser Effekt auch nach Einzeltransfektion nur mit der ART2 beobachtet werden kann. Möglicherweise führt eine Einzeltransfektion im Gegensatz zu einer

Kotransfektion dazu, dass die verfügbaren Ressourcen der Zelle vermehrt für die Expression eines Proteins, im Gegensatz zur Expression mehrerer Proteine genutzt werden. Eine andere mögliche Erklärung könnte sein, dass msCD229 zu einer Runterregulation von ART2 führt, beispielsweise durch proteolytische Freisetzung (Shedding) der ART2. Die Expression des Wildtyps und der Mutanten der zweiten Messreihe (**Abb.10, B**) liefert ein sehr ähnliches Ergebnis wie die erste Messreihe. Allerdings zeigt sich hier ein höheres Expressionsniveau der Mutante RR254KK, welche als Einzige der Mutanten bezüglich ihres Expressionsniveaus heraussticht. In der letzten Messreihe (**Abb.10, C**) verhält es sich wieder wie in der ersten Messreihe, msCD229 wird ähnlich stark wie die Mutanten exprimiert und kommt als Kontrolle nicht bei der Kotransfektion von ART2 und des Leervektors pcDNA6 vor. Die Expressionsstärke der ART2 ist auch in allen Ansätzen ähnlich. Es kommt wie üblich nur auf den mit pcDNA6 kotransfizierten Zellen vermehrt vor. Damit ist eine gute Vergleichbarkeit zwischen dem msCD229 Wildtypprotein und der Mutanten in allen drei Messreihen gegeben.

Aus den Autoradiographien kann man Rückschlüsse darüber ziehen, welche Arginine nicht mehr ADP-ribosyliert werden, da es bei der entsprechenden Mutante durch den verminderten oder fehlenden Einbau von ^{32}P -ADP-Ribose zu einer Signalabschwächung der Spur kommt (**Abb.11**). Auf der linken Seite sind die Gesamtzelllysate, auf der rechten Seite die Immunpräzipitate und das Preclear des Wildtyps aufgeführt. Bevorzugt wurden erst die in Mensch und Maus konservierten Arginine mutiert. In der ersten Messreihe (**Abb.11, A**) erkennt man deutlich das Signal des ^{32}P -ADP-ribosylierten msCD229 bei ca. 100kDa sowohl in den Gesamtzelllysaten als auch in den Immunpräzipitaten. Links ist der Wildtyp eingezeichnet. Auffällig ist zusätzlich ein weiteres Signal bei etwa 40kDa, welches z.B. einem bei der Ernte der Zellen durch den Trypsinverdau entstandenem Fragment von msCD229 oder einem kopräzipitierten Protein entsprechen könnte. In den HEK-293-Zellen ist msCD229 nach Kotransfektion ein Haupttarget der ART2, wie an den Gesamtzelllysaten zu erkennen ist. Die Spur der ART2-Einzeltransfektion zeigt bei 30kDa eine Bande, was zur bekannten autokatalytischen Aktivität des Enzyms passt. Das Preclear und die Immunpräzipitation von msCD229 aus der ART2-Einzeltransfektion liefern in der Autoradiographie keine Signale von unspezifisch bindenden Proteinen. Exemplarisch sind die Coomassiefärbungen des Wildtyps dargestellt, wobei sowohl das Gesamtzelllysat als auch die Spuren der Immunpräzipitate viele banden verschiedener Proteine zeigen. Es sind auch die schwere und leichte Kette des zur Präzipitation genutzten Antikörpers zu sehen.

Vergleicht man die Signalstärke des msCD229 Wildtyps und der konservierten Mutanten in den Autoradiographien, erkennt man in (**Abb.11, A**) nur geringe Signalschwankungen bei den Mutanten, sodass keines der in dieser Messreihe mutierten Arginine eine sichere Zielaminosäure der ART2 darstellt. Die Autoradiographie der zweiten Messreihe zeigt ein anderes Bild (**Abb.11, B**). Wieder ist das charakteristische Bandenmuster zu erkennen mit der Hauptbande bei ca. 100kDa und der Nebenbande bei ca. 40kDa. Diesmal sind allerdings sowohl im Gesamtzelllysat als auch in der Immunpräzipitation der nicht konservierten Doppelmutante RR254KK eine deutliche Abschwächung und Veränderung des Signals zu beobachten. Die FACS-Untersuchung zeigte bei dieser Mutante eine eher stärkere Expression im Vergleich zu den anderen Mutanten. Die Signalabschwächung ist damit passend zu einer deutlich verminderten ADP-Ribosylierung der Mutante. Die verstärkte Expression der Mutante könnte auf einen Zusammenhang zwischen ADP-Ribosylierung von msCD229 und seiner Zelloberflächenexpression hindeuten. Außerdem fällt auf, dass das zweite Signal bei etwa 40kDa bei dieser Mutante auch verschwindet, ein Indiz dafür, dass die Bande ein Fragment von msCD229 darstellt. Da noch eine schwache Bande um 100kDa erkennbar ist, liegt die Vermutung nahe, dass CD229 an einem weiteren Arginin als dem Argininpaar RR254 ADP-ribosyliert wird. Betrachtet man abschließend die letzte Messreihe (**Abb.11, C**), so erkennt man bei dem Wildtyp und den Mutanten wieder das typische Bandenmuster mit den beiden Banden bei 100kDa und bei 40kDa, ohne Nachweis eines Signalverlustes der Mutanten von msCD229 in den Gesamtzelllysaten oder Immunpräzipitaten. In dieser Messreihe ist die Bande des Wildtypproteins etwas schwächer im Vergleich zu den Mutanten.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass mindestens eines der Arginine der Doublette RR254 ADP-Ribosyliert wird. Die vermehrte Expression der Mutante RR254KK in Kotransfektion mit der ART2 deutet auf einen Zusammenhang zwischen der ADP-Ribosylierung und dem Expressionsniveau von CD229 hin.

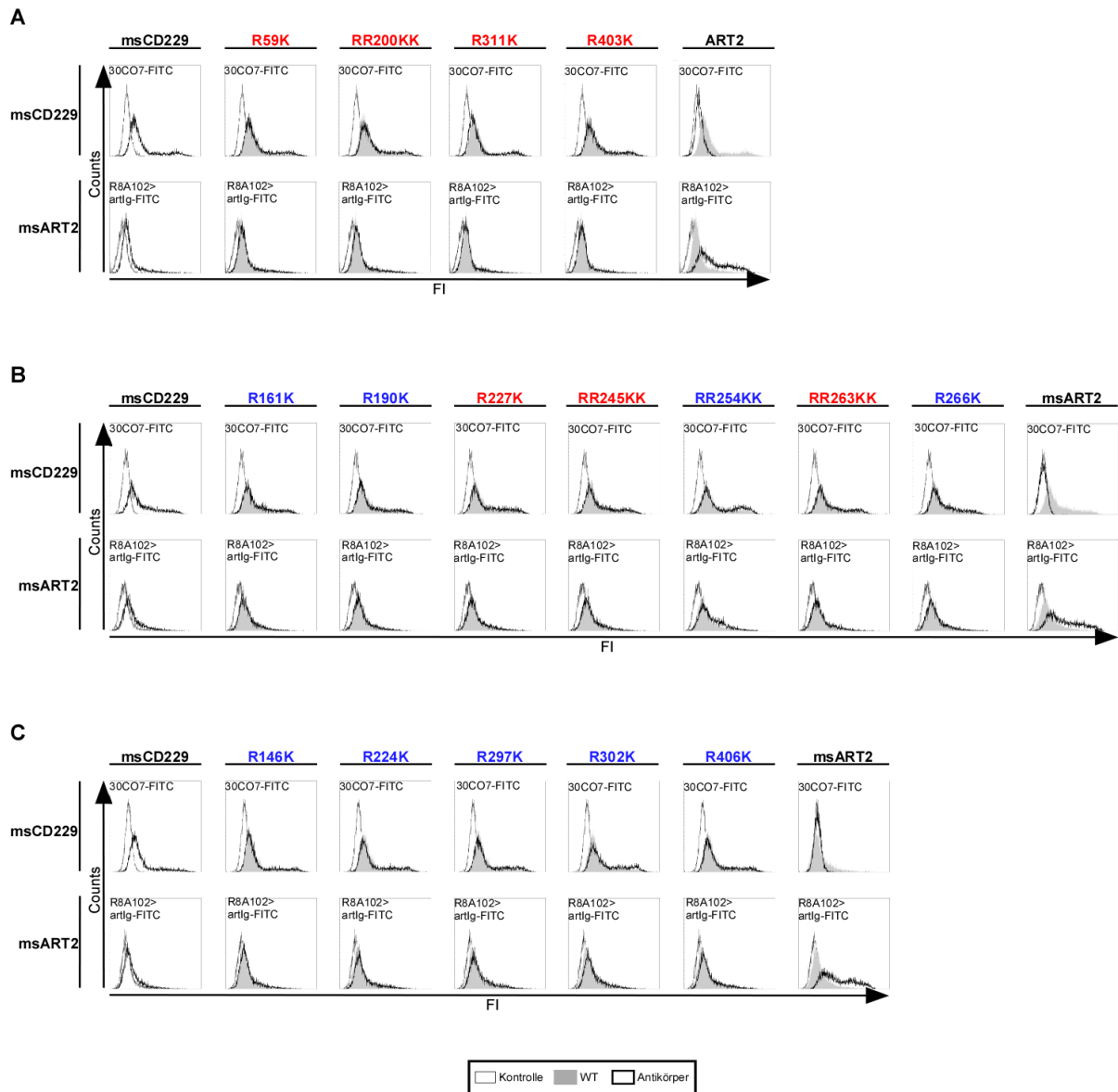


Abb.10 Expression von msCD229 und seinen Mutanten in HEK-293-Zellen: A, B, C: Je ca. $1,6 \times 10^6$ HEK-293-Zellen wurden mit $1 \mu\text{g}$ ART2 und $4 \mu\text{g}$ msCD229wt, Mutante von msCD229 oder mit pcDNA6 DNA mittels JetPEI transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen geerntet und mit Antikörpern gegen msCD229 (30CO7) und gegen ART2.2 (R8A102>artlg-FITC) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und im FACS gemessen. In den Histogramm-Plots ist der Wildtyp der aktuellen Messung grau unterlegt. Rot sind die in Mensch und Maus konservierten Arginine dargestellt. Blau dargestellt sind die nicht konservierten Arginine.

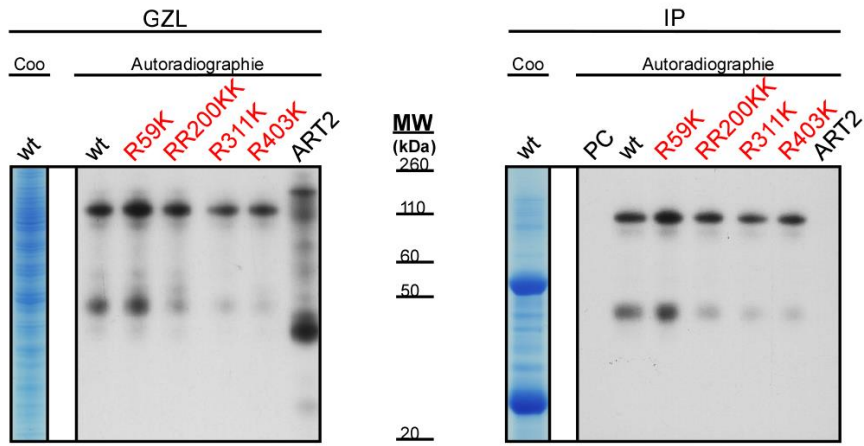
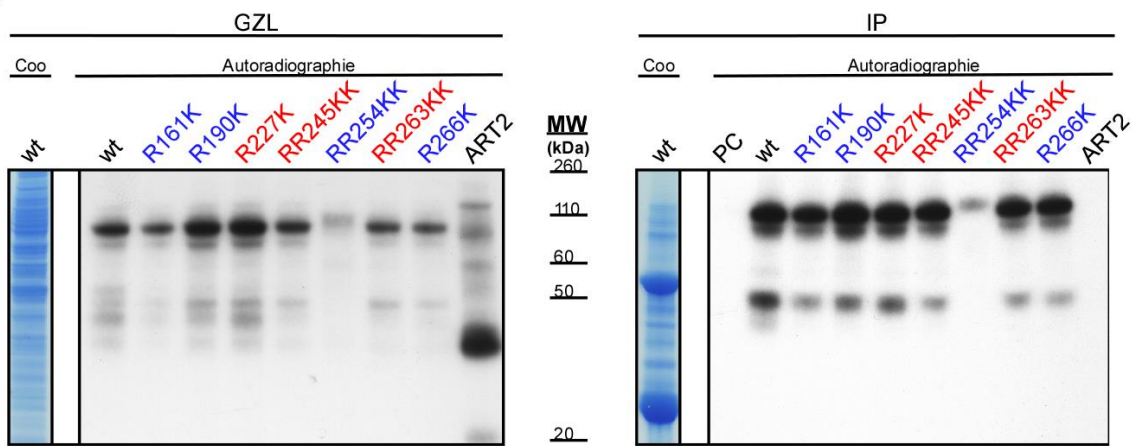
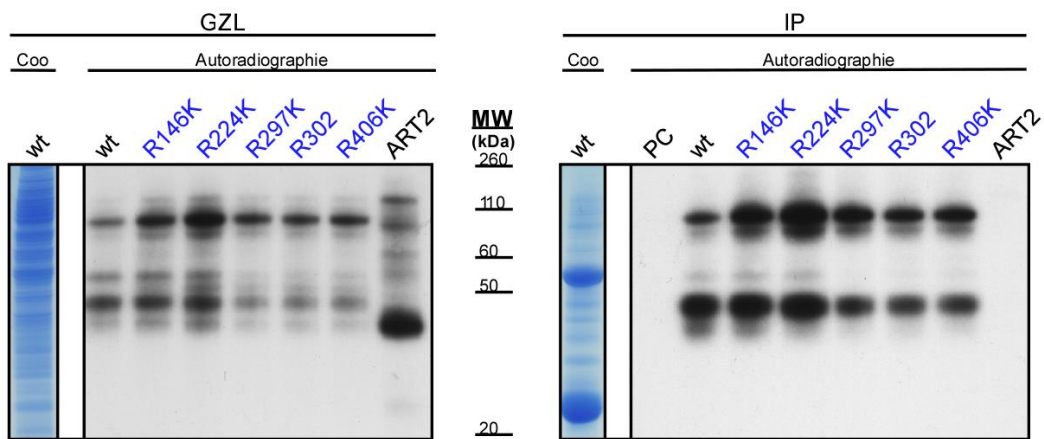
A**B****C**

Abb.11 Die ADP-Ribosylierung von msCD229 und seinen Mutanten: A, B, C: Je etwa 2×10^6 der transfizierten HEK-293-Zellen wurden für 30min bei 4°C mit $2,5 \mu\text{Ci } ^{32}\text{P-NAD}$ inkubiert und anschließend in PBS (-/-) 1% Tx100 lysiert. Nach Zentrifugation wurde das Gesamtzelllysate nach einem Preclear auf msCD229 (30CO7) immunpräzipitiert. Das Gesamtzelllysate, das Preclear und die Präzipitate wurden in einer SDS-PAGE größenfraktioniert. Die Gele wurden Coomassiegefärbt, getrocknet und autoradiographiert. Die Coomassiefärbung ist exemplarisch jeweils für den Wildtyp angegeben. Die Filme wurden unterschiedlich lang belichtet: A: GZL: 72h, IP: 24h; B: GZL: 48h, IP: 48h; C: GZL: 48h, IP: 48h;

In diesem Kapitel wurde eine auf NTB-A modellierte 3D-Struktur von msCD229 dargestellt, welche die Zugänglichkeit verschiedener Arginine für die ART2 vorhersagen soll. Außerdem wurde über zielgerichtete Mutagenese und im Radioaktivversuch mindestens eine ADP-Ribosylierungsstelle an dem Argininpaar RR254 in msCD229 identifiziert, welche auch im Strukturmodell gut zugänglich scheint.

4.3 Etablierung von Verfahren zur funktionellen Untersuchung der ADP-Ribosylierung von CD25 und CD229

Das folgende Kapitel befasst sich mit dem Einfluss der ADP-Ribosylierung von CD25 und CD229 auf deren Funktion. Im ersten Teil wurde der Einfluss der ADP-Ribosylierung von CD25 auf die STAT5-Phosphorylierung in CTLL-2-Zellen untersucht (**Abb.12**). Im zweiten Teil wurden CD229-Fc-Fusionsproteine für zukünftige funktionelle Untersuchungen generiert (**Abb.13**).

4.3.1 Untersuchung des Einflusses der ADP-Ribosylierung von CD25 auf die Phosphorylierung von STAT5 in IL-2-abhängigen CTLL-2-Zellen

CD25 ist die α -Rezeptoruntereinheit des trimeren IL-2-Rezeptorkomplexes, welcher aus einer α -, β - und γ -Untereinheit besteht. CD25 bestimmt hierbei die Affinität des Rezeptorkomplexes zu IL-2, die Signaltransduktion hingegen erfolgt über die β - und γ -Untereinheit (Rickert et al. 2005). Die Bindung von IL-2 führt zur Phosphorylierung des Proteins STAT5 (Signal-Transducer-and-Activator-of-Transcription 5), welches dimerisiert und in den Zellkern transloziert.

Um zu bestimmen, welchen Einfluss NAD auf die CD25-vermittelte IL2-Bindung und die darauf folgende Signalkaskade hat, wurden die IL-2-abhängig wachsenden CTLL-2-Lymphomzellen verwendet. Diese stammen von cytotoxischen T-Lymphozyten aus

C57Bl/6-Mäusen (Gillis & Smith 1977). Es wurden sowohl Wildtypzellen (CTLL2_wt), welche kein ART2 exprimieren, als auch stabile msART2-Transfektanten (CTLL2_msART2) verwendet (**Abb.12**).

CTLL2_msART2 (links) und CTLL_wt (rechts) Zellen wurden für 4 Stunden ohne IL-2 bei 37°C inkubiert, um die Phosphorylierung von STAT5 auf ein Niveau zu senken, welches dem unstimulierten Zellen entspricht. Anschließend wurden die Zellen aufgeteilt, ein Aliquot wurde mit, ein Aliquot ohne ART2-inhibierende Nanobodies (VHH: s+16old) für 15min bei 37°C inkubiert. Hiernach wurde ein Aliquot beider Zelllinien mit oder ohne 50µM NAD für 15min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot beider Zelllinien mit oder ohne 20U/ml IL-2 für 15min bei 37°C stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, sowie intrazellulär mit anti-phospho-STAT5-Antikörpern angefärbt. Die Zellen wurden zusätzlich auf CD25 (PC61) angefärbt.

Die Analyse ergab, dass NAD in Abwesenheit von IL-2 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von STAT5 im Wildtyp und ART2-transfizierten CTLL2-Zellen hat (**Abb.12**; Zeile 1). Dies deutet darauf hin, dass die basale STAT5-Phosphorylierung durch die Inkubation mit NAD nicht weiter reduziert werden kann. Zugabe von IL-2 führt sowohl bei CTLL2_wt Zellen als auch in CTLL2_msART2-Zellen zur Erhöhung der STAT5-Phosphorylierung. Diese wird durch Vorinkubation mit NAD in CTLL2_msART2-Zellen, nicht aber in CTLL2_wt-Zellen vermindert (Zeile 2). Wird ART2 durch Vorinkubation mit dem Nanobody s+16old (VHH) blockiert, wird die NAD-bedingte Verminderung der STAT5-Phosphorylierung in CTLL2_msART2-Zellen aufgehoben (Zeile 3). Dies zeigt, dass die Inhibition der ART2-Aktivität durch die VHH sehr effektiv und komplett ist, andererseits ist dies eine Kontrolle dafür, dass die Inhibition der STAT5-Phosphorylierung ART2-vermittelt ist. Es konnte hierbei ausgeschlossen werden, dass die verminderte STAT5-Phosphorylierung auf unterschiedlichen CD25-Expressionsraten beruht, da alle Ansätze ein ähnliches Expressionniveau von CD25 aufwiesen (Zeile 4). NAD hat somit einen ART2-abhängigen inhibierenden Effekt auf die CD25-vermittelte Signaltransduktion von IL-2 (Hann 2008; Teege et al. 2015).

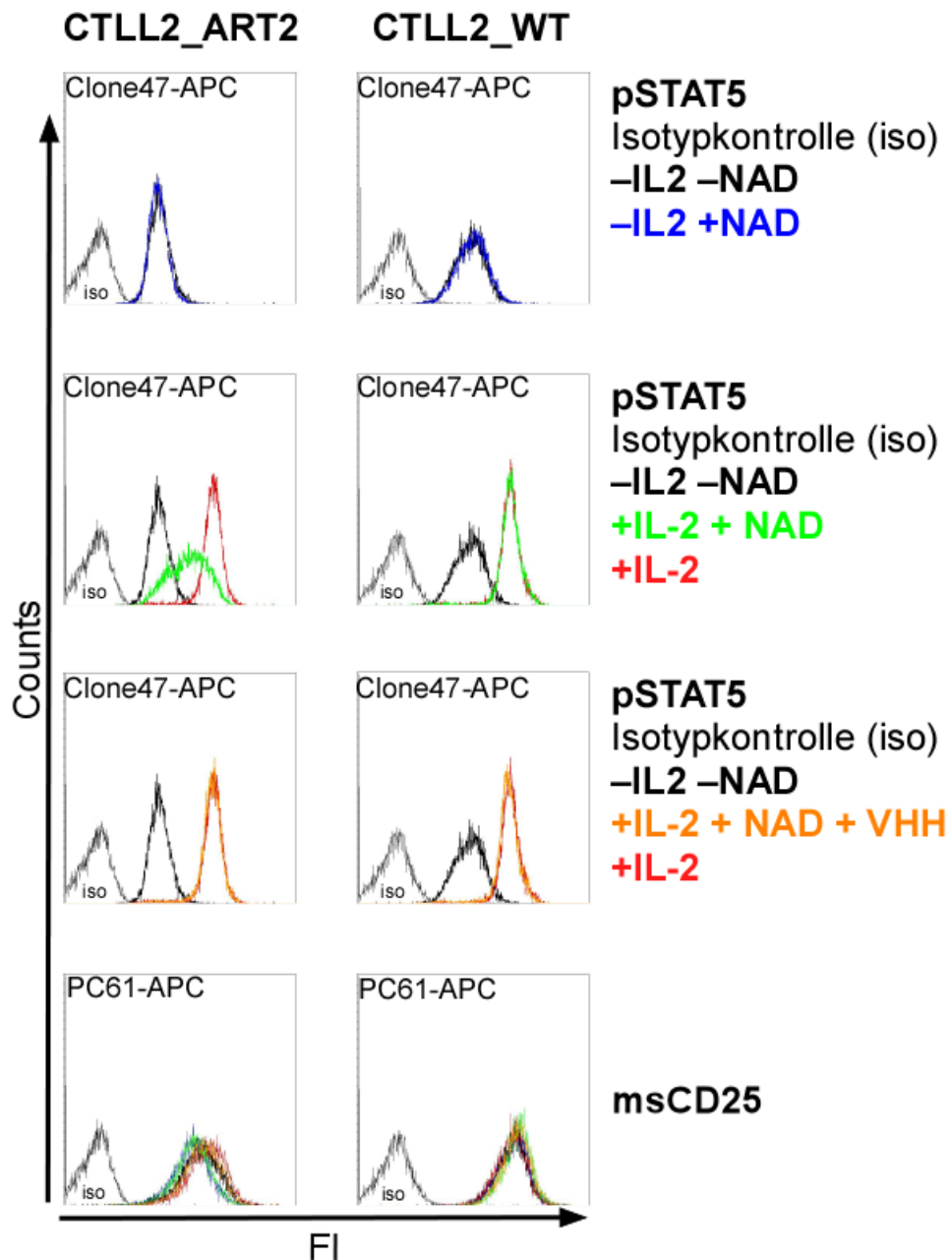


Abb.12 Der Einfluss von NAD auf die Phosphorylierung von STAT5: 1×10^7 CTLL2msART2 (links) und 1×10^7 CTLL2wt (rechts) wurden 4h ohne IL-2 vorinkubiert. CTLL2msART2 und CTLL2wt-Zellen wurden für 15min bei 37°C mit oder ohne 10µg/ml VHH s+16 old inkubiert, anschließend mit oder ohne 50µM NAD inkubiert. Hiernach wurden Teile beider Zellreihen mit oder ohne 20U/ml IL-2 inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und intrazellulär mit anti-STAT5-P (Clone47) angefärbt. Zusätzlich wurde CD25 (PC61) extrazellulär angefärbt.

4.3.2 Klonierung und Expression von msCD229 msIgG1-Fc-Fusionsproteinen

Zur Identifizierung von ADP-Ribosylierungsstellen eignet sich der Einsatz von massenspektrometrischen Analyseverfahren (Sabrina Laing et al. 2011).

Durch die Verwendung von CD229-Fc-Fusionsproteinen konnte gezeigt werden, dass CD229 homophil interagiert (Romero et al. 2005). Daraus ergibt sich die Frage, ob diese homophile Interaktion durch die ADP-Ribosylierung von CD229 beeinflusst wird. Zur Untersuchung dieser Fragestellung könnten sich lösliche CD229-Fc-Fusionsproteine eignen. Zudem lassen sich Fc-Fusionsproteine in der Regel gut rekombinant exprimieren, was für die massenspektrometrische Analyse zur Identifikation der Zielaminosäuren der ADP-Ribosylierung von CD229 genutzt werden kann.

Im oberen Teil der Abbildung (**Abb.13, A**) sind die klonierten Fusionsproteine schematisch dargestellt. Die Fc-Domänen des Antikörpers sind blau markiert. Auf diesen Teil des Antikörpers sind entweder alle vier extrazellulären Domänen (msCD229V1-C4-Fc) oder nur die beiden N-terminalen Domänen (msCD229V1C2-Fc) von msCD229 kloniert. Alle Konstrukte enthalten einen N-terminalen FLAG-tag. Unter den Konstrukten sind die Vektoren angegeben, in denen sie vorliegen.

Für die Klonierung der Fc-Fusionsproteine wurden Amplifikationsprimer erstellt, die die extrazellulären Abschnitte von msCD229 amplifizieren und am 5'-Ende eine Schnittstelle für BglII und am 3'-Ende eine Schnittstelle für XhoI integrieren. Diese wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel aufgereinigt. Sowohl das Amplifikat als auch der Zielvektor pME (welcher die Fc-Domäne des Maus IgG1 enthält) wurden für 2 Stunden bei 37°C mit je 20U der Restriktionsenzyme BglII und XhoI verdaut und nach Gelelektrophorese aufgereinigt. Hiernach wurden das Amplifikat und der Zielvektor für 1h bei 25°C mit 1U T4-Ligase ligiert, in *E. coli* transformiert und vervielfältigt. Der Testverdau erfolgte mit BglII und XhoI. Die Konstrukte wurden zur Kontrolle sequenziert. Auf diesem Weg wurden für jedes Konstrukt vier Klone gewonnen, wovon je zwei probeexprimiert wurden.

Um zu untersuchen, ob die Fusionsproteine exprimiert werden, wurden je $1,6 \times 10^6$ HEK-293-Zellen mit 5µg Plasmid-DNA von je einem Klon der Fusionsproteine oder zur Kontrolle mit eGFP transfiziert (**Abb.13, B**). Der Überstand wurde auf einem nicht reduzierenden SDS-PAGE-Gel größenfraktioniert und mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

Im Coomassie-Gel lassen sich die Fusionsproteine im unaufgereinigten Überstand nicht gut nachweisen, da diese in niedriger Konzentration vorliegen. Nach Immunpräzipitation mittels M2-Sepharose lassen sich die Fc-Proteine bei ca. 250kDa (msCD229V1-C4-Fc) und bei ca. 150kDa (msCD229V1C2-Fc) nachweisen. In der Kontrolle (eGFP) sind diese Banden nicht vorhanden. Zudem zeigt sich, dass sich jeweils beider der zwei ausgewählten Klone gut exprimieren lassen. In den Spuren der Immunpräzipitationen erkennt man zusätzlich die schwere und leichte Kette der M2-Sepharose (bei 50kDa und bei 25kDa).

Um msCD229V1C2-Fc in ausreichend großen Mengen herzustellen (**Abb.13, C**), wurden je 2×10^7 HEK-293-Zellen mit jeweils 20 μ g Plasmid-DNA transfiziert und in eine Mehrbodenzellkulturflasche überführt (500ml Nährmedium). Nach einer Gesamtkulturzeit von 5 Tagen wurde das Fc-Fusionsprotein über den FLAG-Tag aufgereinigt. Die einzelnen Fraktionen (Wash, Void und Eluat) wurden in einer nicht reduzierenden SDS-PAGE größenfraktioniert und Coomassie-gefärbt.

Das Gel zeigt in den Fraktionen E1 und E2 deutliche Proteinbanden bei ca. 150kDa, welche dem Fusionsprotein (msCD229V1C2-Fc) entspricht (**Abb.13, C**). Zudem erwies sich das Aufreinigungsprotokoll als sehr effektiv, da kaum Proteinverunreinigungen in den Eluaten E1 und E2 vorhanden waren. Anhand des semiquantitativen Proteinmarkers (SM), lässt sich eine Gesamtmenge von etwa 200 μ g msCD229V1C2-Fc abschätzen, welche gut mit der nachfolgenden Proteinbestimmung mittels BCA-Kit korreliert.

In diesem Versuchsansatz konnten mittels Mehrbodenflaschenkultur (500ml) ausreichende Mengen an Fusionsprotein für weitere Versuche zur funktionellen Charakterisierung von msCD229 bereitgestellt werden.

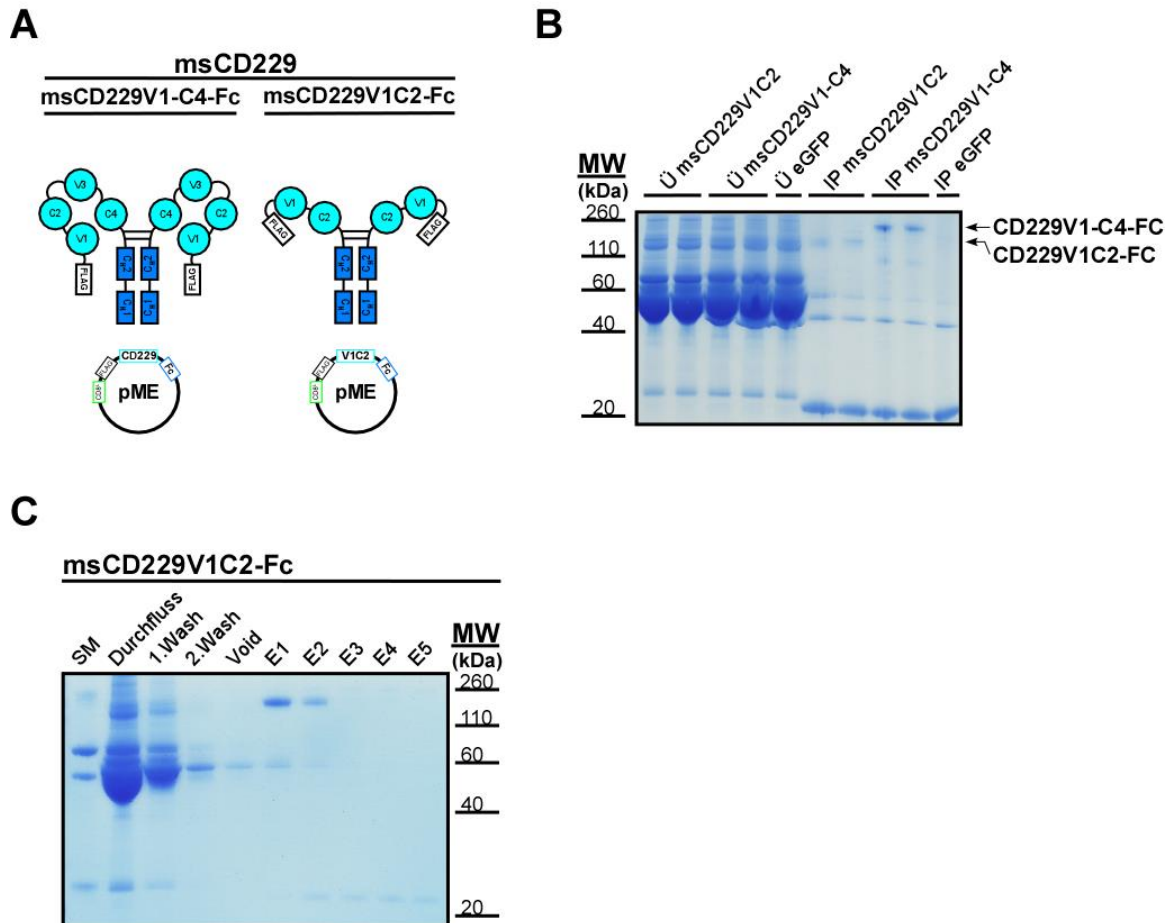


Abb.13 Klonierung und Expression von msCD229 mslgG1-Fc Fusionsproteinen: **A:** Schematische Übersicht über die klonierten Fc-Fusionsproteine. Es wurde der Fc-Teil von mslgG1 einschließlich der Hinge-Region mit dem extrazellulären Anteil von CD229 fusioniert. Hierbei wurden sowohl vier Domänen (msCD229V1-C4-Fc) wie auch zwei Domänen (msCD229V1C2-Fc) Fusionsproteine hergestellt. **B:** Nach Testexpression in HEK-Zellen wurde der Überstand (Ü) und die immunpräzipitierten Fc-Fusionsproteine (IP) mittels nicht reduzierender SDS-PAGE aufgetrennt und angefärbt. **C:** Zur Produktion von ausreichenden Mengen des Fusionsproteins wurde eine Großkultur angelegt und das produzierte msCD229V1C2-Fc mittels Immunoaffinitätschromatographie aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte in fünf Elutionsschritten (E1-E5) nach zweimaligem Waschen (Wash) und dem Void.

In diesem Kapitel konnte in einem ersten funktionellen Funktionsansatz gezeigt werden, dass die ART2-vermittelte ADP-Ribosylierung einen hemmenden Einfluss auf die IL2/CD25/STAT5-Signalkaskade hat. Zur Vorbereitung von Funktionsversuchen für CD229 wurden CD229-Fc-Fusionsproteine kloniert und rekombinant in HEK-Zellen in größeren Mengen exprimiert. Diese können in weiteren Versuchen eingesetzt werden, um den Einfluss der ADP-Ribosylierung auf dessen Funktion zu untersuchen, sowie mittels Massenspektrometrie die ADP-Ribosylierungsstellen an CD229 zu identifizieren.

5 Diskussion

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Zelloberflächenproteine CD25 und CD229 sowohl auf Lymphomzellen als auch auf primären T-Zellen wichtige Ziele der ART2 sind. Zudem konnte das Argininpaar RR254 auf CD229 als Ziel der ADP-Ribosylierung identifiziert werden. Schließlich wurde nachgewiesen, dass die ADP-Ribosylierung von CD25 einen Einfluss auf seine Signalkaskade hat. Um weitere funktionelle Analysen für die homophile Interaktion von CD229 durchzuführen, wurden CD229-Fc-Fusionsproteine kloniert und exprimiert.

In der folgenden Diskussion wird zunächst auf die Physiologie der NAD-Freisetzung aus Zellen und auf die damit verbundenen experimentellen Schwierigkeiten für die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zur ADP-Ribosylierung von Membranproteinen eingegangen. Im zweiten Abschnitt werden Parameter diskutiert, welche die ADP-Ribosylierung von unterschiedlichen Membranproteinen beeinflussen können. Mögliche funktionelle Konsequenzen der ADP-Ribosylierung werden im dritten Abschnitt diskutiert. Schließlich wird ein Ausblick auf mögliche weiterführende Untersuchungen gegeben.

5.1 Die Physiologie der ADP-Ribosylierung und NAD-Freisetzung

Im extrazellulären Milieu kann NAD schon in niedrigen Konzentrationen einen Einfluss auf die Homöostase von T-Zellen haben. Die ART2.2 ist ein konstitutiv aktives Enzym. Die Aktivität der ART2.1 nimmt unter reduzierenden Bedingungen deutlich zu. NAD wird wahrscheinlich aus verschiedenen Quellen und auf verschiedene Reize freigesetzt. Da Zellen große Mengen an NAD enthalten, stellt deren Lyse potentiell die größte Quelle von extrazellulärem NAD dar. Das extrazelluläre NAD aus lysierten Zellen ist in der Lage, die NAD-induzierte Apoptose (NICD=NAD-induced cell death) (Seman et al. 2003; Scheuplein et al. 2009) über die ART2 und P2X7 zu aktivieren. Außerdem kann NAD über den Halbkanal Connexin 43 freigesetzt werden, der sich öffnet, wenn Zellen unter Stress stehen (Bruzzone et al. 2001; Contreras et al. 2002). Diese Mechanismen führen dazu, dass im entzündeten Gewebe die NAD-Konzentrationen erhöht ist (Adriouch et al. 2007).

Die Beobachtung, dass auch die Präparation und das Passagieren von Zellen zu einer NAD-Freisetzung führen kann, muss bei der Interpretation der in dieser Arbeit dargestellten Experimente berücksichtigt werden (Rissiek et al. 2014). So könnten Untersuchungen zur ADP-Ribosylierung von CD229-Mutanten in transfizierten HEK-Zellen mit ³²P-NAD oder etheno-NAD durch bei der Zellernte freigesetztes NAD beeinflusst werden. Durch die nur

näherungsweise mögliche Gleichbehandlung von Zellen könnte in verschiedenen Ansätzen unterschiedlich viel NAD freigesetzt werden. Eine dadurch bedingte Vor-ADP-Ribosylierung von Argininen in CD229 und anderen Membranproteinen würde eine folgende Inkorporation von ^{32}P -ADP-Ribose oder etheno-ADP-Ribose blockieren. Dies könnte zu einer unterschiedlich starken Abschwächung der radioaktiv markierten Banden führen und somit die Vergleichbarkeit der Signale beeinträchtigen. Um diesem Problem zu begegnen, wurden in dieser Arbeit mehrere unabhängige Untersuchungen zur Ermittlung der ADP-Ribosylierungsstellen von CD229 durchgeführt. Es ist somit unwahrscheinlich, dass die deutlich schwächere radioaktive Markierung der RR254-Mutante von CD229 auf einer starken Vor-ADP-Ribosylierung beruht.

Eine elegante Möglichkeit, die Vor-ADP-Ribosylierung nachzuweisen, wäre der Einsatz eines Antikörpers gegen ADP-Ribosyl-Arginin (Osago et al. 2008). Ein derartiger Antikörper könnte eingesetzt werden um ADP-Ribosyl-Arginin direkt an Membranproteinen nach Inkubation der Zellen mit unmarkiertem NAD zu detektieren. So könnte man die Signalschwankungen, die bei Anwendung von ^{32}P -NAD oder etheno-NAD durch Vor-ADP-Ribosylierung entstehen, erfassen.

5.2 Die ADP-Ribosylierung von Membranproteinen

Die Familie der ADP-Ribosyltransferasen lässt sich einteilen in intrazelluläre und extrazelluläre ARTs (Hottiger et al. 2010). Die extrazellulären ARTs (ART1, ART2.1, ART2.2 und ART5) ADP-ribosylieren andere Membranproteine an Argininresten (Glowacki et al. 2002). Ob ein Membranprotein ein Zielprotein für die ADP-Ribosylierung darstellt, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zum einen ist die Expressionsstärke des ART-Enzyms und des Zielproteins auf der Zelle entscheidend. Somit ist es wichtig, die Expressionsstärke dieser Proteine z.B. mittels Durchflusszytometer zu erfassen. Dies gilt auch für die Ermittlung von ADP-Ribosylierungsstellen mittels vergleichender Untersuchung von zielgerichteten Arginin-Mutanten eines Targetproteins in transfizierten Zellen. Denn ein reduziertes Signal in der Autoradiographie könnte nicht nur auf eine reduzierte ADP-Ribosylierung, sondern auch auf einer verminderten Expression des Membranproteins beruhen. Da die Mutante RR254KK von CD229 in FACS-Untersuchungen sogar stärkere Signale gab als der Wildtyp und andere Mutanten, kann eine deartige Fehlinterpretation in diesem Fall ausgeschlossen werden (**Abb.10**).

Mittels Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit die Expression bekannter ART-Targets auf verschiedenen Maus-Lymphomzelllinien untersucht, hierunter Yac-1, EL4 und

DC27.10. Dabei ergab sich, dass CD229 auf diesen Zellen jeweils relativ stark exprimiert wird, während andere ART-Targets wie P2X7, CD11a und CD25 unterschiedlich stark exprimiert werden (**Abb.05**). Untersuchungen nach Inkubation dieser Zellen mit ^{32}P -NAD zeigten, dass mehrere Membranproteine ADP-ribosyliert werden. Die Ergebnisse von Immunpräzipitationen zeigen, dass es sich bei zwei prominenten Banden um CD25 und CD229 handelt. Dies deutet darauf hin, dass diese beiden Proteine bevorzugte Ziele der ADP-Ribosylierung sind. CD229 konnte auch in primären T-Zellen und regulatorischen T-Zellen als ein Haupttarget der ADP-Ribosylierung identifiziert werden (**Abb.07**).

Ein weiteres Kriterium dafür, ob ein Protein ADP-ribosyliert werden kann, ist die Erreichbarkeit des Zielproteins für die ART. Es wird postuliert, dass die Zellmembran nicht nur aus einem Meer von Lipiden besteht, in dem Transmembranproteine frei umher schwimmen, sondern auch Inseln von Mikrodomänen (Lipid rafts) enthält, in denen die Beweglichkeit von Proteinen eingeschränkt ist und Signalübertragungen reguliert werden (Simons & Ikonen 1997). Ob ein Protein dabei mit Mikrodomänen assoziiert, hängt u.a. von der Sequenz im Bereich des Transmembranankers und dem Typ des Transmembranankers ab (Simons & Toomre 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die ART2 aufgrund ihres GPI-Membranankers mit Lipid rafts assoziiert. Dadurch wird das Spektrum der ART2-Zielproteine vornehmlich auf Lipid raft-assoziierte Membranproteine reduziert (Bannas et al. 2005).

Weitere Faktoren, die beeinflussen, ob sich ein Protein ADP-ribosylieren lässt, sind die Aminosäuresequenz des Zielproteins und die sich daraus ergebende Positionierung der Arginine in der Tertiärstruktur (Zolkiewska 2005; S Laing et al. 2011). Da die ART2 argininspezifisch ist, muss das Zielprotein ein dem Enzym zugängliches Arginin an der Proteinoberfläche enthalten. Außerdem müsste das Zielarginin den richtigen Abstand zur Zellmembran haben. Die ART2 besteht aus einer katalytischen Domäne, die über eine relativ kurze, ca. 12 Amino-Säuren zählende Verbindung mit dem GPI-Anker verknüpft ist (Christoph Mueller-Dieckmann et al. 2002). Dies könnte die Reichweite des katalytischen Zentrums der ART senkrecht zur Membranebene begrenzen.

Bisherige Ergebnisse deuten an, dass es kein gemeinsames Sequenzmotiv gibt, welches die ADP-Ribosylierungsstellen in den Zielproteinen der ART2 auszeichnen. Maus-P2X7 wird durch die ART2 an Arginin R125 und an Arginin R133 ADP-ribosyliert, wobei nur die ADP-Ribosylierung von R125 den Ionenkanal aktivieren kann (**Abb.14**) (Adriouch et al. 2008). Für den humanen Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- α) wurde gezeigt, dass dieser durch die ART1 an zwei Argininen ADP-ribosyliert wird (Sabrina Laing 2010). Es konnte

zudem gezeigt werden, dass murines CD25 durch die ART2 an bis zu vier Zielargininen (R32, R35, R67 und R140) ADP-ribosyliert werden kann (Teege et al. 2015). Dabei beeinträchtigt die ADP-Ribosylierung von CD25 an R35 die Bindung von IL-2 an CD25, während die ADP-Ribosylierung von TNF- α wiederum die Bindung von TNF- α an den TNFR1 hemmt. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Untersuchungen deuten an, dass auch CD229 möglicherweise an mehr als einer Stelle ADP-ribosyliert wird, da die Mutagenese des Aminosäurenpaares RR254KK immer noch zu einem, wenn auch schwachen, Signal in der Autoradiographie führt.

(Abb.14) zeigt eine schematische Darstellung der in dieser Arbeit und der in anderen Arbeiten ermittelten ADP-Ribosylierungsstellen in CD229, CD25 und P2X7 im Kontext von 3D-Strukturmodellen dieser Proteine und der ART2.2.

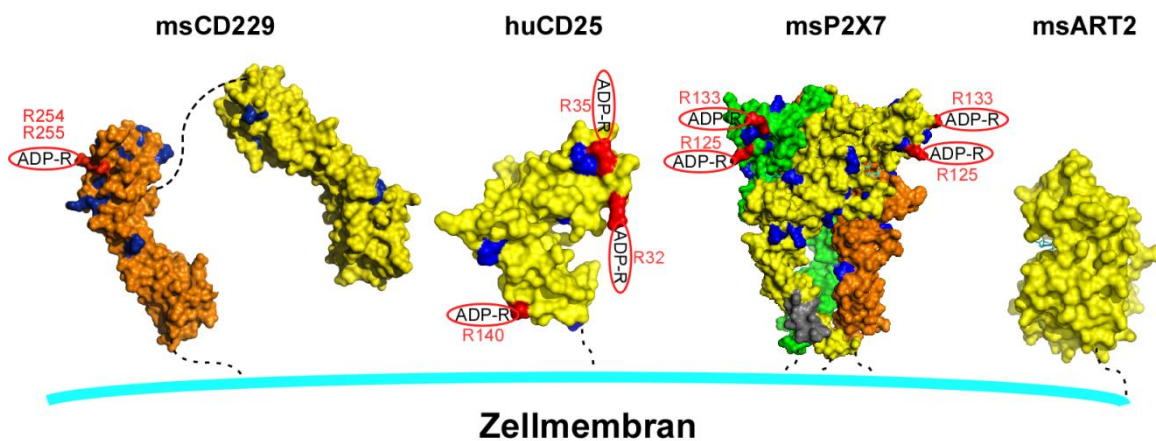


Abb.14 Membranständige Targets der ART2 und deren bisher identifizierte Zielarginine: Bekannte Ziel-Arginine sind rot dargestellt, weitere an der Proteinoberfläche zugängliche Arginine blau. Die bekannten Zielarginine sind beschriftet und mit einer ADP-Ribose-Gruppe dargestellt (ADP-R). Von links nach rechts: Die ADP-Ribosylierung von msCD229 (NTB-A-PDB: 2IF7) an RR254 beeinflusst möglicherweise die homophile Interaktion von CD229. Die ADP-Ribosylierung von huCD25 (huCD25-PDB: 2ERJ) an R35 beeinträchtigt die Bindung von IL-2. R67 ist nicht dargestellt, da diese in der 3D-Kristallstruktur nicht modelliert ist. Die ADP-Ribosylierung von P2X7 (Zebrafisch-P2X4-PDB: 4DW1) an R125 durch die ART2 (rtART2.2-PDB: 1OG3) führt wie die Bindung des löslichen Liganden ATP zur Aktivierung des Kanals. Die Strukturmodelle basieren auf den nächsten bekannten Verwandten der gezeigten Proteine und wurden mit Hilfe von SWISSMODEL modelliert.

5.3 Funktionelle Konsequenzen der ADP-Ribosylierung

Es sind verschiedene Mechanismen vorstellbar, wie die ADP-Ribosylierung sich auf die Funktion des Zielproteins auswirken könnte. Eine Möglichkeit wäre, dass die ADP-Ribose-Gruppe gar keinen Einfluss auf das Protein und seine Funktion hat. Diese Möglichkeit besteht beispielsweise dann, wenn die ADP-Ribosylierung an einer Position des Proteins

vorkommt, die nicht an Wechselwirkungen mit anderen Proteinen beteiligt ist und auch sonst für die Funktion des Proteins unbedeutend ist. Die bisher am besten dokumentierte funktionelle Konsequenz der ADP-Ribosylierung ist die Hemmung von Protein-Protein-Interaktionen. Ein Beispiel hierfür ist die ADP-Ribosylierung von Aktin durch die bakteriellen Toxine SpvB, CDT und C2. Die dabei entstehende Hemmung der Polymerisierung von globulärem (G) Aktin zu filamentärem (F) Aktin wird dabei nicht durch eine Konformationsänderung von G-Aktin verursacht, sondern durch Hemmung der Aneinanderlagerung von G-Aktinen. Dabei wirkt das große ADP-Ribose-Molekül wie ein Keil (Margarit et al. 2006). Ähnlich führt auch die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktor EF-2 durch das Diphtherietoxin nicht zu einer Konformationsänderung, sondern zu einer Hemmung der Interaktion von EF-2 mit weiteren Komponenten des Translationsapparates und damit zur Hemmung der Proteinsynthese der Wirtszelle (Honjo et al. 1971; Collier 1975; Jørgensen et al. 2008). Eine weitere bekannte Auswirkung der ADP-Ribosylierung ist die Aktivierung des Zielproteins. Dieses findet bei dem homotrimeren, liganden-gesteuerten Ionenkanal P2X7 statt, der durch extrazelluläres ATP aktiviert werden kann. Dabei führt die ADP-Ribosylierung von P2X7 ebenfalls zur Aktivierung des Ionenkanals. Es wurde postuliert, dass ein Teil der kovalent gebundenen ADP-Ribosegruppe dabei in die ATP-Bindungstasche bindet (Adriouch et al. 2008). Die Aufklärung der 3D-Struktur des verwandten P2X4-Rezeptors im Komplex mit ATP zeigt, dass die ADP-Ribosylierungsstelle tatsächlich am Rande der ATP-Bindungstasche liegt (Hattori & Gouaux 2012). Ein weiterer Mechanismus der funktionellen Auswirkung auf das Zielprotein schließlich ist das Schaffen einer neuen Protein-Protein-Interaktionsstelle, nämlich eine Erkennungsstelle für eine ADP-Ribose-bindende Proteindomäne, einer sogenannten Makrodomäne (Till & Ladurner 2009). Makrodomänen finden sich in verschiedenen Proteinen wie dem histonverwandten Protein MakroH2A, einigen PARPs und der PARG. Makrodomänen können spezifisch an mono-ADP-ribosylierte Proteine und an polyADP-Ribose binden. Manche Makrodomänen besitzen eine Enzymaktivität und können ADP-ribosylierte Proteine de-ADP-ribosylieren, bzw. ADP-ribosylierte Stoffwechselprodukte wie Acetyl-ADP-Ribose hydrolysieren (Slade et al. 2011; Kim et al. 2012; Karlberg et al. 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung der ADP-Ribosylierung von Membranproteinen von Lymphomzellen auf die Signalkaskade des IL-2-Rezeptors untersucht (**Abb.12**). Dabei zeigte sich, dass eine Vorinkubation von ART2-transfizierten CTLL-2-Zellen mit NAD die IL-2-induzierte Phosphorylierung von STAT5 hemmt,

wohingegen NAD keinen Einfluss auf die STAT5-Phosphorylierung in ART2-negativen parentalen CTLL-2-Zellen hatte. Bei CD25 wird durch die ADP-Ribosylierung die IL-2-Bindung gehemmt (Teege et al. 2015). Tatsächlich liegen die als ART2-identifizierten Target-Arginine R35 und R36 im IL-2-Bindungsepitop von CD25 (Rickert et al. 2005). Dies ist insofern interessant, da IL-2 im Immunsystem in der Aktivierung von T-Lymphozyten und regulatorischen T-Zellen eine Schlüsselrolle einnimmt. Die klonale Expansion ist auto- und parakrin IL-2-vermittelt. Aktivierte T-Zellen brauchen IL-2, um sich zu teilen. Somit könnte die ADP-Ribosylierung von CD25 ein Mechanismus zur Feinsteuerung der IL-2-Sensitivität von verschiedenen T-Zell-Subpopulationen sein.

In dieser Arbeit wurde ferner die ADP-Ribosylierung von CD229 näher charakterisiert. Ob und welchen Einfluss die ADP-Ribosylierung von CD229 an RR254 auf die homophile Interaktion von msCD229 hat, ist noch nicht geklärt. CD229 ist ein Mitglied des SLAM-Familie. Die Proteine dieser Familie haben u.a. eine wichtige Funktion bei der Modulierung des Immunsystems wie der Zytotoxizität, der humoralen Immunantwort, Autoimmunität, der Entwicklung von Lymphozyten sowie der Zell-Adhäsion (Cannons et al. 2011). Das Protein interagiert homophil (**Abb.15**). Bisher wird vermutet, dass CD229 einen hemmenden Einfluss auf die Aktivierung der immunologischen Synapse und damit eine antiinflammatorische Funktion hat. Würde die ADP-Ribosylierung die homophile Interaktion beeinträchtigen, hätte die ADP-Ribosylierung möglicherweise einen proinflammatorischen Einfluss. CD229 enthält vier Immunglobulin-Domänen, die möglicherweise über einen Klappmechanismus auf- und zugefaltet werden können. Da RR254 in der dritten Ig-Domäne nahe dieser vermeintlichen Hinge-Region liegen, ist auch denkbar, dass die ADP-Ribosylierung an dieser Stelle die Aktivierung bzw. Deaktivierung des Klappmechanismus beeinflussen könnte. Somit könnte die ADP-Ribosylierung von CD229 auch eine homophile Interaktion stabilisieren und dadurch eine antiinflammatorische Wirkung ausüben.

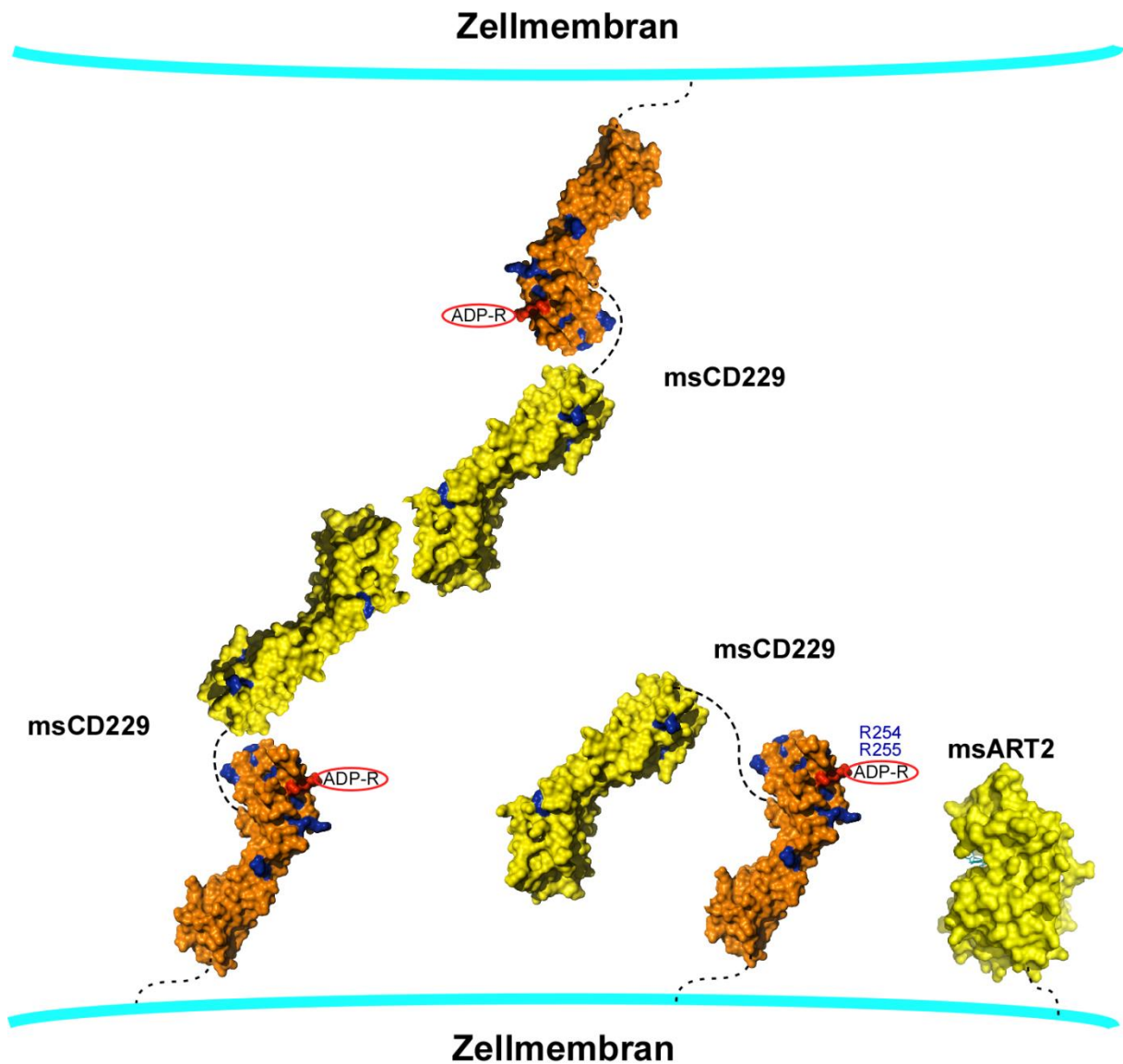


Abb.15 Auswirkung der ADP-Ribosylierung von msCD229: CD229 ist ein homophiles Interaktionsmolekül, das aus vier Immunglobulin-Domänen besteht und in der immunologischen Synapse mit seinem Gegenüber interagiert (links). Bei dieser homophilen Interaktion spielt die N-terminale Domäne V1 eine entscheidende Rolle. Es wird postuliert, dass CD229 über einen Klappmechanismus zwischen der zweiten und dritten Ig-Domäne aktiviert wird. Die identifizierte ADP-Ribosylierungsstelle R254 befindet sich in der dritten Domäne, weit entfernt von den interagierenden V1-Domänen. Möglicherweise beeinflusst die ADP-Ribosylierung jedoch den postulierten Klappmechanismus von CD229.

5.4 Ausblick und weiterführende Untersuchungen

Aufgrund der Ergebnisse dieser Dissertation ergibt sich eine Reihe von spannenden Fragestellungen für weiterführende Experimente. Über die genaue Funktion von CD229 ist, abgesehen davon, dass es ein homophiles Interaktionsmolekül ist, noch nicht viel bekannt. Da es in Tregs und anderen T-Zellen eines der Haupttargets der ART2 ist, gilt es herauszufinden, wie genau die Funktion dieses Proteins beeinflusst wird. Mit den klonierten und exprimierten msCD229-Fc-Fusionsproteinen wäre es möglich, homophile

Bindungsassays durchzuführen. Dafür könnte man HEK-Zellen mit dem msCD229wt und dem ART2-Plasmid transfizieren, diese mit und ohne NAD behandeln und dann mit dem msCD229-Fc-Protein inkubieren. Dies ließe sich dann mittels eines Antikörpers, der gegen den Fc-Teil gerichtet ist, im FACS nachweisen. So könnte man überprüfen, ob die homophile Interaktion durch ADP-Ribosylierung inhibiert oder stabilisiert wird. Außerdem ist bekannt, dass CD229 zur immunologischen Synapse transloziert. Ob diese Translokation durch die ADP-Ribosylierung beeinflusst wird, könnte mittels hochauflösender Immun-Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden.

Zur endgültigen Klärung der ADP-Ribosylierungsstellen von msCD229 müsste noch überprüft werden, welches der beiden Arginine des Argininpaares RR254 ADP-ribosyliert wird und an welcher weiteren Stelle CD229 ggf. noch ADP-ribosyliert wird. Dies könnte durch weitere Mutagenesestudien untersucht werden. Auch könnte man versuchen, ADP-ribosyliertes CD229 aufzureinigen, proteolytisch in kleinere Peptide zu fragmentieren und in diesen mittels Massenspektrometrie die ADP-Ribosylierungsstellen nachzuweisen.

Schließlich wären die mittels Röntgenbeugung ermittelten Kristallstrukturen von nicht-ADP-ribosyliertem und ADP-ribosyliertem CD229 von Interesse. Die in dieser Arbeit klonierten Expressionsvektoren für CD229 könnten dafür hilfreich sein.

Zusammenfassung

Die ART2.2 ist ein membranständiges Enzym, welches Membranproteine unter Verwendung des Substrates NAD in einer posttranslationalen Reaktion kovalent unter Freisetzung von Nicotinamid ADP-ribosyliert. Zwei Membranproteine, die ADP-ribosyliert werden, sind die Alpha-Untereinheit des trimeren IL-2-Rezeptors CD25 und das homophile Interaktionsmolekül CD229. CD25 ist für die klonale Expansion von Lymphozyten von herausragender Bedeutung. Das Mitglied der Immunglobulin Superfamilie CD229 kommt vor allem auf B- und T-Lymphozyten vor und erfüllt bei der Ausbildung der Immunologischen Synapse bei der Interaktion von Antigen-präsentierender Zelle und T-Zelle eine noch unbekannt Rolle.

Im ersten Teil der Dissertation wurden verschiedene Lymphomzelllinien, konventionelle und regulatorische T-Zellen auf Zielproteine der ART2 untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass CD229 auf fast allen untersuchten Lymphomzelllinien, Yac-1, DC27.10 und EL4-Zellen vorkommt. CD25 hingegen kommt auf Yac-1-Zellen vor. Die ADP-Ribosylierung von CD25 und CD229 wurde auf Yac-1-Zellen sowohl mittels eNAD und Chemolumineszenz als auch mittels ³²P-NAD und Autoradiographie nachgewiesen. CD25 und CD229 stellen zudem Ziele der ADP-Ribosylierung auf primären T-Zellen bzw. regulatorischen T-Zellen dar. Dabei zeigt sich, dass CD229 ein Hauptziel der ADP-Ribosylierung ist.

Im zweiten Teil dieser Dissertation wurde mittels zielgerichteter Mutagenese untersucht, an welchen Argininen msCD229 ADP-ribosyliert wird. Wenigstens eines der Arginine vom Argininpaar RR254 wird ADP-ribosyliert.

Im dritten Teil der Dissertation wurden die extrazellulären Domänen von CD229 als Fusionsproteine mit dem Fc-Teil von IgG1 kloniert und in HEK-293-Zellen exprimiert. Die Fusionsproteine können für weitere funktionelle Versuche bezüglich des Einflusses der ADP-Ribosylierung auf die homophile Interaktion von CD229 genutzt werden. Zudem wurde nachgewiesen, dass die ADP-Ribosylierung von CD25 einen hemmenden Einfluss auf dessen Signalkaskade hat.

Abstract

The membrane anchored ART2 is an extracellular enzyme, which uses NAD as a substrate to covalently ADP-ribosylate membrane proteins on arginine residues in a posttranslational reaction, producing nicotinamide as a byproduct of the reaction. Two known targets of this reaction are CD25, the alpha subunit of the trimeric IL-2 receptor complex and the homophilic interaction molecule CD229. CD25 is of importance for the clonal expansion of activated lymphocytes. As a member of the immunoglobulin superfamily CD229 is expressed mainly on B- and T-lymphocytes and is thought to participate in forming the immunological synapse, the contact area between B-cell and T-cell. CD229 is recruited to the area of contact and interacts homophilically.

In the first part of the dissertation, different lymphoma cell lines were examined for their expression of known ART2-target proteins. CD229 was found on all examined cell lines, i.e. on Yac-1, DC27.10 and EL4 cells. CD25 on the other hand was expressed by Yac-cells. ADP-ribosylation of CD229 and CD25 was confirmed by using ³²P-NAD or eNAD in Yac-1 cells. In common T-cells and Tregs CD229 is evidently a primary target of ADP-ribosylation.

The second part of this dissertation explores the arginine residues of msCD229 as potential targets of ADP-ribosylation by means of site-directed mutagenesis. Radioactive assays revealed that at least one of the arginines of the doublet RR254 is ADP-ribosylated.

The third and last part of this dissertation deals with the functional consequences of ADP-ribosylation of CD25 und CD229. ADP-ribosylation of CD25 reduces pSTAT5 levels, thereby having an inhibitory effect on CD25 signal transduction. CD229-Fc fusionproteins were cloned and produced in HEK-293 cells. The fusion proteins can be used for future assays to further asses the effect of the ADP-ribosylation of CD229 on its homophilic interaction.

Verzeichnisse

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ADP	Adenosin-Diphosphat
ADPR; ADP-Ribose	Adenosin-Diphosphat-Ribose
AP-2	Adapter Complex 2
APC	Antigen Presenting Cell; Antigen präsentierende Zelle;
ARH	ADP-Ribosylhydrolase
ART	ADP-Ribosyltransferase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
C-Domäne	Konstante-Domäne
Bp	Basenpaare
B-CLL	B-Zell Lymphatische Leukämie
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C-reaktives Protein
CT	Cholera Toxin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimental-Autoimmune-Encephalomyelitis; Experimentellen-Autoimmun-Encephalomyelitis
EAT-2	SH2-Domain Containing Protein; SH2-Domäne-Enthaltendes-Protein
EF-2	Elongationsfaktor 2
eADP-Ribose	Etheno-ADP-Ribose
eNAD	Etheno-NAD
Fab	Fragment-Antigen-Binding; Antigen-Bindendes-Fragment
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorting; Fluoreszenz-Aktiviertes-Zell-Sortieren
Fc	Fragment-Constant; Konstantes-Fragment;
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
G-Protein	GTP-Bindendes Protein
Grb2	Growth-Factor-Receptor-Bound-Protein; Wachstums-Faktor-Gebundenes-Protein;
hART	Humane-ART
IDC	Interdigitierende-Dendritische-Zelle
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie;
IL-	Interleukin-
IP	Immunpräzipitation
JAK	Janus-Tyrosinkinase
LFA	Lymphocyte-Function-Associated-Molecule; Lymphozyten-Funktion-Assoziiertes-Molekül;
msART	Maus-ART
MHC	Major-Histocompatibility-Complex

mono-ART	Mono-ADP-Ribosyltransferase
MS	Multiple-Sklerose
NAD	Nicotinamidadenindinukleotidribose
NICD	NAD-Induced-Cell-Death; NAD-Induzierter-Zelltod
³²P	Phosphorisotop
PARP;poly-ART	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase; Poly-ADP-Ribosyltransferase;
RNA	Ribonukleinsäure
SAP	SLAM-Associated-Protein
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfate-Polyacrylamide-Gelelectrophoresis
SLAM	Signaling-Lymphocyte-Activation-Molecule
SLE	Systemischer-Lupus-Erythematodes
STAT	Signal-Transducers-and-Activators-of-Transcription
TCR	T-Cell-Receptor; T-Zell-Rezeptor
Tregs	Regulatorische-T-Zellen
V-Domäne	Variable-Domäne
VIP2	Vegetative-Insecticidal-Protein 2

Anglizismen

Anglizismus	Bedeutung
Alignment	Vergleich der Sequenz von DNA oder Proteinen
Antigen presenting cell (APC)	Antigen präsentierende Zelle wie z.B. dendritische Zellen
Beads	Kugelförmig
Blebbing	Ausbuchten der Zellmembran
Dot-Plot	Darstellung Ergebnissen der FACS Analyse als Punktwolke in einem Koordinatensystem
FLAG-Tag	An das N-terminale Ende eines Proteins einkloniertes Epitop, welches mittels des M2-Antikörpers erkannt werden kann
Forwardscatter (FSC)	Die Vorwärtsstreuung im FACS. Diese korreliert positiv mit der Größe der Zellen
Gate	Eine bei der Auswertung von FACS Ergebnissen eingesetzte Grenze, welche Zellen z.B. nach FSC und SSC auswählt und nur deren Fluoreszenzmuster darstellt. U.a. zum ausgrenzen toter Zellen.
Histogramm-Plot	Darstellung Ergebnissen der FACS Analyse als Graph in einem Koordinatensystem
Knock-out	Ausschalten eines Gens in der Keimbahn
Lipid-Raft	Membranmikrodomäne, reich an Sphingolipiden und Cholesterin
Panel	Feld
PS-Flashing	Umverteilung von Phosphatidylserin vom inneren Blatt in das Äußere Blatt einer Lipid-Doppelschicht Zellmembran.
Screening	Durchmusterung
Shedding	Freisetzung von Membranproteinen von der Zelle nach deren Abtrennung vom Membrananker

Sidewardscatter (SSC) Target	Die Seitwärtsstreuung im FACS. Diese korreliert positiv mit der Granularität von Zellen Ziel
-------------------------------------	---

Literaturverzeichnis

- Adriouch, S. et al., 2008. ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *Faseb J*, 22, pp.861–869.
- Adriouch, S. et al., 2007. NAD⁺ released during inflammation participates in T cell homeostasis by inducing ART2-mediated death of naive T cells in vivo. *J Immunol*, 179, pp.186–194.
- Adriouch, S. et al., 2001. Rapid induction of naive T cell apoptosis by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide: requirement for mono(ADP-ribosyl)transferase 2 and a downstream effector. *J Immunol*, 167, pp.196–203.
- Aswad, F., Kawamura, H. & Dennert, G., 2005. High sensitivity of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. *J Immunol*, 175, pp.3075–3083.
- Bannas, P. et al., 2005. Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 depends on its association with lipid rafts. *Blood*, 105, pp.3663–3670.
- Bopp, T. et al., 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine*, 204(6), pp.1303–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2118605&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 30, 2015].
- Bromley, S.K. et al., 2001. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol*, 19, pp.375–396.
- Bruzzone, S. et al., 2001. Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *Faseb J*, 15, pp.10–12.
- Bund, D. et al., 2006. Human Ly9 (CD229) as novel tumor-associated antigen (TAA) in chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) recognized by autologous CD8⁺ T cells. *Exp Hematol*, 34, pp.860–869. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=16797413.
- Cannons, J.L., Tangye, S.G. & Schwartzberg, P.L., 2011. SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annual review of immunology*, 29, pp.665–705. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219180> [Accessed July 17, 2012].
- Cao, E. et al., 2006. NTB-A receptor crystal structure: insights into homophilic interactions in the signaling lymphocytic activation molecule receptor family. *Immunity*, 25(4), pp.559–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17045824> [Accessed July 27, 2012].
- Carroll, S.F. & Collier, R.J., 1984. NAD binding site of diphtheria toxin: identification of a residue within the nicotinamide subsite by photochemical modification with NAD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, pp.3307–3311.
- Collier, R.J., 1975. Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriol Rev*, 39, pp.54–85.
- Contreras, J.E. et al., 2002. Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, pp.495–500.
- Cortés-García, J.D. et al., 2016. Evaluation of the expression and function of the P2X7

- receptor and ART1 in human regulatory T-cell subsets. *Immunobiology*, 221(1), pp.84–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26307000> [Accessed February 3, 2016].
- Cunninghame Graham, D.S. et al., 2008. Association of LY9 in UK and Canadian SLE families. *Genes and immunity*, 9(2), pp.93–102. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18216865> [Accessed July 27, 2012].
- Czar, M.J. & Schwartzberg, P.L., 2001. XLP: one gene, many players. *Clin Immunol*, 100, pp.2–3.
- Davis, R.E. et al., 1998. In situ staining for poly(ADP-ribose) polymerase activity using an NAD analogue. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 46(11), pp.1279–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9774627>.
- Durda, P.J., Boos, S.C. & Gottlieb, P.D., 1979. T100: a new murine cell surface glycoprotein detected by anti-Lyt-2.1 serum. *J Immunol*, 122, pp.1407–1412.
- Gaffen, S.L., 2001. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine*, 14, pp.63–77.
- Gillis, S. & Smith, K.A., 1977. Long term culture of tumor-specific cytotoxic T cells. *Nature*, 268, pp.154–156.
- Glowacki, G. et al., 2002. The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Sci*, 11, pp.1657–1670.
- Graham, D.B. et al., 2006. Ly9 (CD229)-deficient mice exhibit T cell defects yet do not share several phenotypic characteristics associated with SLAM- and SAP-deficient mice. *J Immunol*, 176, pp.291–300. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16365421.
- Gubin, A.N. et al., 2000. Identification of the dombrock blood group glycoprotein as a polymorphic member of the ADP-ribosyltransferase gene family. *Blood*, 96, pp.2621–2627.
- Hann, A., 2008. *Die posttranslationale Proteinmodifikation des IL-2 Rezeptors durch ADP-Ribose*. Universität Hamburg. Available at: <http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2009/4268/>.
- Hara, N. et al., 1999. Mouse Rt6.1 is a thiol-dependent arginine-specific ADP-ribosyltransferase. *Eur J Biochem*, 259, pp.289–294.
- Hara, N. et al., 2000. Mouse T-cell antigen rt6.1 has thiol-dependent NAD glycohydrolase activity. *J Biochem*, 128, pp.601–607.
- Hare, N.J. et al., 2006. Missense mutations in SH2D1A identified in patients with X-linked lymphoproliferative disease differentially affect the expression and function of SAP. *Int Immunol*, 18, pp.1055–1065. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16720617.
- Hattori, M. & Gouaux, E., 2012. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature*, 485(7397), pp.207–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3391165&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 5, 2013].
- Hogarth, P.M., Craig, J. & McKenzie, I.F., 1980. A monoclonal antibody detecting the Ly-

- 9.2 (Lgp 100) cell-membrane alloantigen. *Immunogenetics*, 11, pp.65–74.
- Hollmann, C. et al., 1996. Molecular characterization of mouse T-cell ecto-ADP-ribosyltransferase Rt6: cloning of a second functional gene and identification of the Rt6 gene products. *Mol Immunol*, 33, pp.807–817.
- Hong, S. et al., 2009. Differential regulation of P2X7 receptor activation by extracellular nicotinamide adenine dinucleotide and ecto-ADP-ribosyltransferases in murine macrophages and T cells. *J Immunol*, 183, pp.578–592.
- Honjo, T. et al., 1971. Adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis by diphtheria toxin. *J Biol Chem*, 246, pp.4251–4260.
- Honjo, T., Nishizuka, Y. & Hayaishi, O., 1968. Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J Biol Chem*, 243, pp.3553–3555.
- Hottiger, M.O. et al., 2010. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(4), pp.1–12. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000409002424>.
- Hubert, S. et al., 2010. Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *Journal of Experimental Medicine*, 207(12), pp.2561–2568. Available at: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20091154>.
- Jørgensen, R. et al., 2008. The nature and character of the transition state for the ADP-ribosyltransferase reaction. *EMBO reports*, 9(8), pp.802–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2515215&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 5, 2013].
- Kahl, S. et al., 2000. Metalloprotease-Mediated Shedding of Enzymatically Active Mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 Upon T Cell Activation. *The Journal of Immunology*, 165(8), pp.1–8. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/165/8/4463.abstract>.
- Karlberg, T. et al., 2013. Structural biology of the writers, readers, and erasers in mono- and poly(ADP-ribose) mediated signaling. *Molecular aspects of medicine*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23458732> [Accessed August 5, 2013].
- Kawamura, H. et al., 2005. P2X7 receptor-dependent and -independent T cell death is induced by nicotinamide adenine dinucleotide. *J Immunol*, 174, pp.1971–1979.
- Kawamura, H. et al., 2006. P2X7 Receptors Regulate NKT Cells in Autoimmune Hepatitis. *The Journal of Immunology*, 176(4), pp.1–10. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/176/4/2152.abstract>.
- Kim, I.-K. et al., 2012. Structure of mammalian poly(ADP-ribose) glycohydrolase reveals a flexible tyrosine clasp as a substrate-binding element. *Nature structural & molecular biology*, 19(6), pp.653–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3381899&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 5, 2013].
- Koch-Nolte, F. et al., 2006. ADP-ribosylation of membrane proteins: unveiling the secrets of a crucial regulatory mechanism in mammalian cells. *Ann Med*, 38, pp.188–199.
- Koch-Nolte, F. et al., 2001. ADP-ribosyltransferases: plastic tools for inactivating protein and small molecular weight targets. *J Biotechnol*, 92, pp.81–87.
- Koch-Nolte, F. et al., 1993. Assignment of the human RT6 gene to 11q13 by PCR

- screening of somatic cell hybrids and in situ hybridization. *Genomics*, 18, pp.404–406.
- Koch-Nolte, F. et al., 2008. Mammalian ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, pp.6716–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508690> [Accessed September 10, 2016].
- Koch-Nolte, F. et al., 1996. Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADPribose)yltransferases and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins. *J Biol Chem*, 271, pp.7686–7693.
- Koch-Nolte, F. et al., 2005. Use of genetic immunization to raise antibodies recognizing toxin-related cell surface ADP-ribosyltransferases in native conformation. *Cell Immunol*, 236, pp.66–71.
- Krebs, C. et al., 2005. CD38 controls ADP-ribosyltransferase-2-catalyzed ADP-ribosylation of T cell surface proteins. *J Immunol*, 174, pp.3298–3305.
- Krebs, C. et al., 2003. Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine. *Anal Biochem*, 314, pp.108–115.
- Lahl, K. et al., 2007. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *The Journal of experimental medicine*, 204(1), pp.57–63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2118432&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 27, 2012].
- Laing, S. et al., 2011. Strategies for the identification of arginine ADP-ribosylation sites. *Journal of proteomics*, 75(1), pp.169–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21784185> [Accessed August 5, 2013].
- Laing, S., Unger, M. & Koch-Nolte, F., 2011. ADP-ribosylation of arginine. *Amino acids*, pp.1–13. Available at: <http://www.springerlink.com/index/E7G1Q56534745072.pdf>.
- Letourneau, S. et al., 2009. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol*, 123, pp.758–762.
- Liu, K.D., Gaffen, S.L. & Goldsmith, M.A., 1998. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr Opin Immunol*, 10, pp.271–278.
- Ludden, P.W., 1994. Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in prokaryotes. *Mol Cell Biochem*, 138, pp.123–129.
- Lund, F. et al., 1995. Murine CD38: an immunoregulatory ectoenzyme. *Immunol Today*, 16, pp.469–473.
- Lund, F.E. et al., 1998. CD38: a new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction. *Immunol Rev*, 161, pp.79–93.
- Margarit, S.M. et al., 2006. A steric antagonism of actin polymerization by a salmonella virulence protein. *Structure*, 14, pp.1219–1229. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=16905096.
- Martin, M. et al., 2005. Identification of Grb2 as a novel binding partner of the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein binding receptor CD229. *J Immunol*, 174, pp.5977–5986. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=15879090.
- Matute, C. et al., 2007. P2X7 Receptor Blockade Prevents ATP Excitotoxicity in

- Oligodendrocytes and Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience*, 27(35), pp.1–9. Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0579-07.2007>.
- Miyara, M. & Sakaguchi, S., 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends in molecular medicine*, 13(3), pp.108–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17257897> [Accessed July 26, 2012].
- Morra, M., Lu, J., et al., 2001. Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *Embo J*, 20, pp.5840–5852. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11689425.
- Morra, M., Howie, D., et al., 2001. X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annu Rev Immunol*, 19, pp.657–682.
- Mueller-Dieckmann, C. et al., 2002. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of rat ecto-ADP-ribosyltransferase 2 (ART2.2). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58, pp.1211–1213.
- Mueller-Dieckmann, C. et al., 2002. Structure of the ecto-ADP-ribosyl transferase ART2.2 from rat. *Journal of molecular biology*, 322(4), pp.687–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270706> [Accessed December 9, 2015].
- Nakamura, Y. et al., 1994. Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature*, 369, pp.330–333.
- Ness, B.G., Howard, J.B. & Bodley, J.W., 1980. ADP-ribosylation of elongation factor 2 by diphtheria toxin. Isolation and properties of the novel ribosyl-amino acid and its hydrolysis products. *J Biol Chem*, 255, pp.10717–10720.
- Nichols, K.E. et al., 2005. Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev*, 203, pp.180–199. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=15661030.
- Ohlrogge, W. et al., 2002. Generation and Characterization of Ecto-ADP-Ribosyltransferase ART2.1/ART2.2-Deficient Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 22(21), pp.1–9. Available at: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.22.21.7535-7542.2002>.
- Osago, H. et al., 2008. A new detection method for arginine-specific ADP-ribosylation of protein -- a combinational use of anti-ADP-ribosylarginine antibody and ADP-ribosylarginine hydrolase. *J Biochem Biophys Methods*, 70, pp.1014–1019.
- Panse, J. et al., 2011. Surface molecule CD229 as a novel target for the diagnosis and treatment of multiple myeloma. *Haematologica*, 96(10), pp.1–9. Available at: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2010.036814>.
- Rickert, M. et al., 2005. The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor. *Science*, 308, pp.1477–1480.
- Rissiek, B. et al., 2014. Technical Advance: a new cell preparation strategy that greatly improves the yield of vital and functional Tregs and NKT cells. *Journal of leukocyte biology*, 95(3), pp.543–9. Available at: <http://www.jleukbio.org/content/95/3/543.short> [Accessed December 9, 2015].
- Robinson, E.A., Henriksen, O. & Maxwell, E.S., 1974. Elongation factor 2. Amino acid sequence at the site of adenosine diphosphate ribosylation. *J Biol Chem*, 249,

pp.5088–5093.

- Romero, X. et al., 2005. CD229 (Ly9) lymphocyte cell surface receptor interacts homophilically through its N-terminal domain and relocalizes to the immunological synapse. *J Immunol*, 174, pp.7033–7042. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=15905546.
- Sabrina Laing, 2010. *Die strukturelle und funktionelle Charakterisierung der ADP-Ribosylierung von humanem Tumor-Nekrose-Faktor durch ADP-Ribosyltransferase-I*. Universität Hamburg. Available at: http://ediss.sub.uni-hamburg.de/frontdoor.php?source_opus=4882&la=de.
- Sakaguchi, S. et al., 2013. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nature reviews. Immunology*, 13(6), pp.461–7. Available at: <http://www.nature.com/nri/journal/v13/n6/pdf/nri3464.pdf> [Accessed October 16, 2015].
- Sayos, J. et al., 2001. Cell surface receptors Ly-9 and CD84 recruit the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP. *Blood*, 97, pp.3867–3874.
- Sayos, J. et al., 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature*, 395, pp.462–469.
- Scheuplein, F. et al., 2010. A recombinant heavy chain antibody approach blocks ART2 mediated deletion of an iNKT cell population that upon activation inhibits autoimmune diabetes. *Journal of Autoimmunity*, 34(2), pp.1–10. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896841109001097>.
- Scheuplein, F. et al., 2009. NAD⁺ and ATP Released from Injured Cells Induce P2X7-Dependent Shedding of CD62L and Externalization of Phosphatidylserine by Murine T Cells. *The Journal of Immunology*, 182(5), pp.1–12. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0801711>.
- Schütt, C. & Bröker, B., 2006. *Grundwissen Immunologie* 1st ed., München: Elsevier.
- Seemayer, T.A. et al., 1995. X-linked lymphoproliferative disease: twenty-five years after the discovery. *Pediatric research*, 38(4), pp.471–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8559596> [Accessed July 27, 2012].
- Seman, M. et al., 2004. Ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs): emerging actors in cell communication and signaling. *Curr Med Chem*, 11, pp.857–872.
- Seman, M. et al., 2003. NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity*, 19, pp.571–582.
- Setoguchi, R. et al., 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*, 201, pp.723–735.
- Siewert, C. et al., 2008. Experience-driven development: effector/memory-like alphaE+Foxp3+ regulatory T cells originate from both naive T cells and naturally occurring naive-like regulatory T cells. *J Immunol*, 180, pp.146–155.
- Simons, K. & Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, pp.569–572.
- Simons, K. & Toomre, D., 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, pp.31–39.

- Slade, D. et al., 2011. The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Nature*, 477(7366), pp.616–20. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3184140&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 5, 2013].
- Solle, M. et al., 2001. Altered Cytokine Production in Mice Lacking P2X7 Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1), pp.1–8. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M006781200>.
- Taylor, S.R. et al., 2008. Sequential shrinkage and swelling underlie P2X7-stimulated lymphocyte phosphatidylserine exposure and death. *J Immunol*, 180, pp.300–308.
- Teege, S. et al., 2015. Tuning IL-2 signaling by ADP-ribosylation of CD25. *Scientific reports*, 5, p.8959. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4354014&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 9, 2015].
- Till, S. & Ladurner, A.G., 2009. Sensing NAD metabolites through macro domains. *Front Biosci*, 14, pp.3246–3258.
- Tovar et al., 2002. Mouse novel Ly9: a new member of the expanding CD150 (SLAM) family of leukocyte cell-surface receptors. *Immunogenetics*, 54, pp.394–402. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12242590.
- Valle, J.M., Engel, P. & Martin, M., 2003. The cell surface expression of SAP-binding receptor CD229 is regulated via its interaction with clathrin-associated adaptor complex 2 (AP-2). *J Biol Chem*, 278, pp.17430–17437. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12621057.
- Wang, H.M. & Smith, K.A., 1987. The interleukin 2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure. *J Exp Med*, 166, pp.1055–1069.
- Wang, J. et al., 1994. Regulation of cytotoxic T cells by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) correlates with cell surface GPI-anchored/arginine ADP-ribosyltransferase. *J Immunol*, 153, pp.4048–4058.
- Willerford, D.M. et al., 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*, 3, pp.521–530.
- Williams, A.F. & Barclay, A.N., 1988. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol*, 6, pp.381–405.
- Young, T.L. & Santella, R.M., 1988. Development of techniques to monitor for exposure to vinyl chloride: monoclonal antibodies to ethenoadenosine and ethenocytidine. *Carcinogenesis*, 9, pp.589–592.
- Zolkiewska, A., 2005. Ecto-ADP-ribose transferases: cell-surface response to local tissue injury. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 20, pp.374–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16287986> [Accessed August 5, 2013].

Abbildungsverzeichnis

- Abb.01: Die ADP-Ribosylierungsreaktion
- Abb.02: Die Familie der R-S-E ARTs in Eu- und Prokaryoten
- Abb.03: Methoden zum Nachweis der ADP-Ribosylierung
- Abb.04: ADP-Ribosylierung mit ^{32}P -NAD
- Abb.05: Expressionsanalyse von ART-targets auf Lymphomzelllinien
- Abb.06: ^{32}P -NAD-Assay und eNAD-Assay mit Yac-1-Zellen
- Abb.07: ^{32}P -NAD-Assay mit FACS-sortierten Tregs und konventionellen T-Zellen
- Abb.08: Modellierung der 3D-Struktur von msCD229 auf die Kristallstruktur von NTB-A
- Abb.09: Die zielgerichtete Mutagenese der Arginine zu Lysin in msCD229
- Abb.10: Expression von msCD229 und seinen Mutanten in HEK-293-Zellen
- Abb.11: Die ADP-Ribosylierung von msCD229 und seinen Mutanten
- Abb.12: Der Einfluss von NAD auf die Phosphorylierung von STAT5
- Abb.13: Klonierung und Expression von msCD229 msIgG1-Fc Fusionsproteinen
- Abb.14: Membranständige Targets der ART2 und deren bisher identifizierte Zielarginine
- Abb.15: Auswirkung der ADP-Ribosylierung von msCD229

Anhänge

Alignment mouse (oben) und human (unten) CD229

Score = 677 bits (1746), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 364/657 (55%), Positives = 457/657 (70%), Gaps = 5/657 (1%)

msCD229 1	MADLKRYWCDWALGPLENPRMSQQQIFSPILWIPLLFLLMGLGASGKETPPTVISGMLG	60
huCD229 1	M K + DWA GP S P+ SQ QIFS +L LLFLLMGL ASGK++ PTV+SG+LG	60
msCD229 61	GSVTFSLNISKDAEIEHIIWNCPPKALALVIFYKDKITILDKGYNGFLKVSSEDGYSLYMSN	120
huCD229 61	GSVT LNIS D EIE++IW P ALA K+++TI+ K Y GR L +++ YSL +SN	120
msCD229 121	LTKSDSGSYHAQINQKNVILTTNKEFTLHIYEKLGKQIIVESVTPSDTDSCTFTLICTV	180
huCD229 121	LT +D+GSY AQINQ+N +TT +EFTL +YE+LQ+PQ+ ++SV S+ SC TL+C+V	180
msCD229 181	KGTFKDSVQYSWTREDTHLNTYDGSHTIRVYSQSVCDPDLPYTCKAWNPVSNSSQPVRIWQ	240
huCD229 181	KG + SV YSWT + H + +G L VS++ CDPDLPY C A NPVSQ SS PV + Q	240
msCD229 241	FCT--GASRRKTAAGKTVVGILGEPVTLPLEFRATRAATKNVWVFNTSVISQERGAATA	298
huCD229 241	FCT GASR T G+TVVG+LGEVTLPL A R T+ VVW+FNNTS+IS+ER AATA	299
msCD229 299	DSRRKPKGSEERVVRTSDQDQSLKISQLKMEDAGPYHAYVCSEASRDPSVRHFHTLLVYKR	358
huCD229 300	D K + + SV S QD SLKISQLK+EDAGPYHAYVCSEAS S+ H TLL+Y+R	359
msCD229 359	LEKPSVTKSPVHMMNGICEVVLTCVSDGGNNVYTWMPLOKAVMSQKSHLNVSWESG	418
huCD229 360	L KP +T S H +GIC + LTCV+ GGN V YTW PLQ +AV+SQG+SHLNVSW S	419
msCD229 419	EHLPNFTCTAHNPVSNSSSQFSSGTICSGPENKRFWL-LLLVLLLLMLIGGYFILRKK	477
huCD229 420	E+ PN TCTA NPVS SS QF S ICSGPE N + W+ L L+V LL + I + I ++K	479
msCD229 478	KQCSSLATRYRQAEVPAEIPETPTGHGQFSVLSQRYEKLDMSAKTTRHQPTPTSSTSES	537
huCD229 480	+CS A QAE PA+ PE GH +SVLSQ YEKLD + R QPTPTSD+SS+S	539
msCD229 538	SATTEEDDEKTRMHSTANSRNQVYDLVTHQDIAHALAYEGQVEYEAITPYDKVDGSMDEE	597
huCD229 540	+ TTEED+++ +H + R +V+D VT + H A EGQ +Y+ +TPY S+ E	599
msCD229 598	DMAYIQVSLNVQGETPLPQKKEDSNTIYCSVQKPKKTAQTPQQDAESPETPTYENFT	654
huCD229 600	+ Y QV N+QG+TP+ QK+E S TIYCS++KP+ Q D E PE+PTYENFT	655
	NTMYAQV-FNLQGKTPVSQKEESSATIYCSIRKQVVPVPPQQNDLEIPESPTYENFT	

- Signalsequenz
- Domäne V1
- Domäne C2
- Domäne V3
- Domäne C4
- Transmembrane
- konservierte Arginine in Mensch und Maus
- nicht konservierte Arginine in Mensch und Maus

Alignment mouse (oben) und human (unten) CD25

Score = 329 bits (844), Expect = 2e-117, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 164/273 (60%), Positives = 200/273 (73%), Gaps = 6/273 (2%)

msCD25 1	MEPRLLMLGLFLSLTIIVPSCRAELCLYDPPEVPNATFFKALS YKNGTILNCECKRGRFRRLKE	60
huCD25 1	M+ LLM G L+ +VP C+AELC DPPE+P+ATFKA++YK GT+LNCECKRGRFRRLKE	60
msCD25 61	MDSYLLMWGLLTFIMVPGQAEELCDDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGRFRRIKS	60
msCD25 61	-LVYMRCLGNS----WSSNCQCTSNSHDKSRKQVTAQLEHQKEQQTTTDMQKPTQSMHQE	115
huCD25 61	+YM C GNS W + CQCTS++ + KQVT Q E QKE++TT +MQ P Q + Q	119
huCD25 61	GSLYMLCTGNSSSHSSWDNQCTSSATNTTKQVTPQPEEQKERKTT-EMQSPMQPVDQA	119


```

msCD25 116 NLTGHCREFPPPWKHEDSKRIYHFVEGQSVHYECIPGYKALQRGPAISICKMKCGKTGWTQ 175
      +L GHCEREFPPPW++E ++RIYHFV GQ V+Y+C+ GY+AL RGPA S+CKM GKT WTQ
huCD25 120 SLPGHREFPPPWENEATERIYHFVVGQMVVYQCVOGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQ 179

msCD25 176 PQLTCVEREHHRFLASEESQGSRNSSPESETSCPITTTDFPQPTETTAMTETFVLTMEY 235
      PQL C E E +F E+ Q S PESETSC +TTTDF TE A ET + T EY
huCD25 180 PQLTCTGEMETSQFPGEKPKQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTTEY 239

msCD25 236 KVAVASCLFLLISILLLSGLTWQHRWRKSRRTI 268
      +VAVA C+FLLIS+LLLSGLTWQ R RKSRTI
huCD25 240 QVAVAGCVFLLISVLLLSGLTWQRRQRKSRRTI 272

```

 Signalsequenz
 Domäne Sushi-like 1 (D1)
 Domäne Sushi like 2 (D2)
 Transmembran
R konservierte Arginine in Mensch und Maus
R nicht konservierte Arginine in Mensch und Maus

Aminosäuresequenz huNTB-A

```

1 MSLTPLMVNG ILGESVTLPL EFPAGEKVN F ITWLFNETSL AFIVPHETKS PEIHVTNPKQ
61 GKRLNFTQSY SLQLSNLKME DTGSYRAQIS TKTSAKLSSY TLRILRQLRN IQVTNHSQLF
121 QNMTCELHLT CSVEDADDNV SFRWEALGNT LSSQPNTLVS WDPRISSSEQD YTCIAENAVS
181 NLSFSSVSAQK LCE

```

Modellierung der Domänen V1C2 von msCD229 auf huNTB-A

Model info:

modelled residue range: 51 to 243

based on template: [2if7A](#) (3.00 Å) **Remark:** No search for template was performed. Only user specified template was used for modelling.

Sequence Identity [%]: 28.788

Evalue: 3.40e-27

Alignment

```

TARGET      51      PPTVISGML GGSVTFSLNI SKDAEIEHIT WNCPPKALAL VSYK----KD
2if7A       3      ltplmvngil gesvtlplef pagekvnfit wlnfnetlaf ivphetkspe

```

```

TARGET      sssss  ssssss          sss ssss sssss  ss      s
2if7A      sssss  ssssss          sss ssss sssss  ss      s

```

```

TARGET      96      ITILDKGYNG RLKVSEdGYS LYMSNLTKSD SGSYYAQINQ KNVTLTtnKE
2if7A      53      ihvtnpkqgk rlnftq-sys lqlsnlkmed tgsyraquist ktsak--lss

```

```

TARGET      ssss   sssss  s ssssss   ssssssss   ss
2if7A      ssss   sssss  s ssssss   ssssssss   sss  sss

```

TARGET 146 FTLHIYEK LQ KPQIIVESVT PSDTDSCTFT LICTVKGTKD SVQYSWTRED
 2if7A 100 ytlrilrqlr niqvt nhs-- --qnm tcelh ltcsvedadd nvsfrwealg

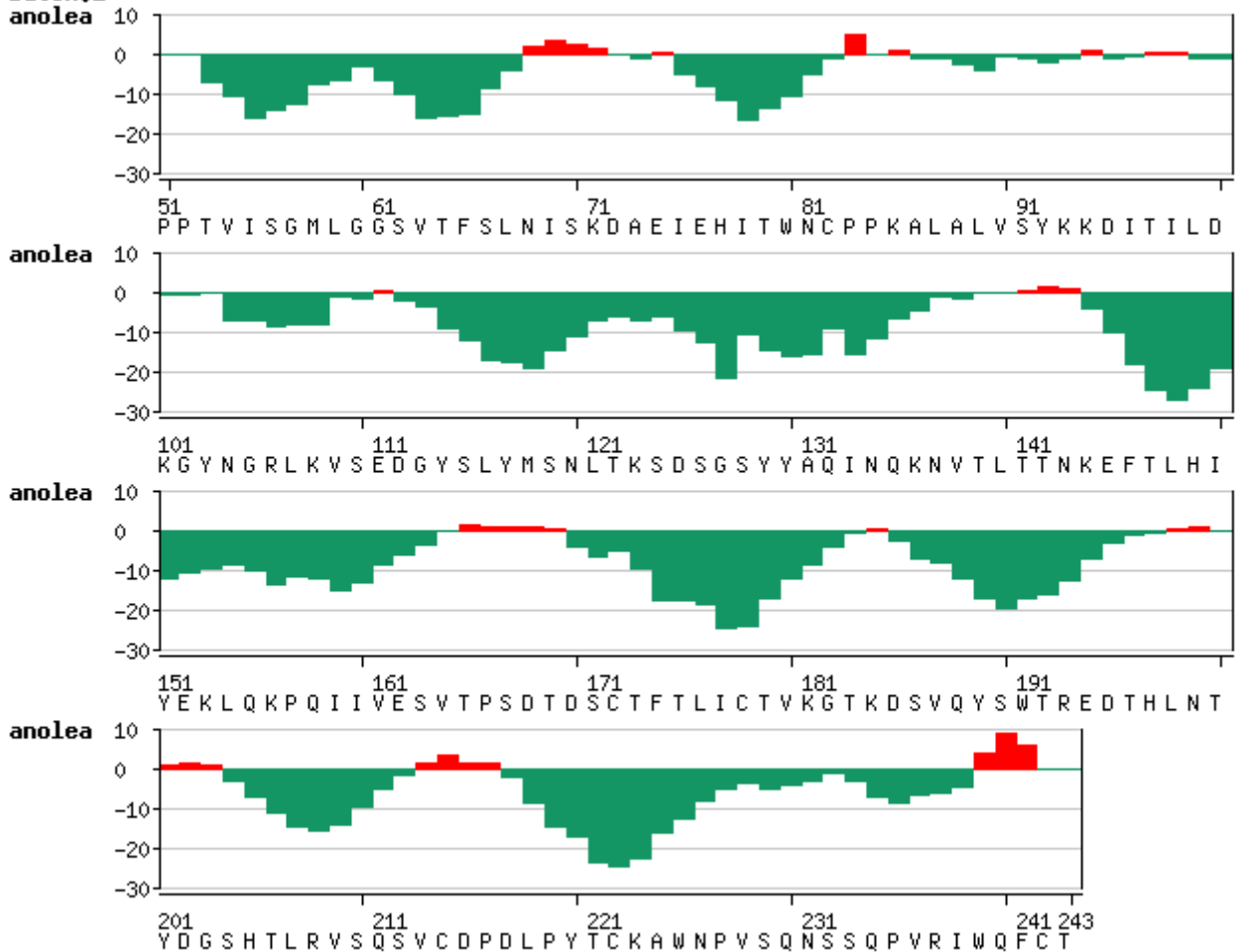
TARGET ssssss ssssss ssss ssss ssssss
 2if7A ssssss ssssss ssss ssss ssssss

TARGET 196 THLN TYD GSH TLRVSQS-VC DPDL PYTCKA WNPV SQNSSQ PVRIWQFCT
 2if7A 149 ntls---sqp nltvswdpri sseqdytcia enavsnl-sf svsaqklce-

TARGET sss s ssssss ssssss ss sss s ssss
 2if7A sss s ssssss ssssss ss sss ss ssss

Anolea

Batch.2
anolea



Modelling log

3.70 (SP3)
 Loading Template: 2if7A.pdb
 Loading Raw Sequence
 Renumber target sequence starting from (51)
 Loading Alignment: ./NXXX.align.submit.fasta
 Removing HET groups from template structure
 Refining Raw Sequence Alignment

```

ProModII: doing simple assignment of backbone
ProModII: adding blocking groups
Adding Missing Sidechains
AddPolar H
BuildDeletedLoopsModel
Trying Ligating with anchor residues TYR 92 and ASP 95
Number of Ligations found: 2
all loops are bad; continuing CSP with larger segment
Trying Ligating with anchor residues SER 91 and ASP 95
Number of Ligations found: 40
ACCEPTING loop 29: clash= 0 FF= -157.7 PP= -3.00
Small Ligation (C-N < 3.0A) ignored;
GROMOS will repair it at residue VAL 163
Building CSP loop with anchor residues GLU 111 and TYR 114
Number of Ligations found: 7
ACCEPTING loop 4: clash= 0 FF= 33.4 PP= 0.00
Building CSP loop with anchor residues LEU 140 and ASN 143
Building CSP loop with anchor residues THR 139 and ASN 143
Number of Ligations found: 1
all loops are bad; continuing CSP with larger segment
Building CSP loop with anchor residues VAL 138 and ASN 143
Number of Ligations found: 347
ACCEPTING loop 106: clash= 0 FF= 142.3 PP= -2.00
Building CSP loop with anchor residues SER 163 and ASP 168
Number of Ligations found: 239
ACCEPTING loop 214: clash= 0 FF= 343.0 PP= -1.00
Building CSP loop with anchor residues ASN 199 and GLY 203
Building CSP loop with anchor residues ASN 199 and SER 204
Number of Ligations found: 265
ACCEPTING loop 118: clash= 0 FF= -189.6 PP= -1.00
Building CSP loop with anchor residues ASN 231 and GLN 234
Number of Ligations found: 7
ACCEPTING loop 0: clash= 0 FF= -312.4 PP= -4.00
Optimizing Sidechains
Adding Hydrogens
Optimizing loops and OXT (nb = 26)
Final Total Energy: -4630.725 KJ/mol
Dumping Sequence Alignment

```

Modellierung der Domänen V3C4 von msCD229 auf huNTB-A

Model info:

modelled residue range: 51 to 243

based on template: [2if7A](#) (3.00 Å) **Remark:** No search for template was performed.
Only user specified template was used for modelling.

Sequence Identity [%]: 28.788

Evalue: 3.40e-27

Alignment

```

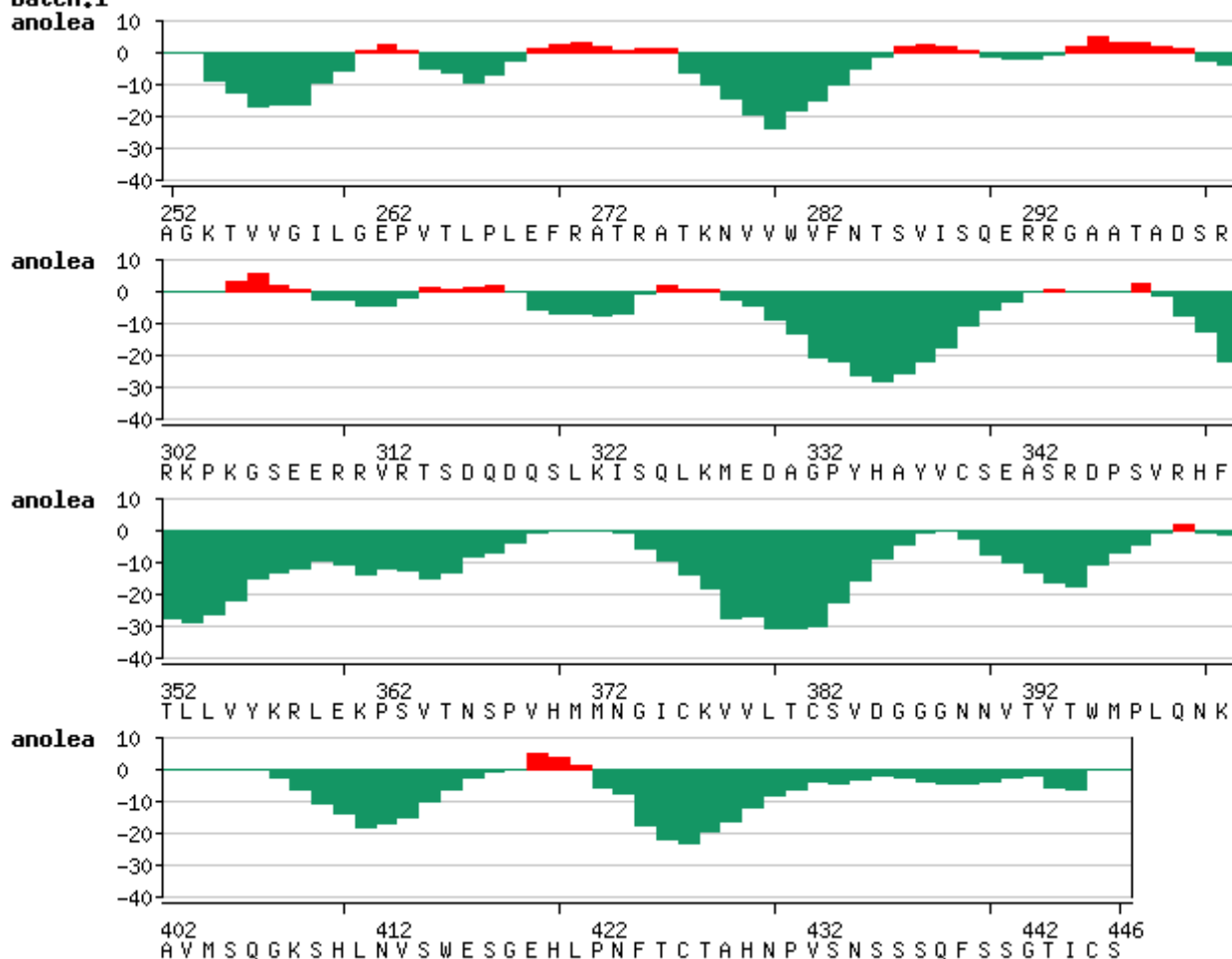
TARGET      252      AGKTVVG ILGEPVTLPL EFRATRATKN VVWVFNTSVI SQERRGAATA
2if7A       3      1--tplmvng ilgesvtlpl efpagkvnf itwlfnetsl afivphetks

```

TARGET		SSSSS	SSSSSS		S	SSSSSS	SSS	SSSS
2if7A		SSSSS	SSSSSS		S	SSSSSS	SSS	SSSS
TARGET	299	DSRRKPKGSE	ERRVRTSDQD	QSLKISQLKM	EDAGPYHAYV	CSEASRDPSV		
2if7A	51	peihvtnpkq	gkrl-nftqs	yslqlsnlkm	edtgsyraqi	stktsa--kl		
TARGET		SSSSS	SSSSSS	SSSSSSSS	SSSSSSSS	S		SS
2if7A		SSSSS	SS SSS	SSSSSSSS	SSSSSSSS	SS	SS	SS
TARGET	349	RHFTLLVYKR	LEKPSVTNSP	VHMMNGICKV	VLTCSDVGGG	NNVYTWMPPL		
2if7A	98	ssytlrilrq	lrniqvtnhs	---qmntcel	hltsvedad	dnvsfrweal		
TARGET		SSSSSSSS	SSSSS	SSS	SSSSS			SSSSSS
2if7A		SSSSSSSS	SSSSS	SSS	SSSSS			SSSSSS
TARGET	399	QNKAVMSQGK	SHLNVSWE-S	GEHLPNFTCT	AHNPVSNSSS	QFSSGTICS		
2if7A	148	gntls---sq	pnltvswdpr	isseqdytci	aenavsnlfs	svsaqklce-		
TARGET		SSS	SSSSSSSS	SSSSSS	SSS	SSSSS	SSSSHHH	
2if7A		SSS	SSSSSSSS	SSSSSS	SSS	SSSSS	SSSS	

Anolea

Batch.1

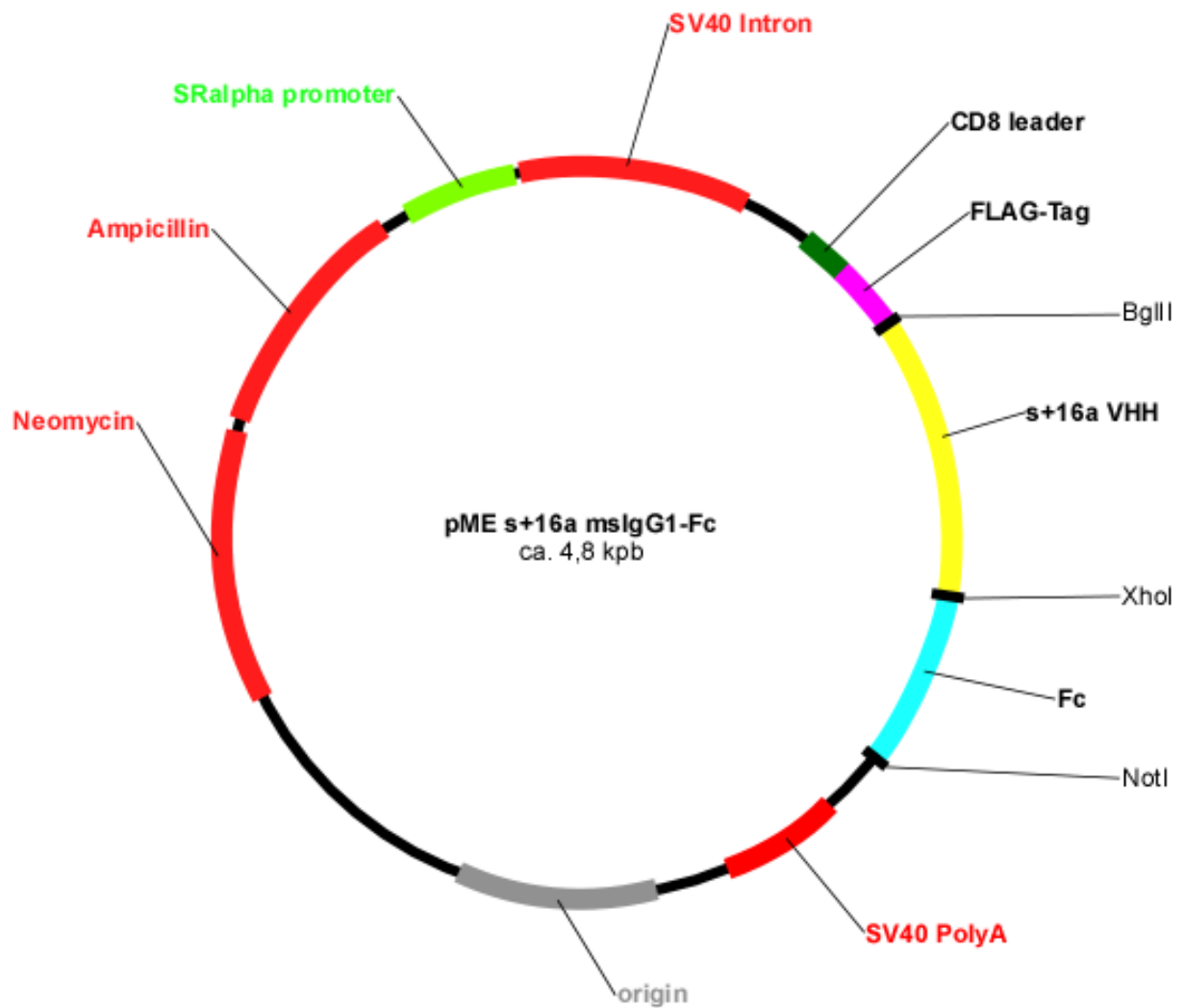


Modelling log

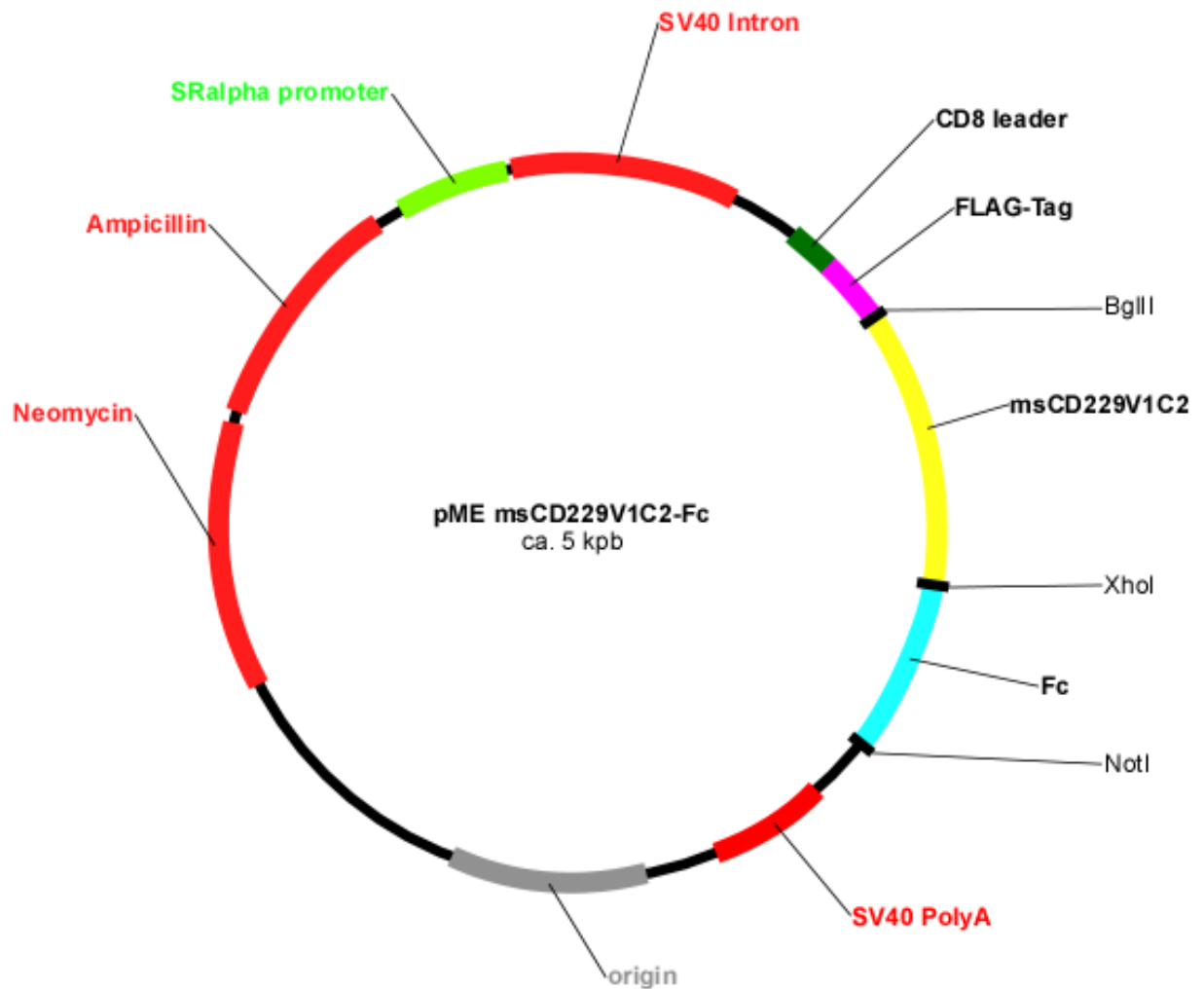
```
3.70 (SP3)
Loading Template: 2if7A.pdb
Loading Raw Sequence
Renumber target sequence starting from (252)
Loading Alignment: ./NXXX.align.submit.fasta
Removing HET groups from template structure
Refining Raw Sequence Alignment
ProModII: doing simple assignment of backbone
ProModII: adding blocking groups
Adding Missing Sidechains
AddPolar H
BuildDeletetedLoopsModel
Small Ligation (C-N < 3.0A) ignored;
GROMOS will repair it at residue SER 167
Building CSP loop with anchor residues ARG 311 and THR 314
Number of Ligations found: 5
ACCEPTING loop 1: clash= 0 FF= 39.5 PP= 1.00
Building CSP loop with anchor residues ARG 344 and SER 347
Building CSP loop with anchor residues SER 343 and SER 347
Number of Ligations found: 4
all loops are bad; continuing CSP with larger segment
Building CSP loop with anchor residues ALA 342 and SER 347
```

Number of Ligations found: 262
ACCEPTING loop 186: clash= 0 FF= -272.2 PP= -4.00
Building CSP loop with anchor residues PRO 368 and MET 372
Number of Ligations found: 78
ACCEPTING loop 5: clash= 0 FF= -13.5 PP= 0.00
Building CSP loop with anchor residues VAL 403 and GLY 407
Building CSP loop with anchor residues VAL 403 and LYS 408
Number of Ligations found: 146
ACCEPTING loop 22: clash= 0 FF= 205.5 PP= 0.00
Optimizing Sidechains
Adding Hydrogens
Optimizing loops and OXT (nb = 18)
Final Total Energy: -5735.317 KJ/mol
Dumping Sequence Alignment

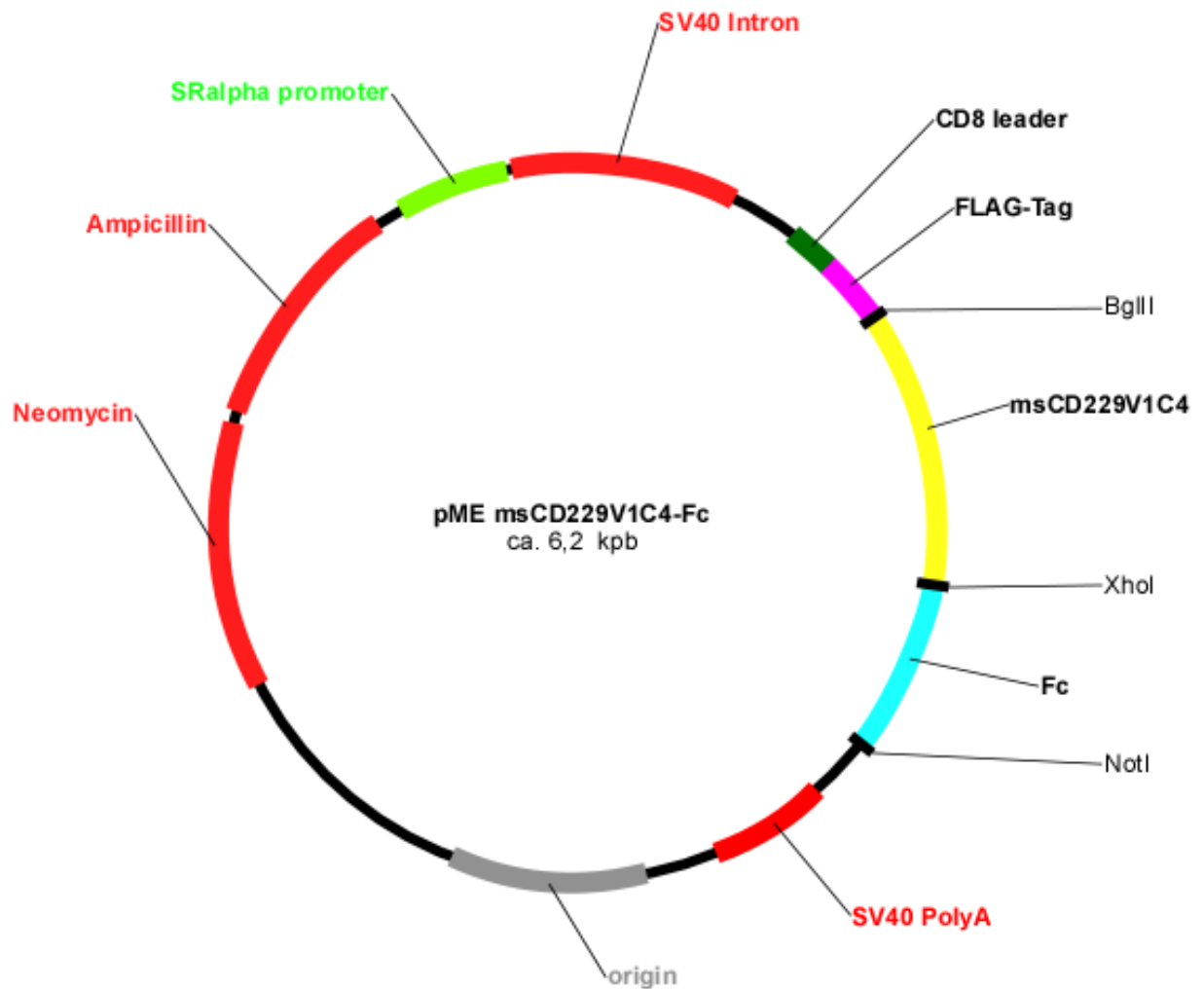
Plasmide



Replikationsursprung (origin)
Neomyconresistenz Gen (Neomycin)
Ampicillinresistenz Gen (Ampicillin)
SR alpha Promoter (SRalpha promoter)
SV40 Intron (SV40 Intron)
CD8- Signalsequenz (CD8 leader)
FLAG Aminosäuresequenz (FLAG-Tag)
s+16a VHH cDNA Insert (s+16a VHH)
mslgG1-Fc (Fc)
SV40 Poly Adenin (SV40 PolyA)



- Replikationsursprung (origin)
- Neomyconresistenz Gen (Neomycin)
- Ampicillinresistenz Gen (Ampicillin)
- SR alpha Promoter (SRalpha promoter)
- SV40 Intron (SV40 Intron)
- CD8- Signalsequenz (CD8 leader)
- FLAG Aminosäuresequenz (FLAG-Tag)
- msCD229 Domänen V1-C2 cDNA Insert (msCD229V1C2)
- msIgG1-Fc (Fc)
- SV40 Poly Adenin (SV40 PolyA)



- Replikationsursprung (origin)
- Neomyconresistenz Gen (Neomycin)
- Ampicillinresistenz Gen (Ampicillin)
- SR alpha Promoter (SRalpha promoter)
- SV40 Intron (SV40 Intron)
- CD8- Signalsequenz (CD8 leader)
- FLAG Aminosäuresequenz (FLAG-Tag)
- msCD229 Domänen V1-C4 cDNA Insert (msCD229V1C4)
- msIgG1-Fc (Fc)
- SV40 Poly Adenin (SV40 PolyA)

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Danksagung

Ich möchte allen danken, die mir bei der Arbeit an diesem Thema geholfen haben. Vor allem möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. F. Nolte für die Vermittlung eines so interessanten Themas danken. Außerdem dafür, dass er sich immer viel Zeit nahm. Des Weiteren für seine Verständnisvolle Art und für seine stete Unterstützung über den gesamten Arbeitsprozess hinweg und für seine bewundernswerte Fähigkeit, viel Wissen zu verwalten und zu vermitteln.

Großen Dank gebührt Herrn Prof. A. W. Lohse und dem UKE, welche mir ermöglichten, durch meine Teilnahme am Graduiertenkolleg in Vollzeit im Labor tätig zu sein und viele weitere interessante Arbeiten und Arbeitsgruppen kennenzulernen.

Ich möchte allen Mitarbeitern des Institutes für Immunologie am UKE danken. Hierbei sind vor allem MTA V. Schumacher, MTA M. Nissen, Dr. B. Rissiek sowie Dr. J. Reyelt zu nennen, welche durch ihre fundierten Kenntnisse in der Methodik eines molekularbiologischen Labores meine praktischen Fähigkeiten bereicherten.

Ganz besonders danke ich Dr. Björn Rissiek für seine ausdauernde Unterstützung beim Korrigieren der schriftlichen Fassung der Dissertation, und dafür, dass er sich viel Zeit nahm und mich immer wieder motivierte, weiter zu machen. Ohne seine Hilfe wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ich bin dankbar für seine Freundschaft und hoffe, diese wärt noch viele weitere Jahre.

Danke an M. Nissen, welche selbstlos Unterstützung bei Problemen der Zellkultur lieferte. Vielen Dank an V. Schumacher für das Näherbringen vom sauberen und strukturierten Arbeiten im Labor. Danke an J. Reyelt für die molekulargenetischen Methoden, welche er vermittelte und selbst in großem Maßstab betrieb. Ich danke allen Mitarbeitern für ihre fortwährende konstruktive Kritik, Unterstützung, die Hilfe beim Erlernen von molekularbiologischen und immunologischen Methoden und für die wertvolle Zeit, welche ich mit Ihnen verbringen durfte.

Dankesehr an die Menschen, welche mit und ohne Vorkenntnisse in der Immunologie und Molekularbiologie meine Arbeit gelesen und mich bei der Korrektur unterstützt haben.

Ich danke meiner lieben Freundin Anne C. Queisser für ihr sprachliches Talent und die Korrekturen in der letzten Phase. Ich danke René Wolf für die fortwährende freundschaftliche und moralische Unterstützung. Danke an Herrn G. Fischer für seine freundschaftliche Unterstützung und fundierten Kenntnisse in Germanistik.

Last but not least möchte ich meinen Eltern danken, welche mein Interesse an akademischen Themen früh erkannt haben und mich dabei unterstützten und unterstützen meinen Weg zu finden, anderen Menschen zu helfen.

Sollte ich hier jemanden nicht genannt haben, dann liegt dies nicht an Undankbarkeit, sondern an meiner Vergesslichkeit. Hiermit möchte ich mich auch bei allen bedanken, die mich unterstützt und inspiriert haben, die ich hier nicht genannt habe.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe. Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: