

# **Charakterisierung einer neuen Isoform des humanen p75TNF-Rezeptors**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der naturwissenschaftlichen Fakultät IV  
Chemie und Pharmazie  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
Christoph Scherübl  
aus Schwandorf**

**2004**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2002 bis Dezember 2004 unter Anleitung von Frau Prof. Dr. D. N. Männel am Institut für Immunologie des Klinikums der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am: 21. Dezember, 2004

Die Arbeit wurde geleitet von Prof. Dr. S. Elz  
Prof. Dr. D.N. Männel

Prüfungsausschuß: Prof. Dr. A. Buschauer (Vorsitz)  
Prof. Dr. S. Elz  
Prof. Dr. D.N. Männel  
Prof. Dr. A. Göpferich

**Für meine Eltern**

***In Dir muss brennen, was Du in anderen entzünden willst.***  
Augustinus, Aurelius (354-430)

---

<b>A: Einleitung.....</b>	1
<b>1. Zytokine.....</b>	1
<b>2. Zytokinrezeptoren.....</b>	2
<b>3. Das TNF/TNF-Rezeptor System.....</b>	3
3.1 Tumor-Nekrose-Faktor.....	4
3.1.1 Das Zytokin TNF im Überblick.....	4
3.1.2 Genlocus, transkriptionelle und post-transkriptionelle Regulation....	5
3.1.3 Die Biochemie und das Prozessieren von TNF.....	5
3.1.4 Expression, Regulation und Funktion von TNF.....	6
3.2 Die TNF-Rezeptoren.....	6
3.2.1 Nomenklatur.....	6
3.2.2 Struktur.....	7
3.2.3 Interaktion von TNF mit seinen Rezeptoren.....	7
3.2.4 Expression, Regulation und Funktion der TNF-Rezeptoren.....	8
3.2.5 Lösliche TNF-Rezeptoren.....	9
<b>4. Alternatives Spleißen.....</b>	10
4.1 Allgemeines.....	10
4.2 Alternativ gespleißte Zytokinrezeptoren.....	11
4.3 Spleißformen des p75TNF Rezeptors.....	13
<b>5. TNF in der Klinik.....</b>	15
5.1 Die TNF-Therapie.....	15
5.2 Die anti TNF-Therapie.....	16
5.2.1 Allgemeines.....	16
5.2.2 Die Entwicklung von TNF-Inhibitoren.....	17
<b>B: Material und Methoden.....</b>	19
<b>1. Material.....</b>	19
1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	19
1.2 Verbrauchsmaterial und Geräte.....	21
1.3 Komponenten des Fluoreszenzmikroskops.....	22
1.4 Kits.....	23
1.5 Molekulargewichtsstandards.....	23
1.6 Antikörper und Enzyme.....	23
1.7 Oligonukleotide.....	25
1.8 Plasmide.....	25
1.9 Puffer und Lösungen.....	26
1.10 Zelllinien.....	29
1.11 Tiere.....	29
<b>2. Methoden.....</b>	30
<b>2.1 Bakterienkultur.....</b>	30
2.1.1 E. coli Stämme.....	30

2.1.2 Kultivierung von E. coli.....	30
2.1.3 Herstellung von Dauerkulturen.....	30
2.1.4 Herstellung von transformationskompetenten E. coli-Bakterien.....	30
2.1.5 Transformation von E. coli.....	30
2.1.6 Blau-Weiß-Selektion.....	31
<b>2.2 Arbeiten mit DNA.....</b>	<b>31</b>
2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli.....	31
2.2.2 Analytische und präparative Gelelektrophorese.....	31
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
2.2.4 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme.....	33
2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten.....	33
2.2.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	33
2.2.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	33
<b>2.3 Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>34</b>
2.3.1 Messung der Proteinkonzentration.....	34
2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese SDS-Page.....	34
2.3.3 Coomassie-Färbung.....	35
2.3.4 Western Blot.....	35
2.3.5 Dot-Blot.....	36
2.3.6 Detektion membrangebundener Proteine durch Antikörper.....	36
2.3.7 RIPA-Lyse.....	36
2.3.8 Immunopräzipitation.....	36
2.3.9 Kovalente Bindung von humanem TNF an CNBr-Sepharose.....	37
2.3.10 Reinigung der Extrazellulärdomäne des hicp75TNFR durch Affinitäts-Chromatographie.....	37
2.3.11 Rezeptosomenisolierung.....	38
2.3.12 Peptidsynthese.....	38
2.3.13 FITC-Markierung von Proteinen.....	38
<b>2.4 Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>39</b>
2.4.1 Zellkulturbedingungen.....	39
2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	39
2.4.3 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	39
2.4.4 Mycoplasmentest.....	40
3.4.5 Induktion und Hemmung von Rezeptor-shedding.....	40
3.4.6 TNF-Zytotoxizitäts-Assay.....	40
3.4.7 TNF-Zytotoxizitäts-Hemm assay.....	41
3.4.8 Transfektion.....	41
3.4.9 Retrovirale Transduktion.....	41
3.4.10 Allgemeine Durchflußzytometrie und Zellsortierung.....	42
<b>2.5 Immunologische Methoden.....</b>	<b>43</b>
2.5.1 Allgemeine ELISA Methode.....	43
2.5.2 ELISA zur Quantifizierung von löslichem humanem p75TNFR.....	44
2.5.3 Zell basierter ELISA.....	44
<b>2.6 Fluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>44</b>
2.6.1 Verwendete Filtersätze.....	44

2.6.2 Herstellung der Fixierlösung (Paraformaldehyd 4%).....	45
2.6.3 Immunhistochemische Färbungen.....	45
2.6.4 Präparation YFP-Fusionsprotein exprimierender Zellen.....	45
2.6.5 Doppelfärbung: Rezeptor und subzellulärer Kompartimente.....	46
2.6.6 Live-Cell-Imaging.....	47
2.6.7 Schichtaufnahmen der Zelle (z-Stacks).....	47
2.6.8 Exhaustive Photon Reassignment (EPR).....	48
<b>2.7 Herstellung monoklonaler Antikörper.....</b>	48
2.7.1 Immunisierung von Mäusen.....	48
2.7.2 Gewinnung von Serum aus Vollblut.....	49
2.7.3 Gewinnung von Peritonealzellen (Feeder-Zellen).....	49
2.7.4 Gewinnung von Milzzellen.....	49
2.7.5 Zellfusion mit Polyethylenglykol.....	49
2.7.6 Klonierung von positiven Hybridomzellen.....	50
<b>2.8 Tierhaltung.....</b>	50
<b>C: Ergebnisse.....</b>	51
<b>1. Projektbeschreibung.....</b>	51
<b>2. Klonierung von tag-markierten hicp75TNFR Expressionskonstrukten.....</b>	51
2.1 Rezeptorkonstrukte mit humaner c-myc-Markierung.....	51
2.2 Fusionsproteine aus GFP-Analoga und humanen p75TNFR-Isoformen.....	52
<b>3. Subzelluläre Lokalisierung.....</b>	53
3.1 Vergleich der beiden Färbeprotokolle.....	54
3.2 Gegenfärbung des endoplasmatischen Retikulums.....	55
3.3 Gegenfärbung des Golgi-Apparates.....	55
3.4 Gegenfärbung der Lysosomen.....	56
3.5 Gegenfärbung der Mitochondrien.....	56
3.6 Gegenfärbung der Endosomen.....	57
<b>4. Untersuchungen zur Membranexpression beider hp75TNFR-Isoformen.....</b>	58
<b>5. Untersuchungen zur Prozessierung löslicher hp75TNFR-Isoformen.....</b>	59
5.1 Identifizierung von löslichem hicp75TNFR.....	59
5.2 Identifizierung der proteolytisch aktiven Enzyme.....	61
5.3 Vergleich der Freisetzung beider löslicher hp75TNFR-Isoformen...	62
<b>6. Bioaktivität des löslichen hicp75TNFR.....</b>	63
<b>7. Biochemische Charakterisierung des hicp75TNFR-Proteins.....</b>	64

<b>8. Herstellung monoklonaler Antikörper gegen die Präsequenz des hicp75TNFR.....</b>	66
8.1 Immunisierung von Mäusen und Fusion der Milzzellen.....	67
8.2 Stabil etablierte anti-Exon 1a-Peptid-Antikörper produzierende Hybridome.....	67
8.3 Detektion des Peptids als Präsequenz des hicp75TNFR.....	70
8.3.1 Natives Protein.....	70
8.3.2 Reduziertes Protein.....	71
<b>9. Untersuchungen zur Ligand-Rezeptor-Interaktion.....</b>	72
9.1 Aktivierung des hicp75TNFR durch exogenes TNF.....	72
9.2 Aktivierung des hicp75TNFR durch endogenes TNF.....	73
<b>10. Untersuchungen zur Funktion des hicp75TNFR.....</b>	75
10.1 Gesortete, transduzierte L929-Zelllinien im TNF-Zytotoxizitätsassay	75
10.2 Induktion des Zelltodes durch einen agonistischen Antikörper gegen p55TNFR.....	76
10.3 Induktion des Zelltodes durch Aktivierung von FAS.....	76
<b>D: Diskussion.....</b>	78
1. Lokalisierung der neuen hp75TNFR-Isoform.....	78
2. Untersuchung des löslichen hicp75TNFR.....	81
3. Die Biochemie des hicp75TNFR.....	82
4. Monoklonale Antikörper gegen die Präsequenz des hicp75TNFR	83
5. Ligand-Rezeptor-Interaktionen.....	84
6. Mögliche biologische Funktion des hicp75TNFR.....	86
<b>E: Zusammenfassung.....</b>	90
<b>F: Literaturverzeichnis.....</b>	92
<b>Danksagung.....</b>	103
<b>Anhang.....</b>	105

## A. Einleitung

### 1. Zytokine

Zytokine sind sezernierte Glykoproteine oder Proteine mit geringem Molekulargewicht (kleiner als 30 kDa) die als humorale Regulatoren in nano- bis picomolaren Konzentrationen wirken und die sowohl unter normalen als auch pathologischen Bedingungen Funktionen von Zellen und Geweben regulieren und modulieren. Sie werden von vielen Zellen, nicht nur von denen des Immunsystems, freigesetzt. Zytokine agieren in der Regel als zielgerichtete parakrine oder autokrine interzellulare Botenstoffe und gelangen meist in biologischen Stresssituationen in den Blutkreislauf. Trotz der strukturellen Vielfalt lassen sich einige gemeinsame Eigenschaften feststellen:

1. Die Zytokinfreisetzung ist ein kurzes und reguliertes Ereignis.
2. Die Zytokinwirkung ist oft pleiotrop und redundant.
3. Zytokine beeinflussen oft Synthese und Wirkung anderer Zytokine.
4. Zytokine wirken sowohl lokal als auch systemisch.
5. Zytokine üben ihre Wirkung durch Bindung an spezifische Rezeptoren aus.
6. Externe Signale regulieren die Expression und das Ansprechen von Zytokinrezeptoren.
7. Die Aktivierung einer Zelle durch Zytokine hat meist eine Änderung der Genexpression zur Folge.

Bezüglich ihrer Funktionen lassen sich Zytokine in drei Hauptkategorien einteilen:

1. Mediatoren und Regulatoren der angeborenen Immunität (v.a. mononukleäre Zellen)
2. Mediatoren und Regulatoren der erworbenen Immunität (v.a. T-Lymphozyten)
3. Stimulatoren der Hämatopoiese (v.a. Stromazellen des Knochenmarks)

In vielen Fällen existieren sowohl lösliche als auch membrangebundene Formen der Zytokine. Aus allen oben aufgeführten Eigenschaften ergibt sich eine vielfältige Zytokin-Zytokin-Wechselwirkung, die zu dem Begriff des Zytokin-Netzwerkes geführt hat (Abbas, 2000, Ibelgaufts, 2004).

## 2. Zytokinrezeptoren

Wie bereits erwähnt, vermitteln Zytokine ihre Wirkung auf Zielzellen durch spezifische Rezeptoren, die sich anhand der Struktur ihrer Extrazellulär- bzw. Ligand-Bindungsdomänen in fünf Familien unterteilen lassen (Abbas, 2000).

Die **Type-1-Zytokinrezeptoren**, auch als Hämatopoetinrezeptoren bezeichnet, weisen in ihrer Extrazellulärdomäne zwei charakteristische Merkmale auf. Zum einen mindestens ein Motiv aus zwei konservierten Cysteinpaaren und zum anderen ein membrannahes WS-Motiv, das durch die strenge Aminosäurenabfolge von Trp-Ser-X-Ser-Trp, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellen kann, gekennzeichnet ist. Beide Motive bilden vermutlich die Grundlage um 4  $\alpha$ -helikale Zytokine zu binden. Die Spezifität der einzelnen Rezeptoren erfolgt durch Unterschiede in den restlichen Aminosäuren. Die funktionellen Komplexe dieser Rezeptoren bestehen aus spezifischen Ligand-Bindungsketten und Signaltransduktionsketten. Letztere werden von verschiedenen Zytokinrezeptoren rekrutiert, was wiederum die oft pleiotropen und redundanten Effekte erklärt.

Als Vertreter dieser Gruppe wären sowohl die Rezeptoren der Interleukine 2-7, 9, 11, 12, 13, 15 als auch die Rezeptoren von GM-CSF, G-CSF, „growth hormon“ und Prolactin zu nennen.

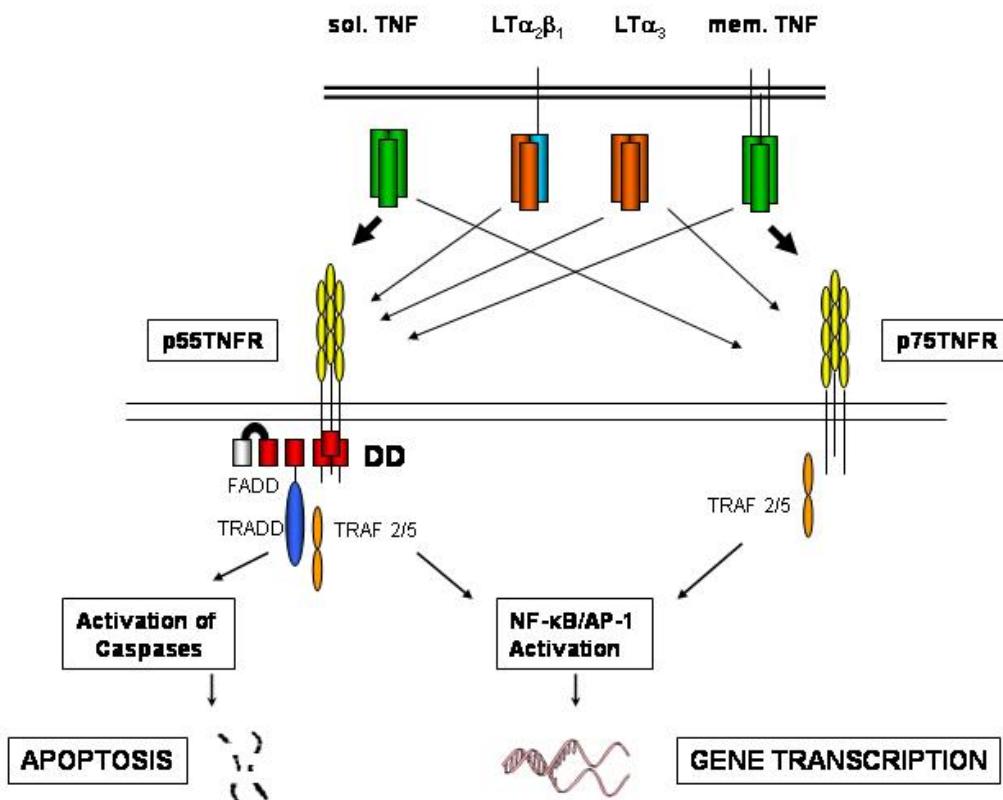
**Type-2-Zytokinrezeptoren** unterscheiden sich von den Type-1-Rezeptoren durch das Fehlen des WSXSW Motivs. Die Liganden dieser Rezeptoren werden in Analogie dazu Klasse-2-Zytokine genannt. Hierzu zählt man z.B. die Interferone, „interferon-like molecules“ und die Interleukine 19, 20, 22, 24, 26, 28A, 28B und 29. Der funktionelle Komplex besteht auch hier aus einer ligandbindenden und einer signaltransduzierenden Polypeptidkette.

Einige Zytokinrezeptoren weisen im extrazellulären Bereich Immunglobulindomänen (Ig) auf. Zu der Gruppe der **Ig-Superfamilie** zählt man sowohl die beiden Rezeptoren von Interleukin 1, als auch die Rezeptoren von M-CSF und SCF.

**Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen** spielen auch in der Immunologie eine große Rolle als Rezeptoren für Chemokine. Nach Aktivierung durch einen Liganden erfolgt die Signaltransduktion über G-Proteine.

Die fünfte Familie wird als **TNF- oder NGF-Superfamilie** bezeichnet. Als Strukturmerkmal gelten hier die konservierten cysteinreichen Extrazellulärdomänen. Nach Aktivierung durch ihre trimeren Liganden, trimerisieren auch die Rezeptoren und induzieren Apoptose oder Genexpression. Auf die beiden TNF-Rezeptoren wird im Kapitel A:3.2 noch näher eingegangen.

### 3. Das TNF/TNF-Rezeptor System



**Abb. 1: Übersicht über die Moleküle des TNF/TNF-Rezeptor-Systems.** Neben den beiden Formen von TNF bindet auch Lymphotoxin  $\alpha_3$  an beide TNF-Rezeptoren. Lymphotoxin  $\alpha_2\beta_1$  bindet an den p55TNFR. Höhere Affinitäten werden durch breitere Pfeile dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nicht alle beteiligten Proteine der Signalkaskade aufgeführt. DD, death domain; TRAF2, TNF-receptor-associated-factor 2; TRADD, TNF-receptor-associated-death domain. (Modifiziert nach Pfeffer, 2003)

### 3.1 Tumor-Nekrose-Faktor

#### 3.1.1 Das Zytokin TNF im Überblick

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde die Beobachtung gemacht, dass in einigen Fällen inoperable Sarkome nekrotisch wurden, wenn bei jenen Patienten gleichzeitig schwere bakterielle Infektionen auftraten. Dies führte erstmals zur Verknüpfung von Infektion, Entzündung und antitumoralem Effekten (Coley, 1893). 1975 wurde ein Molekül entdeckt, das in LPS behandelten Mäusen Tumornekrose induzierte und daraufhin den Namen Tumor-Nekrose-Faktor erhielt (Carswell, 1975). Zehn Jahre später gelang es TNF zu klonieren und in *Escherichia coli* zu exprimieren (Aggarwal, 1985). Weitere Untersuchungen zeigten, dass TNF dem bereits beschriebenen Kachektin entspricht, einem Protein, das von Makrophagen sezerniert und für die Auszehrungserscheinungen bei Patienten, die an malignen Neoplasien oder chronischen Entzündungen erkrankt sind, verantwortlich ist (Beutler, 1985).

In gesunden Individuen lässt sich selbst mit hoch sensiblen Assays (Detektionslimit 200 attomolar) kein zirkulierendes TNF nachweisen. Im Gegensatz dazu werden im septischen Schock nanomolare Konzentrationen gemessen. In akuten und vor allem in chronischen Entzündungen spielen die erhöhten TNF-Spiegel eine wichtige Rolle, da TNF die Expression weiterer pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-1 induziert. Dies ist einer der Gründe, warum die TNF-Blockade bei chronischen Entzündungen so gute Erfolge zeigt (siehe Abschnitt 5.2).

Die Datenbank „Pubmed“ listet unter TNF über 48000 Treffer auf (Stand Oktober 2004) und lässt erahnen, wie viele Daten, meist in Bezug auf Entzündung und Krebs, generiert wurden. Je nach Ansatz oder Modell wurden diesem Molekül viele, oft auch widersprüchliche Effekte, zugeschrieben. Neben den oben genannten Erkrankungen ist die Beteiligung an diversen anderen pathologischen Zuständen wie z.B. Diabetes, neurodegenerativen Erkrankungen und Fettsucht belegt (Aggarwal, 2002).

Durch molekulare Untersuchungen und Homologiestudien in Datenbanken konnte eine hoch konservierte Substanzgruppe identifiziert werden die mit TNF bzw. den TNF-Rezeptoren strukturelle Ähnlichkeiten aufweist, und deren Mitglieder unter dem Begriff TNF-Superefamilie bzw. TNF-Rezeptor-Superefamilie zusammengefasst werden (Locksley, 2001).

### 3.1.2 Genlocus, transkriptionelle und post-transkriptionelle Regulation

Die Gene für TNF und dem homologen Lymphotoxin (LT) befinden sich bei allen Wirbeltieren in der MHC-Region, die beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 liegt. Diese Region hat die höchste Gendichte und die meisten Polymorphismen des ganzen Genoms. TNF-Polymorphismen, meist in der Promotorregion, sind ausgiebig studiert worden und einige von ihnen sind mit pathophysiologischen Zuständen assoziiert (Hajeer, 2000). In der 3' untranslatierten Region befinden sich AU-rich elements (AREs), die die Stabilität der mRNA kontrolliert (Ruuls, 1999). Mäusen, denen diese Region fehlt, erkranken an rheumatoider Arthritis und Colitis. Grund dafür sind hohe TNF-Spiegel aufgrund erhöhter Stabilität der TNF-mRNA. Werden diese Mäuse auf einen p75TNFR defizienten Mausstamm rückgekreuzt, geht dieser Phänotyp verloren, was die Rolle dieses Rezeptors in chronischen Entzündungen unterstreicht (Kontoyiannis, 1999).

### 3.1.3 Die Biochemie und das Prozessieren von TNF

TNF wird als Typ-II-Membranprotein exprimiert und bildet spontan homotrimere Strukturen aus. Das humane Protein wird als 233-Aminosäuren-lange (26 kDa) Vorläuferform translatiert und daraufhin post-translational modifiziert. Neben Myristinsäure, die über eine Amidbindung an Lysine (K19, K20) gekoppelt wird (Stevenson, 1992), werden Palmitinsäure-Thioester an Cystein (C47) beschrieben (Utsumi, 2001). Potentielle N-Glycosilierungsstellen sind im Gegensatz zu O-Glycosilierungsstellen nicht vorhanden (Muller, 1986). Die Signalsequenz des Pro-Peptids ist mit 76 Aminosäuren ungewöhnlich lang und dient in erster Linie dazu, das Molekül in der Zytoplasmamembran zu verankern. Neuere Daten sehen in dieser Präsequenz die Grundlage für retrograde TNF-Signal-Übertragung (Domonkos, 2001, Eissner, 2000).

Das lösliche TNF (17 kDa), ebenfalls ein Homotrimer, entsteht durch proteolytische Prozessierung (Shedding) von membranständigem pro-TNF vorwiegend durch die Metalloproteinase TACE/ADAM17 (TNF-Alpha-Cleavage-Enzyme) (Black, 1997). Deletiert man die Aminosäuren 1 bis 12, wird die Bildung von löslichem TNF fast vollständig unterdrückt. Mäuse, die Gelenk-spezifisch mutiertes TNF als Transgen exprimieren, erkranken an Arthritis, was die Ligandeigenschaften von membranständigem pro-TNF beweist (Alexopoulou, 1997).

### 3.1.4 Expression, Regulation und Funktion von TNF

Auf Seiten der hämatopoetischen Zellen wird TNF von aktivierten Monozyten bzw. Makrophagen sowie von NK-Zellen, T- und B-Lymphozyten, Granulozyten und Mastzellen produziert. Als Stimuli fungieren LPS, gram-positive und gram-negative Bakterien, Viren, Protozoen und Pilze (Mannel, 2000), sowie IFN $\gamma$ , IL-1, IL-2 und TNF selbst. Darüber hinaus wurden auch Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs, z.B. Endothelzellen, Fibroblasten und einige Tumorzellen als TNF-Produzenten identifiziert. Die Synthese erfolgt nicht konstitutiv sondern ist stark reguliert (Aggarwal, 1996). Mäuse, die transgen für den TNF-Genlocus sind, zeigen eindeutige Anzeichen von chronischen Entzündungen (Butler, 1997). Andererseits bestärkt das Fehlen dieses Zytokins in knockout-Mäusen, die Rolle von TNF als Schlüsselmolekül in der Immunantwort. Diese Mäuse haben Probleme, eine mikrobielle Infektionen zu kontrollieren und zu beseitigen (Marino, 1997). Darüber hinaus ist TNF an der Regeneration von Geweben und der Wundheilung beteiligt. TNF kann Zellen in die Apoptose schicken, sie aber auch zur Proliferation anregen (Tartaglia, 1993b). Neuere Publikationen bescheinigen TNF darüber hinaus ein angiogenetisches Potential (Frater-Schroder, 1987) (Feldmann, 2004). Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass TNF ein äußerst zentrales, wichtiges und pleiotropes Zytokin ist.

## 3.2 Die TNF-Rezeptoren

### 3.2.1 Nomenklatur

TNF vermittelt seine Effekte über zwei Rezeptoren. Für beide TNF-Rezeptoren gibt es je nach verwendeter Nomenklatur verschiedene Bezeichnungen. Die jeweils fett gedruckte wird im weiteren Text verwendet.

TNF-Rezeptor 1 (accession number M75866):

**TNFR1, p55TNFR, p55/p60** (mouse/human), CD120a, TNFRSF1A

TNF-Rezeptor 2 (accession number M32315):

**TNFR2, p75TNFR, p75/p80** (mouse/human), CD120b, TNFRSF1B

### 3.2.2 Struktur

Die beiden human membranständigen TNF-Rezeptoren wurden erst 1990, einige Zeit nach der Entdeckung ihres Liganden, kloniert (Loetscher, 1990, Smith, 1990). Die Maus-Rezeptoren folgten ein Jahr später (Lewis, 1991). Aufgrund ihres Molekulargewichts wurden sie als p55TNFR bzw. p75TNFR bezeichnet. Es handelt sich um Type-I-Membranproteine, die aufgrund der charakteristischen cysteinreichen Domänen im extrazellulären Bereich namensgebend für die TNF-Rezeptor-Superfamilie waren. Betrachtet man die Aminosäuresequenzen, ist der p75TNFR (439 aa) nur unwesentlich größer als der p55TNFR (426 aa). Die 20 kDa Unterschied, die im reduzierenden SDS-PAGE zu beobachten sind, können jedoch nicht nur auf unterschiedliche Glycosilierungen zurückgeführt werden (Corti, 1995a, Corti, 1995b). Es wird vermutet, dass die Laufeigenschaften durch individuelle Tertiärstrukturen, die sich mit SDS und dem reduzierenden Agens bilden, beeinflusst werden (Kohno, 1990). Die Ligand-Bindungsdomänen sind sehr ähnlich. Die übrigen extrazellulären Abschnitte weisen je nach Spezies eine Sequenzhomologie von ca. 30% auf. An die hydrophoben Transmembrandomänen schließen sich unterschiedlich gestaltete intrazelluläre Domänen an. Der p55TNFR weist in diesem Bereich eine sog. Todesdomäne („Death Domain“, DD) auf (Tartaglia, 1993a), die nach Rezeptoraktivierung das spezifische bivalente Adapterprotein TRADD rekrutiert (siehe Abb.1) und sowohl Apoptose als auch den klassischen, anti-apoptotischen und pro-inflammatorischen NF $\kappa$ B-Weg einleitet. Der p75TNFR hingegen hat diese Domäne nicht, sondern besitzt am C-terminalen Ende der Intrazellulärdomäne eine Bindungsstelle für TRAF-Moleküle. Die Bindung des Liganden führt zur Aktivierung des klassischen und, laut neuerer Daten (persönliche Mitteilung von H. Engelmann an D. N. Männel), auch des alternativen NF $\kappa$ B-Pathways. Details zur TNF-Rezeptor-Signal-Übertragung können dem Review von Wajant entnommen werden (Wajant, 2003).

### 3.2.3 Interaktion von TNF mit seinen Rezeptoren

Beide TNF-Rezeptoren weisen N-terminal eine *pre-ligand-assembly-domain* (PLAD) auf, die gewährleistet, dass die Rezeptoren als Homomultimere auf der Zellmembran exprimiert werden. Die Interaktion mit homotrimeren Liganden führt dann zur Bildung von

Clusterstrukturen, die massiv eine Signalkaskade anstoßen (Chan, 2000). TNF und LT $\alpha$  binden mit hoher Affinität an beide TNF-Rezeptoren. Experimentell ermittelte Dissoziationskonstanten zeigen jedoch, dass lösliches TNF viel stärker an den p55TNFR ( $K_d \approx 20$  pM) bindet als an den p75TNFR ( $K_d \approx 300$  pM) (Grell, 1995a), wohingegen membranständiges TNF affiner für den p75TNFR ist (Grell, 1995b). Diese Erkenntnisse führten zur ligand-passing-Hypothese, die dem p75TNFR die Rolle eines Ligandfängers zuteilte, der den Liganden dann an den höher affinen p55TNFR weitergibt (Tartaglia, 1993c). Neuere Daten rücken den p75TNFR jedoch in ein neues Licht. Seine Beteiligung an der Thymozytenproliferation (Grell, 1998), die Eigenschaft als Kostimulator bei der T-Zell-Aktivierung (Aspalter, 2003) und die konstitutive Expression auf regulatorischen T-Zellen (Annunziato, 2002) gelten als sicher, was im Umkehrschluss die Rolle des membranständigen TNF, als bevorzugten Liganden, in der interzellulären Regulation des lymphoiden Systems unterstreicht. Die Homologie zu anderen Mitgliedern der TNFR-Superfamilie, wie CD40 und dem LT $\beta$ -Rezeptor, und die Tatsache, dass über den p75TNFR ebenfalls der alternative NF $\kappa$ B-Signalweg aktiviert wird, ordnet diesen Rezeptor, im Gegensatz zum p55TNFR, vornehmlich der erworbenen Immunität zu.

Die Aktivierung des p55TNFR setzt sowohl apoptotische als auch anti-apoptotische Prozesse in Gang (Abb. 1). Durch die Blockierung der Rezeptor-Ligand-Komplex-Internalisierung (Schütze, 1999) und nachfolgender Isolierung der Rezeptosomen gelang es die beiden Signalkaskaden zu kompartimentalisieren (Schneider-Brachert, 2004). Nun ist klar, dass die NF $\kappa$ B-Aktivierung als frühes Ereignis nach Ligandbindung an der Plasmamembran stattfindet. Erst nachdem der Komplex internalisiert ist, kommt es zur Aktivierung der Caspasen und somit zur Apoptose.

### **3.2.4 Expression, Regulation und Funktion der TNF-Rezeptoren**

Während der p55TNFR konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert wird, ist die Expression des p75TNFR stark reguliert und im Allgemeinen auf Zellen des Immunsystems beschränkt. Pro-inflammatorische Zytokine, LPS und auch Noxen wie Hypoxie sind in der Lage den p75TNFR hochzuregulieren (Seitz, 1998). Erhöhte p75TNFR Expression in chronischen Entzündungen, z.B. im Gastrointestinalbereich (Mizoguchi, 2002), bei Schlaganfall und Herzinfarkt sind logische Konsequenzen (Semenza, 1998). Die Funktionen der beiden Rezeptoren lassen sich sehr gut an gentechnisch veränderten Mäusen

erforschen. Die p55TNFR-defiziente Maus ist resistent gegenüber einem LPS-induzierten Schock und ist in ihrer Abwehr von Pathogenen beeinträchtigt (Pfeffer, 1993, Rothe, 1993). Die Entwicklung der B-Zell-Areale in den sekundären lymphatischen Organen dieser Tiere ist gestört. Die Peyer's Patch Entwicklung verläuft jedoch normal (Pasparakis, 1997). Die p75TNFR-defizienten Tiere unterscheiden sich jedoch kaum von Wildtyp-Tieren. Die Entwicklung der T-Zellen verläuft normal, sie sind jedoch weniger sensitiv hinsichtlich TNF-Zytotoxizität (Erickson, 1994). Die Proliferation reifer Lymphozyten (Grell, 1998), die Differenzierung und Aktivierung von natürlichen Killerzellen (Mason, 1995), sowie die Regulation spezifischer hämatopoetischer Prozesse werden maßgeblich von diesem Rezeptorsubtyp reguliert (Jacobsen, 1994, Jacobsen, 1995). Ob die erhöhte Expression von p75TNFR in chronischen Entzündungen deren Ursache oder Folge ist, ist noch ungeklärt (Wajant, 2003).

### **3.2.5 Lösliche TNF-Rezeptoren**

Die Extrazellulärdomänen beider TNF-Rezeptoren lassen sich als lösliche Moleküle in Serum und Urin gesunder Individuen nachweisen. Im Zuge biologischer pathologischer Prozesse steigen die Werte signifikant an. Für Patienten mit rheumatoider Arthritis (Cope, 1992), Lupus erythematoses (Aderka, 1993), Krebs (Aderka, 1991), Sepsis (Schroder, 1995) und HIV (Hofer, 1996) ist dies belegt und gilt als diagnostischer Marker.

Wie auch bei TNF ist für diesen proteolytischen Prozess vor allem TACE/Adam17 verantwortlich. In vitro-Experimente für den löslichen p75TNFR zeigten, dass dieses Rezeptor-Shedding durch Stimuli wie TNF, LPS und anti-CD3-Antikörpern um ein Vielfaches gesteigert werden kann. Als Quelle der löslichen TNFR wurden vor allem Makrophagen, T-Zellen und Granulozyten ausgemacht (Crowe, 1993, Lantz, 1994, Porteu, 1990).

Als biologische Funktion dieser löslichen Rezeptoren kann man das Neutralisieren des zirkulierenden Liganden annehmen (Mohler, 1993). Dieses Prinzip findet auch im Rahmen der anti-TNF-Therapie (siehe A:5.2) Anwendung. Eine dadurch verlängerte Halbwertszeit des komplexierten Liganden wurde zwar diskutiert, scheint jedoch keine biologische Relevanz zu haben (Aderka, 1998).

Die Tatsache, dass Zellen sich ihrer TNF-Rezeptoren entledigen können, scheint eine Schutzfunktion zu sein. Mutationen in der Extrazellulärdomäne des p55TNFR können dazu

führen, dass der Rezeptor von Metalloproteininasen nicht mehr prozessiert werden kann. Die Folge ist das „*tumor-necrosis-factor receptor-associated periodic syndrome*“, das durch immer wiederkehrende Fieberschübe und Entzündungen in Patienten mit dem entsprechenden Gendefekt gekennzeichnet ist (Aksentijevich, 2001). Neben den abgespaltenen löslichen TNF-Rezeptoren existiert für den p75TNFR eine weitere lösliche Isoform, die durch alternatives Spleißen entsteht (siehe A:4.3).

## 4. Alternatives Spleißen

### 4.1 Allgemeines

Im Hinblick auf die Transkription und der darauf folgenden Proteinsynthese bei Eukaryonten stellt das alternative Spleißen einen besonders wichtigen Vorgang dar. Auch Viren, die Eukaryonten befallen, nutzen diesen Mechanismus. Aus einer und derselben DNA-Sequenz bzw. derselben prä-mRNA können mehrere verschiedene reife mRNA's und durch deren Translation auch mehrere unterschiedliche Polypeptide gebildet werden. Die „ein-Gen-ein-Protein-Theorie“ gilt somit nicht mehr, da sich erst während des Spleißvorganges entscheidet, welche DNA-Sequenzen Introns und welche Exons sind.

Über die genaue Regulation ist noch wenig bekannt, sie erfolgt vermutlich über Pseudogene. Das alternative Splicing stellt eine evolutiv besonders bedeutende Entwicklung bei den Eukaryonten dar, denn die Informationsdichte der DNA wurde dadurch erheblich erhöht. Da große Teile des neu entstehenden Proteins bereits von funktioneller Bedeutung waren, ist die Wahrscheinlichkeit relativ hoch, eine Isoform zu generieren, die ebenso biologisch aktiv ist. Auf diese Weise wurde es den Eukaryonten ermöglicht, sich schnell an veränderte Umweltbedingungen anzupassen (Smith, 1989). Die Diversität von Antikörpern und dem T-Zell-Rezeptor wird durch alternative Spleißvorgänge stark erhöht (Abbas, 2000).

Die weitreichenden Folgen eines alternativen Spleißvorgangs sollen weitere repräsentative Beispiele zeigen. Betrifft die Modifikation ein Signalpeptid oder eine hydrophobe Transmembrandomäne kann dies Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisierung eines Proteins haben (Heaney, 1996). Änderungen im 3' untranslatierten Bereich der mRNA beeinträchtigen deren Stabilität und somit auch die Expression des Proteins. Die mögliche

Downregulation von TCR $\zeta$  durch diesen Mechanismus ist nur eins von vielen Beispielen (Tsuzaka, 2003). Auch intrazelluläre Signalmoleküle verfügen über Spliceformen, deren Präsenz die jeweilige Signalkaskade verändern kann, wie im Falle von TRAF2, das auch am TNF-Signalling beteiligt ist. Für dieses Protein existiert eine Isoform, die einen dominant negativen Effekt ausübt und die NF $\kappa$ B Aktivierung via TRAF2 hemmt (Brink, 1998).

## 4.2 Alternativ gespleißte Zytokinrezeptoren

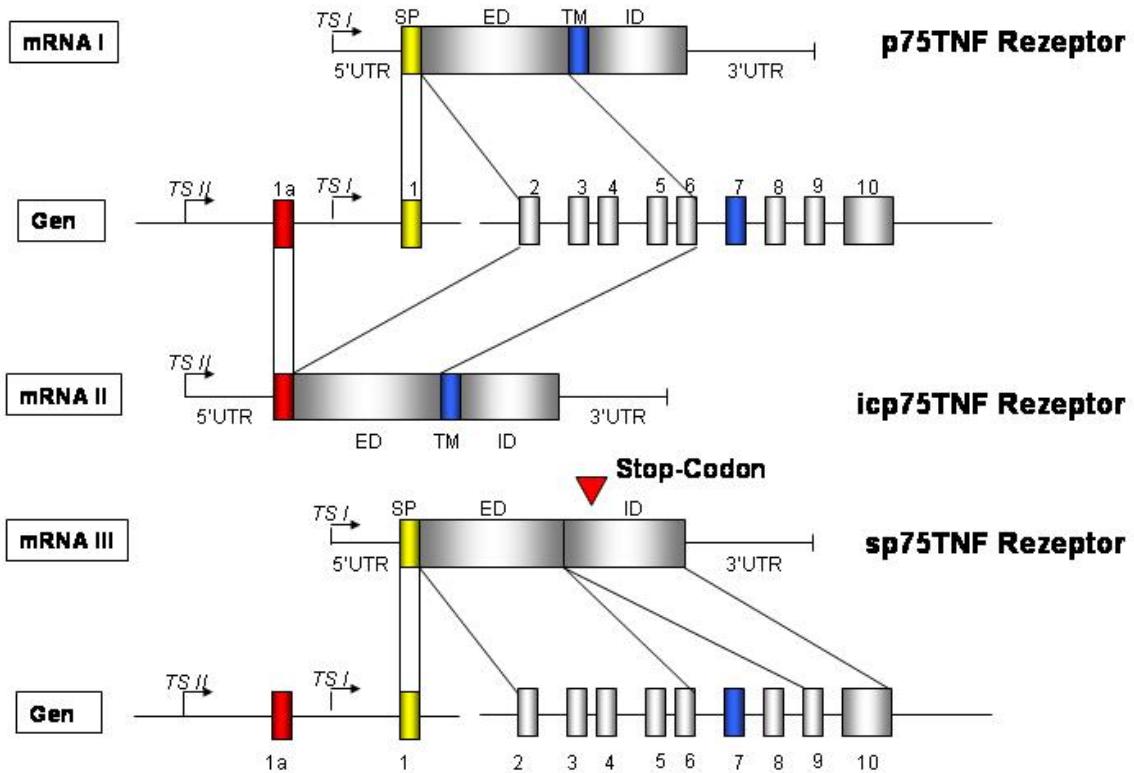
Alternatives Spleißen ist im Bezug auf Zytokinrezeptoren keine Seltenheit. Die Mehrheit der beschriebenen Isoformen stellt lösliche Rezeptoren dar, die im Gegensatz zum Shedding ihren hydrophoben Membrananker durch den Splicevorgang verlieren. Meist kommt es dadurch zu einem Frameshift, der zur Ausbildung eines neuen Stopcodons führt. Die folgende Tabelle führt die dafür bekannten Beispiele auf.

GM-CSF Rezeptor	(Raines, 1991)
G-CSF Rezeptor	(Fukunaga, 1990)
IL-4 Rezeptor	(Mosley, 1989)
IL-5 Rezeptor	(Takaki, 1990)
IL-6 Rezeptor	(Snyers, 1995)
IL-7 Rezeptor	(Goodwin, 1990)
IL-9 Rezeptor	(Renauld, 1992)
LIF Rezeptor	(Layton, 1992)
FAS	(Cheng, 1994)
EGF Rezeptor	(Petch, 1990)
IFN- $\alpha$ Rezeptor	(Abramovich, 1994)
TPO Rezeptor	(Vigon, 1993)
EPO Rezeptor	(Todokoro, 1991)
CD 137	(Schwarz, 1995)
p75TNF Rezeptor	(Lainez, 2004)

Für alle aufgeführten löslichen, durch alternatives Spleißen entstandenen, Zytokinrezeptoren konnte die Komplexierung und somit Inaktivierung des Liganden nachgewiesen werden (Heaney, 1996). Sie tragen somit zur Feinregulation im Zusammenspiel von Effektor- und Zielzellen bei. Ein weiterer möglicher Mechanismus wird bei Betrachtung des löslichen IL-6 Rezeptors sichtbar. Der Komplex aus löslichem Rezeptor und IL-6 kann in Zellen die gp130 exprimieren, eine Signal-Übertragung induzieren, obwohl die Zelle selbst keinen IL-6 Rezeptor besitzt (Taga, 1989). Des Weiteren konnte für den löslichen IL-4 Rezeptor gezeigt werden, dass nach Bindung des Liganden dessen Halbwertszeit um ein zwanzigfaches verlängert wird. Die IL-4 vermittelte IgE Ausschüttung war durch die längere Präsenz des Liganden ebenfalls erhöht (Sato, 1993).

Die Liste der durch alternatives Spleißen entstehenden intrazellulären Zytokinrezeptoren ist kurz. Im Falle des IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1RA), einem sezernierten Glycoprotein, wird eine Isoform beschrieben, bei der das Signalpeptid durch eine Non-Leadersequenz ersetzt wird. Diese Tatsache veranlasste die Autoren das Protein intrazellulären IL-1RA zu nennen (Haskill, 1991). Neuere Daten zeigen jedoch, dass der icIL1-RA sezerniert wird, und in einem transgenen Maus-Modell, ebenso wie IL1-RA selbst, vor einer Kollagen-induzierten-Arthritis schützt (Palmer, 2003). Die intrazelluläre Isoform des p75TNF Rezeptors, deren genaue Charakterisierung Gegenstand dieser Arbeit ist, entsteht durch einen ähnlichen Prozess.

### 4.3 Spleißformen des p75TNF Rezeptors



**Abb. 2: Die Struktur des p75TNFR-Gens sowie der drei mRNA-Isoformen, die durch alternatives Spleißen daraus entstehen können.** Die mRNA Isoformen I+II werden jeweils von unterschiedlichen Startpunkten (TS) aus transkribiert, was nach dem Spleißvorgang zur Ausbildung verschiedener erster Exone führt. Die mRNA-Isoform III entsteht durch Benutzung des Transkribtionsstarts I und Herausspleißen der Exone 7 und 8. SP, Signalpeptid; ED, Extrazellulärdomäne; TM, Transmembrandomäne; ID, Intrazellulärdomäne; UTR, untranslatierte Region

Der Genlocus des p75TNF Rezeptors umfasst ca. 43000 Basenpaare, liegt auf Chromosom 1 und setzt sich aus 10 Exons und 9 Introns zusammen (Santee, 1996). Die membranständige Form des p75TNF Rezeptors (mRNA I) benutzt den TS1 und spleißt die 10 Exone in der angegebenen Reihenfolge zusammen.

Die intrazelluläre, aus LPS stimulierten Makrophagen klonierte, Isoform (mRNA II) wird vom alternativen Transkriptionsstart (TS2) transkribiert, was zur Folge hat, dass im anschließenden Spleißvorgang Exon 1 wegfällt, und das alternative Exon 1a an seine Stelle

tritt. Das Signalpeptid, für das Exon 1 kodiert, wird durch eine Sequenz ersetzt, die laut Datenbankrecherchen keiner bekannten Leadersequenz entspricht (Seitz, 2001). Neuere Arbeiten konnten die phylogenetische Herkunft dieses Exons bestimmen und zeigen, dass Exon 1a durch drei Mutationen eines Alu-Elements entstand (Singer, 2004).

Alu-Boxen sind 300 basenpaar lange Abschnitte, die als sogenannter Abfall der Evolution in einer Häufigkeit von ca.  $10^6$  im ganzen menschlichen Genom vorkommen und nicht transkribiert werden. Im Falle des p75TNF Rezeptors jedoch entstanden durch zwei Punktmutationen ein Startcodon und eine Splicestelle sowie durch eine Deletion ein offenes Leseraster, was zur Exonisierung dieses ansonsten stillgelegten Abschnittes führte (Singer, 2004). Erste immunhistochemische Färbungen zeigten eine vorwiegend intrazelluläre Lokalisierung dieser Isoform.

Die dritte Isoform (mRNA III), die für einen löslichen Rezeptor (sp75TNF Rezeptor) kodiert, wurde erst kürzlich kloniert (Lainez, 2004). Sie entspricht im extrazellulären Abschnitt der membranständigen Form, besitzt jedoch keine Transmembrandomäne, da Exon 7 und 8 durch den alternativen Spleißvorgang entfernt werden. Es kommt dadurch auch zu einer Verschiebung im Leseraster und zum vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese im Bereich der Intrazellulärdomäne (roter Pfeil, Abb. 2), da dort ein neues Stopcodon entsteht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Isoform sezerniert wird und ca. 45% der Gesamtmenge an detektiertem löslichem p75TNF Rezeptor im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis ausmacht.

## 5. TNF in der Klinik

### 5.1 Die TNF-Therapie

Gegen eine systemische Anwendung von TNF in der Tumortherapie sprechen die kurze Plasmahalbwertszeit und die extremen Nebenwirkungen. Neben Übelkeit, Erbrechen, Fieber, Kopfschmerzen, Diarröh, Schüttelfrost und Appetitlosigkeit wurden dosisabhängige Hypotension, Lebertoxizität und Thrombozytopenie beobachtet. Die maximal tolerierten 200-800 µg/m<sup>2</sup> sind für eine effektive Therapie nicht ausreichend. Für eine relativ enge Indikation wurde rekombinantes TNF (Beromun®) von der Firma Boehringer Ingelheim zugelassen. Beromun® wird bei nicht resezierbaren Weichteilsarkomen der Extremitäten in Kombination mit dem Zytostatikum Melphalan (Alkeran®) eingesetzt, um eine Amputation zu vermeiden oder hinauszuzögern bzw. um palliativ zu behandeln.

Aufgrund der Toxizität wird das Präparat über eine isolierte Extremitäten-Perfusion (ILP) und Hyperthermie unter Vollnarkose gegeben. Diese aufwendige und teure Behandlung ist nur in Spezialkliniken möglich. Durch die Trennung der Kreisläufe werden in den Extremitäten etwa 200mal höhere TNF-Konzentrationen erreicht als im Körperkreislauf. TNF hemmt die Tumorzellproliferation, schädigt das Endothel im Tumorgefäßsystem, fördert die Infiltration des Tumors mit Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten und steigert die Effektivität des zusätzlich gegebenen Zytostatikums.

Grundlage für die Zulassung waren vier klinische Studien mit 260 Patienten mit nicht resezierbaren Weichteilsarkomen. Da alle anderen Behandlungsmethoden versagt hatten, war eine Amputation geplant. Bei 80 Prozent der Patienten konnten die Gliedmaßen dauerhaft gerettet werden. Das Tumorgewebe reagierte innerhalb von 2 bis 30 Tagen auf die ILP mit hämorrhagischen Nekrosen und dem Verschwinden der Tumorblutgefäße. Bei 70 Prozent der Patienten schrumpfte der Tumor um mehr als die Hälfte (Eggermont, 1997).

## 5.2 Die anti-TNF-Therapie

### 5.2.1 Allgemeines

Pathologisch erhöhte TNF-Serumspiegel sind in einer Vielzahl von Infektionen und entzündlichen Erkrankungen beschrieben worden (Box 1), aber nicht in jedem Fall war die anti-TNF-Therapie erfolgreich. So zeigte sich trotz hoher Erwartungen kein Benefit in der Behandlung der Sepsis (Butty, 2003) und der Multiplen Sklerose (Schwid, 1999). Im Bereich der rheumatoiden Arthritis und Morbus Crohn jedoch ist die anti-TNF-Therapie eine neue und sehr effektive Behandlungsmethode, da durch die Blockade dieses Zytokins auch die Freisetzung von IL-1 und IL-6 vermindert wird und, laut neuerer Daten, die verloren gegangene Suppressorfunktion von regulatorischen T-Zellen wieder hergestellt wird (Ehrenstein, 2004). Derzeit wird in klinischen Studien getestet inwieweit dieses Therapieprinzip auch zur Behandlung von Psoriasis, Wegener-Granulomatose-Syndrom und Herzinsuffizienz geeignet ist.

Die Blockade eines Schlüsselmoleküls des Immunsystems wie TNF führt unausweichlich zu Nebenwirkungen. Infektionen sind vor Beginn der Therapie unbedingt auszuschließen, da unter der anti-TNF-Therapie die Abwehr von intrazellulären Erregern wie *Mycobacterium tuberculosis* und *Listeria monocytogenes* extrem eingeschränkt ist (Berg, 2004, Slifman, 2003).

**Infektion:**

Sepsis, bakterielle Meningitis, zerebrale Malaria, AIDS

**Autoimmunerkrankungen:**

Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Multiple Sklerose, Kawasaki Syndrom, Graft-versus-Host-disease, Transplantatabstoßungen (Herz, Niere)

**Organversagen:**

Akutes Leberversagen, akutes Lungenversagen, kongestive Herzinsuffizienz (NYHA III-IV), Herzinfarkt

**Therapiekomplikationen:**

IL-2 Infusion, anti CD3-Antikörper Infusion, Jarisch-Herxheimer-Reaktion, Gelbfieberimpfung

**BOX 1: Humane Erkrankungen mit detektierbaren TNF Plasmaspiegeln (nach Eigler, 1997).**

### 5.2.2 Die Entwicklung von TNF-Inhibitoren

Von endogenen Zytokinen (IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$ ), und Substanzen wie Glukokortikoiden, Histamin, Phosphodiesterase-Hemmern, Thalidomid und Cyclosporin A war bekannt, dass sie unter anderem auch die Transkription und/oder Translation von TNF beeinflussen, bzw. verringern. Für die gezielte anti-TNF-Therapie verfolgte man parallel zwei Strategien; zum einen die Blockade des Enzyms TACE/ADAM17, das die Freisetzung von löslichem TNF aus membrangebundenen TNF bewirkt, und das gezielte Komplexieren von bereits löslichem TNF. TACE-Inhibitoren erwiesen sich jedoch als höchst toxisch und werden derzeit als molekularbiologische Tools für *in vitro* Versuche verwendet. Für Europa sind drei Arzneimittel zugelassen, die TNF neutralisieren:

- **Infliximab (Remicade®)**, früher bekannt als cA2, ist ein von Essex Pharma vertriebener chimärer monoklonaler Antikörper, dessen konstanter Teil einem humanen IgG1 κ entspricht. Die variablen Regionen sind von einem murinen hochaffinen anti-human-TNF-Antikörper abgeleitet. Als Folge der TNF-Neutralisierung wird die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 1 und 8, die Expression von endothelialen Adhäisionsmolekülen und somit das Einwandern von Leukozyten verhindert. Zusätzlich fördert Infliximab Lyse von TNF-exprimierenden Zellen. Immunreaktionen gegen den mäuslichen Proteinanteil wurden beobachtet, was in Folge zur Entwicklung eines vollständig humanisierten Antikörpers führte.
- **Adalimumab (Humira®)**, auch bekannt als D2E7, ist ein von Abbot vertriebener vollständig humaner Antikörper. Mittels Phage-Display-Technology wurde ein hochaffiner Maus-anti-human-TNF-Antikörper sukzessive durch humane Anteile ersetzt und optimiert. Das Wirkprofil entspricht dem von Infliximab.

- **Etanercept (Enbrel®)**, ist ein Fusionsprotein der Firma Wyeth bestehend aus dem Fc-Teil eines humanen IgG1 und der Extrazellulärdomäne des humanen p75TNF-Rezeptors. Die durchschnittliche Halbwertszeit des löslichen Rezeptors wird durch die Bindung an den Fc-Teil enorm verlängert (ca. 2Wochen) und der dimerisierte Rezeptor weist eine 50 bis 1000-fach höhere Affinität zu TNF auf als das Monomer. Obwohl dieses Konstrukt neben TNF auch LT $\alpha$  zu binden vermag, entspricht das Wirkprofil den beiden oben genannten Antikörpern.

Die Entwicklung des p55TNF-Rezeptor-Analogons zu Etanercept (Lenercept®) der Firma Roche wurde gestoppt, da es bereits verfügbaren Präparaten in keiner Studie überlegen war. Dasselbe Schicksal ereilte einen humanisierten Antikörper von Bayer (CDP571).

Amgen verfolgte den Ansatz, TNF mit einem löslichen p55TNF-Rezeptor-Trimer (Onercept®) zu neutralisieren, dessen Halbwertszeit durch die Konjugation mit Polyethylenglykol (Pegsunercept®) verlängert wird, und das sich derzeit in klinischen Studien befindet (<http://www.hopkins-arthritis.som.jhmi.edu/rheumatoid/tnf.html#ref4>)

Die Firma Xenocor publizierte erst kürzlich, dass durch die Gabe von dominant-negativen löslichen TNF-Monomeren lösliches homotrimeres TNF inaktiviert wird. Durch die Einbeziehung eines mutierten Monomers in den Dreierkomplex ist dieser nicht mehr fähig die Rezeptoren zu aktivieren (Steed, 2003).

Ein Polyethylengekoppeltes Fab'- Fragment eines chimären Mensch-Maus-Antikörpers gegen humanes TNF wird derzeit unter dem Namen Certolizumab (CDP875) von der ucb-Pharma in der klinischen Phase-III getestet.

Allen Medikamenten ist gemeinsam, dass sie subkutan bzw. i.v. appliziert werden müssen. Trotz der enormen Fortschritte auf dem Gebiet des Drug-Designs sind niedermolekulare, rezeptorspezifische oral verfügbare Substanzen auf lange Sicht nicht verfügbar. Dennoch steht mit der anti-TNF-Therapie erstmals eine Immuntherapie für ein großes Patientenkollektiv zur Verfügung.

## B. Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1 Chemikalien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Deisenhofen
2'2-Azino-di (3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure(6)) (ABTS)	Roche Diagnostics, Mannheim
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	
Acrylamid-Bisacrylamid Lösung	Roth, Karlsruhe
Actinomycin D	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Agarose, electrophoresis grade	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
ABTS Substrat Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Benzyl-2-Acetamido-2-Deoxy-A-D-Galactopyranosid (BAL)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Brefeldin A	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Complete EDTA-free tablets	Roche Diagnostics, Mannheim
CNBr-Sepharose	Amersham, Uppsala, Schweden
Coomassie Brilliant Blue R 250	Fluka, Buchs, Schweiz
Dapi	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Decanoyl-Arg-Val-Lys-Argchloromethylketone (DAVLACK)	Becham, Bubendorf, Schweiz
Desoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
DMEM-Fertigmedium	Sigma Aldrich, Deisenhofen
ECL Lösungen A+B	Mobitec, Göttingen
ER-Tracker Blue-White DPX	Molecular Probes, Eugene, USA
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
FIX & Perm	Caltag, Hamburg

Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Fluorescein Isothiocyanate (FITC)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
G418 (Geneticin)	PAN Biotech, Aidenbach
Gentamycin	ICN, Meckenheim
GolgiTracker BODIPY TR C5-ceramide	Molecular Probes, Eugene, USA
HEPES	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Hoechst 33342	Molecular Probes, Eugene, USA
Humanes recomb. TNF	BASF, Ludwigshafen
Hygromycin B	Roche Diagnostics, Mannheim
Kanamycin	Roche Diagnostics, Mannheim
IPTG	Biomol, Hamburg
LB (Lennox Broth Base)	Gibco, Karlsruhe
LysoTracker Red DND-99	Molecular Probes, Eugene, USA
MobiGlow Mounting Medium	Mobitec, Göttingen
MitoTracker Red CMXRos	Molecular Probes, Eugene, USA
N-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
N,N-Dimethylformamid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, Deisenhofen
PCR-Puffer, 10x conc.	Roche Diagnostics, Mannheim
Polyethylenglycol 1500	Roche Diagnostics, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phorbol myristate acetate (PMA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Polybrene	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Protein G-Sepharose	Amersham, Uppsala, Schweden
Puromycin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
RPMI 1640-Pulvermedium	Sigma Aldrich, Deisenhofen
SIGMA 104	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Sucrose	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Superfect Transfectionsreagenz	Qiagen, Hilden

TAPI-0 (TNF-alpha-prozessing-inhibitor)	Biomol, Hamburg
TEMED	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Trypsin-EDTA-Lösung	Tecnomara, Fernwald
Tween 20	Fluka, Buchs, Schweiz
X-Gal	Biomol, Hamburg

Alle nicht aufgeführten Lösungsmittel (p.A.) von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

Die nicht aufgeführten Feststoffe (p.A.) wurden von Sigma Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

## 1.2 Verbrauchsmaterial und Geräte

Acrodisc Syringe filter (low protein binding)	PALL Corporation, MI, USA
Begasungsbrutschrank – Cell Safe	Integra Biosciences, Baar, Schweiz
Eppendorfcups (1,5 ml / 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Plastik-Pistille	Eppendorf, Hamburg
ELISA Reader	MWG Biotech, Ebersberg
FACS Röhrchen	Labor Schubert, Schwandorf
FACScan Flow Cytometer	Becton-Dickinson, Heidelberg
Gelelektrophoreseapparaturen	BioRad, München
Gewebekulturschalen	Becton-Dickinson, Heidelberg
Glasboden Gewebekulturschalen	MatTek, Ashland, USA
Hyperfilm ECL	Amersham, Uppsala, Schweden
Inkubatoren	Heraeus, Hanau
Kryo-Röhrchen	Nunc, Naperville
Lab- Tek II Chamber Slide	Nunc, Naperville
Laminair Flow HB 2448– Sterilbank	Heraeus, Hanau
Mikroskop (Zellkultur)	Olympus, Hamburg
Mikrospin S – 200HR Säulen	Amersham, Braunschweig
Mikrotiterplatten	Falcon, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	Brand, Giessen
Nitrocellulosemembran	Osmonics, Minnetonka, USA

Nylon Transfer Membrane	Pall GmbH, Dreieich
PCR-Thermocycler	Perkin Elmer, Shelton, USA
Polystyrolrörchen	Falcon, Heidelberg
PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefässe	Eppendorf, Hamburg
Spannungsgerät:	
Biorad 200/2,0 Constant Voltage	BioRad, München
UV-Schirm (254 nm und 366 nm)	Bachhofer, Reutlingen
Waagen:      Sartorius R16OP	Sartorius, Göttingen
Sartorius L2200S	Sartorius, Göttingen
Whatman Filterpapier	Laborcenter, Nürnberg
Zellkulturflaschen (70, 250, 750 ml)	Falcon Heidelberg
Zentrifugen: Beckmann J2-21 M/E Zentrifuge	Beckmann, München
Beckmann L-70 Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenrörchen (15, 50ml)	Falcon, Heidelberg
Zellsiebe (Cellstrainer)	Falcon, Heidelberg

### 1.3 Komponenten des Fluoreszenzmikroskops

Systembetreuung	Visitron Systems GmbH, München
Mikroskop: Zeiss Axiovert S100	Zeiss, Oberkochen
Piezoelectric z-axis focus device (am 63x-er Öl-Objektiv)	Physik Instrumente, Waldbronn
Gekühlte CCD-Kamera (4096 Graustufen)	Princeton Instruments, Trenton (USA)
Metamorph-Software	Universal Imaging Corp., West Chester, (USA).
Exhaustive Photon Reassignment software (EPR)	Scanalytics, Massachusetts, USA

## 1.4 Kits

DC Protein Assay	BioRad, München
ECL- Western Blot Detection Kit	Mobitec, Göttingen
ELISAs: löslicher humaner TNFR2	R&D Systems, Wiesbaden
löslicher humaner TNFR2	Bender Med Systems, Wien
Isotype Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Mycoplasma detection kit	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Purification Kit (Midi, Maxi)	Qiagen, Hilden
Wizard Plus Minipreps DNA Purification Kit	Promega, Madison, USA
TOPO-Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

## 1.5 Molekulargewichtsstandards

DNA-Längenstandards (II, III, X, XIV)	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinmolekulargewichtsstandards:	
SDS-PAGE Molecular Weight Standard	BioRad, München
(Broad Range, Low Range, Full Range Rainbow)	

## 1.6 Antikörper und Enzyme

Antikörper:

Rat anti human TNFR2-PE	Pharmingen, BD, Heidelberg
Rat IgG2b-PE	Pharmingen, BD, Heidelberg
Mouse anti human c-myc	Selbst gereinigt
Mouse anti human Apo-1	Dieter Adam, Kiel
Rabbit anti human TNFR2 Antiserum (80M)	Peter Scheurich, Stuttgart
Mouse anti human TNFR2 (80M2)	Peter Scheurich, Stuttgart
Rabbit anti human TNFR2 (IgG fraction)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Rabbit anti mouse TNFR1 (agonistic)	HyCult, Caltag, Hamburg
Rabbit anti human TNF (IgG fraction)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Mouse anti human TNF-Cy3 (incl. Isotypecontrol)	Eva Pocsik, Budapest
Rabbit anit mouse FITC	Dako, Hamburg

Rabbit anti mouse TRITC	Dako, Hamburg
Swine anti-rabbit IgG-FITC	Dako, Hamburg
Goat anti-rabbit IgG-TRITC	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Goat anti mouse IgG-HRP	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Goat anti mouse IgG-AP (whole molecule, $\gamma$ -chain, $\mu$ -chain)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Rat anti mouse IgG (1, 2a, 2b)-AP	Pharmingen, BD, Heidelberg
Nicht aufgeführte Isotypkontrollen	Dako, Hamburg

**Enzyme:**

Restriktionsenzyme	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, MA, USA
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim

### 1.7 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Alle Sense-Primer für PCR tragen den Zusatz 5', alle Antisense-Primer tragen den Zusatz 3'.

Oligonukleotid	Sequenz
Hp75 5'Hind EcoRI	5'CCC AAG CTT GAA TTC CCA GCC ATG GCG CCC GTC GCC GTC 3'
5' EcoRI hicp75	5'CCGAAT TCC CAG CCA TGG CGA AAC CCC ATC TC 3'
3'myc XhoI	5'GGG CTC GAG TCA CAG ATC CTC TTC TGA GAT 3'
Hp75 5`BamHI	5'AAA GGA TCC CCC ATG GCG CCC GTC GCC GTC 3'
Hicp75 5`BamHI	5'AAA GGA TCC CCC ATG GCG AAA CCC CAT CTC 3'
3' myc BamHI XFP	5' CGG GAT CCC GCA GAT CCT CTT CTG AGA TG 3'

### 1.8 Plasmide

pcDNA3.1 hygro	Invitrogen, Karlsruhe
pEYFP-N1	Clontech, BD, Heidelberg
pEGFP-N1	Clontech, BD, Heidelberg
pECFP-N1	Clontech, BD, Heidelberg
pDsRed2-N1	Clontech, BD, Heidelberg
pCI10 A1	Imgenex, San Diego, USA
pCI Eco	Imgenex, San Diego, USA
PQCXIP	Clontech, BD, Heidelberg
pQCXIP-MCS-pEYFP-N1	Wulf Schneider, Regensburg
pQCXIP-MCS-pEGFP-N1	Wulf Schneider, Regensburg
pQCXIP-MCS-pECFP-N1	Wulf Schneider, Regensburg
pQCXIP-MCS-pDsRed2-N1	Wulf Schneider, Regensburg
pENDO-ECFP	Clontech, BD, Heidelberg

**1.9 Puffer und Lösungen**

Beschichtungspuffer für ELISA	50mM NaHCO <sub>3</sub> pH 9.2
Blockierlösung für ELISA	1% BSA in PBS
Coomassie-Blau-Lösung (filtriert)	0,25% Coomassie blue R250 in 40 % Methanol 10 % Essigsäure 50 % dem. Wasser
Coomassie-Entfärbelösung	40% Methanol 10% Essigsäure 50% dem. Wasser
Elutionspuffer FPLC	100 mM glycine 100 mM NaCl pH 2.6
Ethidiumbromid-Stammlösung	10mg/ml Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O
FITC-Dialyse-Puffer	0,1M Tris HCL 0,2M NaCl (pH 7,4)
FITC-Labelling-Puffer	0,05M Borsäure 0,2M NaCl (pH 9,2)
FITC-Stock-Lösung	5mg/ml FITC in DMSO

Laemmli-Elektrodenpuffer (5x)	120 mM Tris Base 0,95M Glycin 0,5% SDS
PBS	137 mM NaCl 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl (pH 7,3)
PBS-T	500 µl Tween 20 in 1 Liter PBS
RIPA-Puffer (modifiziert)	150 mM NaCl 50 mM Tris·HCl, 1 mM EDTA 1% Triton X-100 1% NP-40 0,25% Na-deoxycholate Complete™ EDTA-free tablet pH 7.4
Sammelgel-Trispuffer	0,5M Tris-HCl (pH6.8)
SDS-Probenpuffer (2x)	20% Glycerin 125 mM Tris (pH 6,8) 2% SDS 0,02% Bromphenolblau 2 % β-Mercaptoethanol
Substratlösung für ELISA (AP)	0,06% (w/v) SIGMA104 in Substratpuffer

Substratpuffer für ELISA (AP)	9,8% (v/v) Diethanolamin 24 mM MgCl <sub>2</sub> pH 9.8
TAE-Puffer	40 mM Tris-acetat 1 mM EDTA
TBS-Puffer	8g NaCl 0.2g of KCl 3g of Tris base in 1000ml dem. Wasser
TBS-T-Puffer	500 µl Tween 20 in 1 Liter TBS-Puffer
Transferpuffer A – Western Blot	0,3 M Tris Base in 10% Methanol 90% dem. Wasser (pH 10,4)
Transferpuffer B – Western Blot	25 mM Tris Base in 10% Methanol 90% dem. Wasser (pH 10,4)
Transferpuffer C – Western Blot	25 mM Tris Base 40 mM ε-Amino-n-Capronsäure in 10% Methanol 90% dem. Wasser (pH 9,4)
Trenngel-Trispuffer	1,5M Tris-HCl (pH 8,8)

0,1% Triton X-100 Lösung	0,1% Triton X-100 in dem. Wasser
Trypanblau-Lösung	0,15% Trypanblau 150 mM NaCl
X-Gal-Stammlösung	20 mg/ml in N,N-Dimethylformamid

## 1.10 Zelllinien

Zelllinie		Kulturmedium	Art des Wachstums
HEK 293T	Humane immortalisierte embryonale Nierenzellen	DMEM, 10% FCS	adhärent
HeLa	Humanes Cervixcarzinom	DMEM, 10% FCS	adhärent
L929	Maus-Fibrosarkomzelllinie	RPMI 10% FCS	adhärent
NIH 3T3	Maus-Fibrosarkomzelllinie	RPMI 10% FCS	adhärent
Wirbel	Maus-Fibrosarkomzelllinie TNFR1/2 defizient	RPMI 10% FCS	adhärent
Apo 6.5	Maus-Fibrosarkomzelllinie L929 Human FAS transfiziert	RPMI 10% FCS	adhärent
Sp2/0	Maus-Myelomzelllinie	RPMI 10% FCS	Suspension

## 1.11 Tiere

BALB/c	Charles River, Sulzfeld
C57BL/6 Wild Typ	Charles River, Sulzfeld

## 2. Methoden

Alle Experimente wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur unter Verwendung steriler Reagenzien und Gefäße ausgeführt.

### 2.1 Bakterienkultur

#### 2.1.1 E. coli-Stämme

Für alle molekularbiologischen Arbeiten wurden E. coli-Bakterien vom Stamm E. coli XL-1-Blue verwendet. Bei Gebrauch des TOPO-TA cloning Kits wurde mit dem darin enthaltenen TOP10F' E. coli-Stamm gearbeitet.

#### 2.1.2 Kultivierung von E. coli

Die Anzucht von E. coli erfolgte auf Agarplatten im Brutschrank bzw. als Flüssigkultur im Schüttler (37°C; 220 U/min). Zur Selektion wurde je nach Resistenz des Keims Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zugegeben.

#### 2.1.3 Herstellung von Dauerkulturen

Eine logarithmisch wachsende E. coli Kultur wurde im Verhältnis 1:2 mit Glycerin (60%) gemischt und in Aliquots von je 500 µl bei -80°C weggefroren.

#### 2.1.4 Herstellung von transformationkompetenten E. coli-Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter E. colis wurde die Methode aus dem Lehrbuch „Molecular cloning: A laboratory manual“ verwendet (Sambrook, 2001). Die Bakterien wurden in Aliquots á 200µl bei -80°C weggefroren.

#### 2.1.5 Transformation von E. coli

Die auf Eis aufgetauten transformationkompetenten Bakterien (200µl) wurden mit Plasmid-DNA (100-200ng) versetzt und vorsichtig durchmischt. Nach 45 min auf Eis wurden die Bakterien 90 Sekunden auf 42°C überführt (Wasserbad oder Heizblock), um durch den Hitzeschock die Aufnahme der DNA zu stimulieren. Danach wurden die Bakterien wieder auf Eis gestellt, mit 600 µl SOC Medium versetzt und 1 Stunde bei 37°C und 220 U/min geschüttelt, um die Ausbildung der auf dem Plasmid codierten Antibiotikaresistenz zu

ermöglichen. 100 µl des Transformationsansatzes wurden dann auf selektive Agarplatten (LB-Amp/LB-Kan) ausplattiert. Am folgenden Tag wurden einzelne Klone gepickt und in 5 ml selektivem LB-Medium über Nacht geschüttelt (37°C; 220 U/min) und analysiert.

### **2.1.6 Blau-Weiß-Selektion**

Die Blau-Weiß-Selektion positiver Bakterienkolonien basiert auf dem Prinzip der  $\alpha$ -Komplementation. Plasmide, wie z.B. aus TOPO-TA cloning-Kit, enthalten die Sequenz (lac-Z-Gen) für das  $\alpha$ -Peptid der  $\beta$ -Galaktosidase. Organismen, die defizient für dieses Peptid sind, aber alle anderen Untereinheiten der  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren, bilden nach Aufnahme des Plasmids biologisch aktives Enzym. IPTG (Isopropyl-thio-galaktosid) dient als Induktor für die  $\beta$ -Galaktosidase, wird jedoch nicht durch diese zersetzt. Durch Umsetzung eines chromogenen Substrats (z.B. x-Gal) färbt sich eine Kolonie blau. Wurde jedoch ein DNA-Fragment in die MCS, die innerhalb des lac-Z-Gens liegt, insertiert, wird der Leserahmen des  $\alpha$ -Peptids verschoben und die Farbreaktion bleibt aus. Positive Klone erscheinen demzufolge weiß und können von negativen (blau) unterschieden werden.

Zur Blau-Weiß-Selektion wurde der Transformationsansatz mit 20µl x-Gal-Lösung (20% x-Gal w/v N,N-Dimethylformamid) und 10µl IPTG (0,1M) versetzt und ausplattiert. Am folgenden Tag wurden die weißen Kolonien analysiert.

## **2.2 Arbeiten mit DNA**

### **2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli**

Mini Prep: Kulturvolumen 2ml Promega Kit

Midi Prep: Kulturvolumen 100ml Qiagen Kit

Maxi Prep: Kulturvolumen 300 ml Qiagen Kit

Die Isolierung erfolgte nach der jeweiligen Arbeitsanweisung.

### **2.2.2 Analytische und präparative Gelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge erfolgte in Agarosegelen, wobei die Agarosekonzentration 1% (w/v) betrug. Dazu wurde Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und in die Gelapparatur gegossen. Nach dem Abkühlen wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit Laufpuffer im Verhältnis 1:5 vermischt, in die vorbereiteten Geltaschen pipettiert und durch Anlegen

einer elektrischen Spannung (5-10V/cm) aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragment-Länge wurden zusätzlich entsprechende DNA-Standards (DNA-Molekulargewichtsstandard II, III, X, XIV) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad ca. 15 min inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden für analytische Zwecke auf einem UV-Schirm bei einer Anregungswellenlänge von 254nm sichtbar gemacht und photographiert. Um Strangbrüche der DNA zu vermeiden, wurde bei der präparativen Elektrophorese längerwelliges UV-Licht verwendet (366 nm). Die gewünschten Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Mit Hilfe des Qiagen Gelextractionskits wurde die DNA aus dem Gel isoliert.

### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der Verwendung spezifischer Primer wurden spezifische DNA-Fragmente amplifiziert und mit terminalen Sequenzen für Endonukleasen versehen. Reaktion wurde in einem Volumen von 50µl durchgeführt. Als Template diente stets ein Plasmid

Template-Lösung (Plasmid ca. 10ng)	1 µl
PCR Puffer, 10x conc. (Roche)	5 µl
5'Primer (je 100µM)	0,5 µl
3'Primer (je 100µM)	0,5 µl
Desoxynucleotidmischung (Roche)	1 µl
Taq DNA Polymerase (Roche)	1 µl
Wasser	41 µl

Nach einem Denaturierungsschritt von 5 min bei 95°C wurden üblicherweise 35 Zyklen des nachfolgenden Reaktions-Schemas angewandt:

Denaturierung	95°C	30sek
Primerannealing	Je nach Primerpaar	30sek
Elongation	72°C	2 min

Nach einer abschließenden Elongation für 10 min wurden die amplifizierten PCR-Fragmente auf einem Agarosegel analysiert und gereinigt (Gelextraktion oder PCR-Purification-Kit).

#### **2.2.4 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme**

Es wurden Restriktionsendonukleasen der Firmen Roche und New England Biolabs verwendet. Ein Verdau wurde typischerweise in einem Volumen von 50 µl mit ca. 1µg Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkt angesetzt. Nach Zusetzen des vorgegebenen Puffers und 10 Units des jeweiligen Enzyms wurde der Ansatz bis zu 3 Stunden inkubiert. Die Temperatur war abhängig vom verwendeten Enzym. Die verdauten Fragmente wurden anschließend in einem Agarosegel analysiert und gereinigt (Gelextraktion oder PCR-Purification-Kit)

#### **2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten**

Ligationen wurden in einem Volumen von 20µl durchgeführt, wobei das DNA-Insert im Verhältnis zum linearisiertem Plasmid im Überschuss vorhanden war (ca. 4:1). Der Ansatz enthielt neben dem Ligationspuffer 1 Unit einer T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) und wurde entweder 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C inkubiert und in E. coli transformiert.

#### **2.2.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Die DNA-Sequenzierungen wurden von Silvia Seegers, Institut für Immunologie, durchgeführt. Es wurde der ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit verwendet. Sequenziert wurde am ABI310 Genetic Analyzer oder am ABI3100-Avant Genetic Analyzer des Instituts für Pathologie der Universität Regensburg.

#### **2.2.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Konzentration von DNA in einer Lösung wurde anhand der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt. Dabei gilt folgender Zusammenhang:

OD <sub>260nm</sub> =1	entspricht	50µg/ml für dsDNA
		33µg/ml für ssDNA
		40µg/ml für RNA

## 2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.3.1 Messung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde der DC Protein Assay Kit verwendet. Hierbei handelt es sich um einen kolorimetrischen Nachweis von Proteinkonzentrationen in Anlehnung an den bekannten Lowry-Assay. Der Nachweis erreicht 90% der maximalen Farbentwicklung bereits nach 15 min.

Der Nachweis basiert auf der Reaktion von Protein mit Kupfertartrat-Lösung and Folins-Reagenz. Wie auch beim Lowry-Assay, besteht der BioRad DC Assay Kit aus zwei Stufen, die zur Farbreaktion führen: Die Reaktion zwischen Protein und Kupfer in alkalischer Lösung und die nachfolgende Reduktion von Folins-Reagenz durch das Kupfer behandelte Protein. Die Farbreaktion ist primär abhängig von den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan und in einem geringeren Maße von Cystin, Cystein und Histidin. Die Proteine verursachen die Reduktion von Folins-Reagenz durch den Verlust von ein, zwei oder drei Sauerstoffatomen. Daher können mehrere reduzierte Spezies entstehen, mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm und einem Absorptionsminimum bei 405 nm.

Vorgehensweise bei der Versuchsdurchführung: Von Proteinstandardlösung (BSA) bzw. den zu bestimmenden Proben werden 5 µl in Mikrotiterplatten pipettiert. Daraufhin werden 25µl der alkalischen Kupfertartrat-Lösung hinzugefügt. Anschließend werden 200µl Folins Reagenz zugesetzt und für 15 min im Dunkeln stehen gelassen. Die Absorption wurde bei 750 nm mit dem ELISA-Platten-Reader bestimmt.

### 2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese SDS-Page

Proteine wurden elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht in SDS-Polyacrylamid-Gelen, die aus Sammel- und Trenngel bestanden, aufgetrennt (Lämmli, 1970). Zwischen zwei Glasplatten wurde in den durch einen Spacer entstehenden Raum zuerst das Trenngel gegossen und mit Butanol überschichtet. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde die Butanol-Phase entfernt und das Sammigel auf das Trenngel gegossen. Ein Kamm wurde je nach Probenanzahl und Volumen eingefügt. Nachdem auch das Trenngel ebenfalls fest war, wurden die Proben geladen und die elektrophoretische Auftrennung durchgeführt. Nach dem Laufende wurde das Gel direkt mit Coomassie-Lösung gefärbt oder auf eine PVDF-Membran geblottet (Western Blot).

Die Zusammensetzung der verwendeten Gele war folgende:

	<b>Sammelgel (3%)</b>	<b>Trenngel 8%</b>	<b>Trenngel 12%</b>
<b>Acrylamid-Stammlösung (30%)</b>	0,5 ml	4,0 ml	6,0 ml
<b>1,5M Tris (pH 6,8)</b>	0,38 ml	-----	-----
<b>1,5M Tris (pH 8,8)</b>	-----	3,8 ml	3,8 ml
<b>10% SDS-Lösung</b>	0,03 ml	0,15 ml	0,15 ml
<b>10% APS-Lösung</b>	0,03 ml	0,15 ml	0,15 ml
<b>TEMED</b>	0,003 ml	0,009 ml	0,006 ml
<b>Demin. Wasser</b>	2,1 ml	7,0 ml	5,0 ml

### 2.3.3 Coomassie-Färbung

Diese Art der Färbung beruht auf reversibler Anlagerung des Farbstoffs Coomassie-brilliant-blue® an Amino-Gruppen der Proteine. Membranen wurden zunächst für 5 bis 10 Sekunden in Färbelösung gelegt und anschließend in Entfärbelösung gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Die Gele wurden eine Stunde in die Färbelösung gelegt und über Nacht entfärbt. Die Empfindlichkeit der Methode liegt bei 200-400 ng pro Proteinbande

### 2.3.4 Western Blot

Zur Detektion der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels Western-Blot, wurden diese auf eine PVDF-Membran transferiert (Western Blot; Towbin, 1979). Dazu wurden jeweils drei Whatmanpapierstücke in Gelgröße in den Transferpuffern A, B und C getränkt. Dann wurde ein Sandwich aus je drei Whatmanpapierstücken A und B auf die Anodenplatte der Blot-Apparatur gelegt. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol befeuchtet, in Puffer B gespült und auf die Whatmanpapierstücke B gelegt. Anschließend wurde das Gel, das vorher 15 min in Transferpuffer B lag, aufgelegt und mit drei Lagen Whatmanpapier C bedeckt. Die Apparatur wurde mit der Kathodenplatte geschlossen. Der Proteintransfer erfolgte durch Anlegen einer elektrischen Spannung für 1h bei 0,8mA/cm<sup>2</sup>.

### 2.3.5 Dot-Blot

Beim Dot-Blot-Verfahren wird ein Proteingemisch punktförmig direkt auf eine trockene Nitrozellulosemembran aufgetüpfelt jedoch nicht elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Detektion des Antigens wird mit dieser Membran genauso verfahren wie mit der PVDF-Membran aus dem Western Blot.

### 2.3.6 Detektion membrangebundener Proteine durch Antikörper

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran in TBS-T mit 1% (w/v) Magermilchpulver über Nacht blockiert. Am nächsten Tag wurden die auf die PVDF-Membran geblotteten Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Diese konnten mit einem sekundären, Meerrettichperoxidase (HRP)-markierten Antikörper nachgewiesen werden.

Die Inkubationszeit betrug für beide Antikörper jeweils 1 Stunde gefolgt von drei fünfminütigen Waschschritten mit TBS-T. Vor der Detektion wurde die Membran mit tensidfreiem PBS gewaschen. Die Nachweisreaktion beruht auf einer Chemolumineszenzreaktion (ECL), die durch die HRP-katalysierte Oxidation eines Substrats (Luminol) hervorgerufen wird. Diese Lichtemission kann anschließend auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm-ECL) sichtbar gemacht werden. Die Detektion des HRP-gekoppelten Antikörpers erfolgte mit dem ECL-Western-Blot-System (MobiGlow). Die Dauer der Filmexposition variierte zwischen 15 Sekunden und 30 min.

### 2.3.7 RIPA-Lyse

$4 \times 10^6$  Zellen wurden in eine 10 cm Schale ausgesät, am folgenden Tag nach zweimaligem Waschen mit PBS mit 1ml kaltem RIPA-Lyse-Puffer versetzt und mit Hilfe eines Zellschabers in den Puffer befördert. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis (mehrmals vortexen) wurden alle nicht löslichen Bestandteile (DNA etc.) 5 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand (Total-Lysat) kann bei -20°C über einige Monate hin aufbewahrt oder sofort analysiert werden.

### 2.3.8 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation ermöglicht das Isolieren von Proteinen und assoziierter Proteinkomplexe von Zellen durch spezifische Antikörper aus Total-Lysaten. Der Antikörper spielt hier eine zentrale Rolle, da er sowohl das Antigen als auch Protein A oder G zu binden vermag. Im „Preclearing“ wurden 20 µl Protein G-Sepharose zu 1ml Total-

Lysat gegeben und für mind. 3 Stunden im Kühlraum auf einem Rotor inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (10000 rpm; 5 min) waren somit alle unspezisch bindenden Komponenten aus dem Gemisch entfernt und der Überstand wurde bei 4°C über Nacht mit 2 bis 10 µg antigenspezifischem IgG-Antkörper inkubiert. Die gebildeten Immunkomplexe wurden an 20 µl Protein G-Sepharose gebunden (rotieren 1h, 4°C) und durch Zentrifugation abgetrennt. Das Pellet wurde nach dreimaligem Waschen mit PBS im 4-fach reduzierenden Lämmli-Puffer aufgenommen, 5 Minuten bei 95°C aufgekocht und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

### **2.3.9 Kovalente Bindung von humanem TNF an CNBr-Sepharose**

Das Prinzip der Bindung beruht auf der Reaktion des Cyanbromids mit dem Aminoterminus des Proteins.

1 Gramm CNBr-Sepharose wurde durch Zusatz von 1mM HCl gequollen und in einer Glasfritte mit 200 ml 1mM HCl gewaschen. Das Gel wurde zusammen mit 35 mg BSA-freiem, rekombinantem humanem TNF (BASF) in 5 ml Kopplungs-Puffer (0,1M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5M NaCl, pH 8,3) für eine Stunde inkubiert. Überschüssiger Ligand wurde durch Waschen mit dem selben Puffer entfernt und alle noch freien reaktiven Gruppen wurden mit Blockpuffer (0,1M Tris-HCl, pH8) 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Durch drei Waschzyklen mit jeweils 0,1M Natriumacetat pH4 und 0,1M Tris-HCl pH8 wurde das Gel rekonstituiert und bei 4°C in PBS/0,2% NaN<sub>3</sub> aufbewahrt.

### **2.3.10 Reinigung der Extrazellulärdomäne des hicp75TNFR mittels Affinitätschromatographie**

Die Aufreinigung der Extrazellulärdomäne des hicp75TNFR erfolgte durch die Bindung an immobilisiertes humanes TNF (hTNF-Sepharose, siehe 2.3.8). Gesammelter Zellkulturüberstand wurde durch Zentrifugation von Zellbestandteilen und Schwebstoffen gereinigt. Es folgte eine Ammoniumsulfat-Fällung der Proteine bei einer Sättigung von 50% über Nacht bei 4°C. Die ausgefallenen Proteine wurden pelletiert, in einem kleinen Volumen PBS resuspendiert und unter dreimaligem Pufferwechsel gegen PBS dialysiert. Das Dialysat wurde bei 4°C über die selbst gepackte hTNF-Sepharose-Säule geschickt (FPLC Biorad; Flussrate 0,3 ml/min) mit PBS gewaschen und durch einen pH-Sprung eluiert (100 mM glycine, 100 mM NaCl, pH 2). Das Eluat wurde fraktioniert und mit 0,1M Tris-HCl pH8 auf pH=7,5 eingestellt.

### **2.3.11 Rezeptosomenisolierung**

Die Rezeptosomenisolierungen wurden am Institut für Immunologie in Kiel etabliert und durchgeführt.

Die Zellen (Volumen 250µl) wurden mit 400 ng biotinyliertem TNF für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von magnetischen Streptavidin beschichteten Microbeads (50nm) wurde der Ansatz eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Ein Temperaturshift auf 37°C ermöglichte die Bildung der nun magnetischen Rezeptosomen, die nach unterschiedlichen Zeitpunkten abgestoppt wurde. Die Zellen wurden unter Verwendung von Glaskügelchen in einem Puffer (0,25M Sucrose, 15 mM HEPES, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH=7,4) mechanisch aufgeschlossen, wobei die Rezeptosomen intakt blieben. Diese wurden nun in einer selbst gebauten Magnetkammer (deutsches Patent: Schütze, DE 101 44 291) von den anderen Zellbestandteilen getrennt und auf ihre Zusammensetzung hin untersucht (SDS-PAGE, Western Blot).

### **2.3.12 Peptidsynthese**

Die Peptide wurden als lyophilisierte TFA-Salze von der Firma Biosytan bezogen. Die Synthese erfolgte an einem Automaten PSSM-8 der Fa. SHIMADZU, Japan, unter der Verwendung der Fmoc/But-Strategie nach Sheppard. Das Produkt wurde mit MALDI-TOF analysiert. Die Präparation erfolgte durch HPLC.

### **2.3.13 FITC-Markierung von Proteinen**

Zur direkten Fluoroisothiocyanat (FITC) Markierung von Proteinen wurde folgender Reaktionsansatz verwendet: 1mg Protein wurde mindestens 48 Stunden bei 4°C gegen FITC-Labelling-Puffer dialysiert. Daraufhin wurden zum dialysierten Protein 20 µl einer FITC-Stock Lösung hinzugefügt und 2 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Um ungebundenes FITC aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde der Ansatz viermal jeweils gegen 5 Liter des FITC-Dialyse-Puffers für 2 Tage, bei 4°C, dialysiert. Abschließend wurde das FITC markierte Protein im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Zellkulturbedingungen

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden in einer Sterilbank (Laminair Flow) durchgeführt. Alle verwendeten Zelllinien bzw. Primärkulturen wurden in Kulturflaschen mit dem angegebenen Medium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank (Cell Safe) kultiviert. Falls nicht anders angegeben, wurden die Zellkulturen dreimal wöchentlich im Verhältnis 1:5 geteilt. Medienwechsel oder Waschschrifte wurden ausgeführt, indem die Zellen in sterilen Falconröhren 5 min bei 1000 bis 1200 zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in der entsprechenden Lösung resuspendiert wurde.

### 2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen, die langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert werden sollten, wurden zunächst bei 1200rpm pelletiert und in einer Konzentration von ca. 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml in kaltem Einfriermedium (50% RPMI 1640; 40% FCS; 10% Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Anschließend wurden Aliquots von 1,8ml in Kryoröhrchen gefüllt, bei -80°C tiefgefroren und nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

Sollten tiefgefrorene Zellen erneut in Kultur genommen werden, wurde die Zellsuspension aufgetaut, in wenig kaltem Medium gewaschen, zentrifugiert und in frisches Kulturmedium überführt.

### 2.4.3 Bestimmung der Lebend-Zellzahl

Sollten Zellen in einer definierten Zellzahl in die entsprechenden Kulturgefäße eingesät werden, wurde mittels Trypanblau-Ausschlußtest die Anzahl der lebenden Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu wurde eine Zellsuspension mit passender Menge (meist 1:10) Trypanblaulösung versetzt. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zahl an lebenden Zellen, die sich nicht durch Trypanblaulösung anfärben ließen, mikroskopisch ermittelt.

Die Zellkonzentration wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Anzahl der Zellen in 16 Kleinquadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl} \times 10^4 / \text{ml}$$

#### **2.4.4 Mycoplasmentest**

In regelmäßigen Abständen wurden sämtliche Zelllinien mit Hilfe einer DAPI Färbung fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Nicht-kontaminierte Zellen zeigten nur eine Kernfärbung wohingegen eine Kontamination durch eine starke Färbung (Mykoplasmen-DNA) außerhalb des Kerns ersichtlich war.

#### **3.4.5 Induktion und Hemmung von Rezeptor-shedding**

$8 \times 10^4$  Zellen pro Well wurden in eine 24-Lochplatte eingesät und über Nacht kultiviert (Adhärenz). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit dem jeweiligen Induktor bzw. Inhibitor für 2 Stunden vorinkubiert (Gesamtvolumen 250 $\mu$ l). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Hierauf wurden die Zellen erneut mit dem jeweiligen Induktor bzw. Inhibitor über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Überstände im ELISA auf löslichen hp75TNFR untersucht, wobei für jeden Ansatz Doppelwerte ermittelt wurden.

#### **3.4.6 TNF-Zytotoxizitäts-Assay**

Um einen konfluenten Zellrasen zu erhalten, wurden  $2,5 \times 10^4$  L929-Zellen pro Well auf eine 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert (Volumen 100 $\mu$ l). Das Medium wurde abgesaugt und rekombinantes humanes TNF in einer log2-Verdünnungsreihe titriert, wobei das erste Well eine empirisch ermittelte absolut toxische Menge und das letzte Well kein TNF enthielt (100% und 0% Wert). Die Randlöcher der Platte enthielten keine Zellen wurden jedoch ebenso wie die anderen behandelt (Mediumkontrolle). Zu den 100 $\mu$ l Medium im Well wurden anschließend 100 $\mu$ l Actinomycin D-haltiges Medium (4 $\mu$ g/ml) zugegeben, um die Proteinbiosynthese zu blockieren. Die Platte wurde 24 Stunden inkubiert. Zur Bestimmung der Lebend-Zellzahl wurde dem Kulturmedium 10 $\mu$ l der MTT-Stammlösung zugesetzt und für weitere 4 Stunden inkubiert. MTT wird von stoffwechselaktiven Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien oxidativ umgesetzt, was zur Bildung eines blauen Farbstoffs führt, dessen Bildung sich somit proportional zur Viabilität verhält. Der Farbstoff bildet Kristalle, die durch Zugabe von 70 $\mu$ l einer 20%-igen SDS-Lösung in Lösung gebracht wurden. Die Zugabe von SDS stoppte gleichzeitig die Reaktion, da auch die Zellen lysiert wurden. Die optische Dichte des Reaktionsprodukts wurde bei 540 nm vermessen. Die Viabilität wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Viabilität [\%]} = 100\% \times (\text{A}_{\text{treated}} - \text{A}_{\text{medium}}) / (\text{A}_{\text{untreated}} - \text{A}_{\text{medium}})$$

### 3.4.7 TNF-Zytotoxizitätshemmassay

$4 \times 10^6$  Zellen, deren Überstand auf hemmende Aktivität untersucht werden sollte, wurden über Nacht in eine 10 cm Schale ausgesät (Volumen 10 ml). Der TNF-Zytotoxizitäts-hemmassay wurde an L929-Wildtyp-Zellen analog dem TNF-Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt, wobei der einzige Unterschied darin bestand, dass TNF und Actinomycin D im konditionierten Medium gelöst wurden.

### 3.4.8 Transfektion

Um Zellen transient mit Plasmid-DNA zu transfizieren, wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well in eine 6-Well Platte ausgesät und über Nacht inkubiert.  $2 \mu\text{g}$  DNA (bei einer Cotransfektion jeweils  $1 \mu\text{g}$ ) wurden in  $100 \mu\text{l}$  serumfreiem Medium verdünnt, mit  $10 \mu\text{l}$  Superfect-Reagenz (Qiagen) versetzt, gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit konnten sich Superfect-DNA-Aggregate bilden. Anschließend wurde der Mix mit  $600 \mu\text{l}$  serumhaltigen Medium gemischt und auf die vorher mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Nach 3 Stunden wurde das Medium wieder abgenommen, die Zellen noch dreimal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. 24 Stunden nach der Transfektion konnte mit transienter Proteinexpression gerechnet werden.

### 3.4.9 Retrovirale Transduktion

Diese Methode wurde verwendet, um in kurzer Zeit Zelllinien zu generieren, die ein gewünschtes Protein stabil exprimieren. Hierfür wurden  $4 \times 10^6$  HEK-Zellen (Produzenten-Zelllinie) in eine 10 cm Schale ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 Stunde vor der Transfektion das Medium gegen frisches ausgetauscht (10 ml), um optimale pH-Bedingungen zum Zeitpunkt der Transfektion zu haben.  $30 \mu\text{g}$  proviraler Vektor mit dem Zielgen und  $30 \mu\text{g}$  des Vektors für die Adenovirusproteine wurden in  $450 \mu\text{l}$  steriles demineralisiertem Wasser gelöst. Die DNA-Lösung wurde mit  $50 \mu\text{l}$  2,5M  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Lösung gemischt und diese Mischung wurde unter vortexen (in der Sterilbank) in 2xHEPES-Puffer eingetroppft. Der Mix wurde zügig auf die 10 ml Zellkulturmedium der HEK-Zellen verteilt und 5 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt. 48 Stunden nach der Transfektion der Produzenten-Zelllinie konnte man mit einer ausreichenden Anzahl Viren im Überstand der Zellen rechnen. Die Viren sind nicht mehr

replikationsfähig, tragen aber die mRNA-Information des Zielgens und der Resistenz in sich. Der Überstand wurde abgenommen, mit Polybrene (Endkonzentration 8 $\mu$ g/ml) versetzt und durch eine „low-protein-binding-Membran“ (PALL) filtriert. Der nun von Schwebstoffen und Zellfragmenten befreite virushaltige Überstand wurde 1:2 mit frischem polybrenehaltigem Medium gemischt, um die Nährstoffdichte wieder zu erhöhen. Das infektiöse Medium wurde auf Eis gelagert und auf die Zielzellen gegeben (2-3 Portionen über den Tag verteilt). Die Viren erkennen bestimmte Oberflächenmoleküle der Zielzellen, fusionieren in Anwesenheit des Tensids Polybrene leicht mit jenen, schreiben die mRNA des Zielgens mittels viruseigener reverser Transkriptase in DNA um und integrierten diese dann stabil ins Wirtsgenom. Der Prozess des Erntens und Infizierens kann nach 36 Stunden noch einmal wiederholt werden. 48 Stunden nach der Transduktion kann mit der Expression des gewünschten Proteins gerechnet werden. Die Selektion der Zielzellen erfolgt in Abhängigkeit der transduzierten Resistenz und der Art der Zielzelle.

Je nach Virussorte wurde unter S1 (ecotroph) oder S2 (amphotroph) Bedingungen gearbeitet.

### **3.4.10 Allgemeine Durchflusszytometrie und Zellsorting**

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden auf einem FACScan Flow Cytometer durchgeführt, als Listmode-Dateien gespeichert und die Auswertung in WinMDI 2.8 vorgenommen. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienten FITC und PE Farbstoffe sowie YFP. Die Messungen wurden mit 3 bzw. 4 Parametern durchgeführt, die folgendermaßen belegt waren:

- |                               |                                    |
|-------------------------------|------------------------------------|
| 1. Forward scatter (FSC)      | Zellform/Zellgröße                 |
| 2. Sideward scatter (SSC)     | Granularität                       |
| 3. Fluoreszenzkanal 1 (Fl1-H) | FITC und YFP-Fluoreszenzintensität |
| 4. Fluoreszenzkanal 2 (Fl2-H) | PE-Fluoreszenzintensität           |

Alle Parameter wurden bei der Auswertung logarithmisch aufgetragen.

Zur durchflusszytometrischen Untersuchung von Zellen wurden diese mit PBS (1% BSA v/v) gewaschen und auf FACS-Röhrchen verteilt (ca. 0,5x10<sup>6</sup> Zellen). Daraufhin wurden die Zellen bei 1200 U pelletiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Wurde eine intrazelluläre Färbung angestrebt, wurden die Zellen mit 100 $\mu$ l Fixierlösung (Reagenz A

aus Fix und Perm Kit) für 15 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit 100 µl Reagenz B 15 min permeabilisiert und wiederum dreimal gewaschen. Die anschließende Inkubation mit den Antikörpern (10µg/ml) fand in einem Reaktionsvolumen von 100 µl statt. Nach Inkubation der Zellsuspension für 30 min wurden die Zellen in 1ml PBS (1% BSA v/v) resuspendiert und bei 1200 U wiederum pelletiert. Es folgte ein weiterer Waschschnitt. Nach Abtrennen des Überstandes erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (10µg/ml) für 30 min. Alle Inkubationen wurden auf Eis und, soweit farbstoffmarkierte Antikörper beteiligt waren, unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung durchgeführt. In der Regel wurde jede Inkubation 30 min durchgeführt und zwischen den einzelnen Inkubationsschritten zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen, die YFP positiv waren, konnten ohne weitere Behandlung im Fl-1 detektiert werden. Unter Verwendung der Sorterfunktion konnten die gewünschten Populationen sortiert und in Kultur genommen werden.

## 2.5 Immunologische Methoden

### 2.5.1 Allgemeine ELISA Methode

In einem ELISA wird das Antigen entweder direkt an eine Mikrotiterplatte gebunden und über einen Antikörper nachgewiesen oder man verfährt nach dem so genannten „Sandwich“-Prinzip.

Die Mikrotiterplatte wird dazu mit einem „Capture-Antikörper“ beschichtet. Nach Inkubation mit der antigenhaltigen Probelösung wird das an den Antikörper gebundene Antigen mit einem zweiten Antikörper, dem sog. Detektionsantikörper, nachgewiesen, wobei der Detektionsantikörper mit einem Enzym gekoppelt sein kann. Bei unmarkierten Antikörpern verwendet man einen dritten Antikörper, der den Sekundärantikörper erkennt und eine Enzymmarkierung trägt. Am häufigsten werden Antikörper mit den Enzymen Peroxidase (POX) (stammt sie aus Meerrettich, wird sie mit „HRP“ abgekürzt), bzw. alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt. Biotinylierte Antikörper werden mit einem Strepavidin-POX- oder Streptavidin-AP-Komplex nachgewiesen. Die Menge an gebundenem, Enzym-markiertem Antikörper ist der Menge an gebundenem Antigen proportional und wird über den Umsatz eines geeigneten chromogenen Substrates im Vergleich zu Standartkonzentration photometrisch bestimmt.

### 2.5.2 ELISA zur Quantifizierung von löslichem humanem p75TNFR

Die Quantifizierung wurde mit den entsprechenden ELISA-Kits nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Bei diesen ELISAs liegt ebenfalls das „Sandwich“-Prinzip zugrunde. Zur Probenvorbereitung wurde Zellkulturüberstand abgenommen und zentrifugiert, um eventuell verbliebene Zellen zu pelletieren. Der daraus resultierende Überstand wurde für die Quantifizierung eingesetzt. Zur Entwicklung der ELISAs wurde ABTS gelöst in ABTS Puffer verwendet und die Absorption bei 405 nm gemessen.

### 2.5.3 Zell-basierter ELISA

Diese Methode wurde verwendet, um Epitope auf Zellen zu detektieren, die so gering exprimiert wurden, dass sie in der Durchflusszytometrie negativ waren. Die Methode nutzt die enorme Signalamplifikation durch Substratumssetzung.

$2,5 \times 10^4$  L929-Zellen pro Well wurden auf eine 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert (Coating). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 15 Minuten mit einer 4%-igen Paraformaldehydlösung fixiert, noch mal gewaschen und mit PBS/1% BSA blockiert. Ein spezifischer Antikörper (2 $\mu$ g/ml) wurde für eine Stunde zugegeben abgewaschen und durch einen enzymgekoppelten Sekundärantikörper und entsprechender Substratumssetzung detektiert.

## 2.6 Fluoreszenzmikroskopie

### 2.6.1 Verwendete Filtersätze

Einstellung	Anregung	Emision	Detektion von
<b>FITC</b>	480 +/- 15 nm BP	535 +/- 20 nm BP	FITC, GFP, YFP
<b>DAPI</b>	360 +/- 20 nm BP	460 +/- 25 nm BP	Dapi, Hoechst 33342 ER-Tracker
<b>Texas-Red</b>	560 +/- 20 nm BP	630 +/- 30 nm BP	TRITC, dsRed
<b>Gold</b>	538 +/- 19 nm BP	480+/-10nm, 580+/-25 und 670-750nm triple BP	Cy3
<b>Aqua</b>	436 +/- 10 nm BP	480+/-10nm, 580+/-25 und 670-750nm triple BP	CFP

### **2.6.2 Herstellung der Fixierlösung (Paraformaldehyd 4%)**

Da eine Alkoholfixierung für GFP-Analoga nicht geeignet ist, wurde mit einer 4%-igen Paraformaldehydlösung fixiert.

30 ml demineralisiertes Wasser wurden auf 65°C erhitzt und nach Zugabe von 2g Paraformaldehyd (Abzug!) tropfenweise mit 10N NaOH versetzt bis sich die Lösung geklärt hat. Nach Zugabe von 16,6 ml 3xPBS wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Dann wurde die Lösung mit demineralisiertem Wasser auf 50ml eingestellt, aliquotiert und bei -20°C weggefroren.

### **2.6.3 Immunhistochemische Färbungen**

Die Methode verwendet Fluorophor-gekoppelte Antikörper und dient dazu, Proteine oder Zellbestanteile durch Immunmarkierung unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen.

5-8 $\times$ 10<sup>5</sup> adhärente Zellen wurden pro Kammer auf einen „four-chamber-cover-slide“ ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit einer 4%-igen Paraformaldehydlösung (250 µl pro Kammer) 15 Minuten fixiert (alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur). Für eine intrazelluläre Färbung wurden die Zellen anschließend durch eine fünfminütige Inkubation mit einer 0,1%-igen Triton-X-100-Lösung permeabilisiert. Dem sorgfältigen Waschen mit PBS folgte das Blockieren des Präparats (1 Stunde mit PBS/1% BSA). Anschließend kam die Inkubation mit dem primären Antikörper (2µg/ml; 1 Stunde), drei Waschritte mit PBS und die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (Verdünnung 1:40). Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt.

Die Kernfärbung erfolgte durch die Inkubation mit einer DAPI-Lösung (Verdünnung der Stammlösung 1:100) für weitere 15 min. Nach einem letzten Waschschritt wurden die Kammern vom Objektträger abgehobelt und das Präparat wurde unter Verwendung des „MobiGlow-Mounting-Mediums“ mit einem Deckglas eingedeckt. Der Objektträger wurde im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

### **2.6.4 Präparation YFP-Fusionsprotein exprimierender Zellen**

Zellen, die Proteine mit einem YFP-tag exprimieren, sind direkt im FITC-Kanal mikroskopierbar. 5-8 $\times$ 10<sup>5</sup> adhärente Zellen wurden pro Kammer auf einen „four-chamber-cover-slide“ ausgesät und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit

PBS gewaschen, mit kompartimentspezifischen Farbstoffen inkubiert, wiederum gewaschen, mit einer 4%-igen Paraformaldehydlösung 15 Minuten fixiert, DAPI-gefärbt und eingedeckelt (analog 2.6.4).

### **2.6.5 Doppelfärbung: Rezeptor und subzellularer Kompartimente**

$5-8 \times 10^5$  Zellen YFP-Fusionsprotein-exprimierende Zellen wurden ausgesät und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und das Zellmedium wurde mit dem jeweiligen Tracker versetzt (serumfrei).

- **Endoplasmatisches Retikulum:** Die Zellen wurden mit 100 nM ER-Tracker-Blue-White-DPX (Molecular Probes) für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Um unspezifische Färbung zu minimieren, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für weitere 10 Minuten mit frischem Medium inkubiert. Danach wurden die Zellen noch einmal gewaschen, 15 Minuten mit 4%-igem Paraformaldehyd fixiert und eingedeckelt. Der Farbstoff wurde in der DAPI-Einstellung mikroskopiert.
- **Golgi-Apparat:** Der Farbstoff BODIPY TR C<sub>5</sub>-ceramide (Molecular Probes) wurde nach Anweisung des Herstellers an BSA gekoppelt, 0,5 mM in serumfreiem Medium gelöst und aliquotiert (500µl) bei -20°C weggefroren. Zum Anfärben des Golgi-Apparates wurde ein Aliquot auf die mit PBS gewaschenen Zellen gegeben und bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Daraufhin wurde mehrere Male mit eiskaltem Medium gewaschen und nochmals für 30 Minuten diesmal bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen wiederum gewaschen, 15 Minuten mit 4%-igem Paraformaldehyd fixiert und eingedeckelt. Der Farbstoff wurde in der Texas-Red-Einstellung mikroskopiert.
- **Mitochondrien:** Die Zellen wurden mit 100 nM Mito-Tracker-Red-CMX-Ros (Molecular Probes) für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mehrmals gewaschen, 15 Minuten mit 4%-igem Paraformaldehyd fixiert und eingedeckelt. Der Farbstoff wurde in der Texas-Red-Einstellung mikroskopiert.
- **Lysosomen:** Die Zellen wurden mit 50 nM Lyso-Tracker-Red-DND-99 (Molecular Probes) für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mehrmals gewaschen, 15 Minuten mit 4%-igem

Paraformaldehyd fixiert und eingedeckelt. Der Farbstoff wurde in der Texas-Red-Einstellung mikroskopiert.

- **Nucleus:** Bei einer zusätzlichen Kernfärbung wurde der Farbstoff Hoechst 33342 ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ), der auch an die DNA von lebenden Zellen bindet, mit den Trackern koinkubiert (30min), gewaschen und eingedeckelt. Der Farbstoff wurde in der DAPI-Einstellung mikroskopiert.
- **Endosomen:** Für die spezifische Färbung der Endosomen wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well in eine 6-Well Platte ausgesät und über Nacht inkubiert und am folgenden Tag mit dem pENDO-eCFP (Clontech) transient transfiziert. Nach den 5 Stunden Inkubationszeit mit dem Transfektionsmix wurden die Zellen gewaschen, abtrypsinert und auf Glasobjektträger ausgesäht. 24 Stunden nach der Transfektion konnte mit angefärbten Endosomen gerechnet werden. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, für 15 Minuten mit 4%-igem Paraformaldehyd fixiert und eingedeckelt. Das cyan-fluoreszierende Protein wurde in der Aqua-Einstellung mikroskopiert

## 2.6.6 Live-Cell-imaging

Um Zellen im lebenden Zustand zu mikroskopieren, wurden  $4 \times 10^5$  Zellen in Zellkulturschälchen mit dünnem Glasboden eingesät und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag konnten Fusionsproteine mit GFP-Analoga und tracker-gefärbte Kompartimente direkt mikroskopiert werden. Hierzu wurde die Klimakammer am Mikroskop, die Brutschrankbedingungen simuliert, in Betrieb genommen. Filme wurden mit der „time-lapse-Funktion“ der Metamorph-Software aufgenommen.

## 2.6.7 Schichtaufnahmen der Zelle (z-Stacks)

Um die Lage einzelner Lichtpunkte im dreidimensionalen Raum zueinander eindeutig bestimmen zu können (Grundvoraussetzung für eine Kolokalisierung) ist eine Dekonvolution notwendig. Ein piezoelektrisch betriebener Motor am 63-er Öl-Objektiv ermöglicht es, die Zelle in der z-Achse durchzuschichten. Aus dieser sogenannten Stapelaufnahme kann durch Anwendung verschiedenster Algorithmen das Streulicht herausgerechnet werden. Die Focusebene wurde, ebenso wie der Start- und der Endpunkt, nach visueller Abstimmung im Focus-Menü der Software definiert. Danach erfolgte eine

Schichtaufnahme für jede einzelne Farbe. Der Abstand einzelner Schichten betrug generell 250 nm und die resultierende Stapeldatei wurde mit der Extinktion \*.stk abgespeichert.

### **2.6.8 Exhaustive Photon Reassignment (EPR)**

Der EPR-Prozess stellt die kommerzielle Ausführung (Fa. Scanalytics) eines 3D-Bildberechnungs-Algorithmus dar, der von Dr. Frederic S. Fay und der „biomedical-imaging-group“ (Universität von Massachusetts) entwickelt und patentiert wurde (US-Patent #5047968). Als Berechnungsgrundlage dient die Point-spread-funktion (PSF) die sich folgendermaßen definiert:

Durch die optischen Eigenschaften wird eine punktförmige Lichtquelle nicht als Punkt abgebildet, sondern als mehr oder weniger scharfe dreidimensionale Struktur (eine Art "Wolke"), die eine bestimmte Helligkeitsverteilung aufweist. Die PSF gibt das reale Abbild einer (theoretisch) punktförmigen Lichtquelle. Kennt man diese PSF, dann kann man einigermaßen genau von einem durch das Mikroskop erhaltenen Abbild des Objektes auf die ursprüngliche Verteilung der "Lichtquellen" (z.B. Fluorochrome) in einer Zelle rückschließen.

Die reale PSF des Mikroskops/Objektivs kann man mit fluoreszierenden Beads, deren Eigenschaften (Durchmesser, Fluoreszenzmarkierung, Fluoreszenzverteilung) man kennt, einigermaßen genau ermitteln. Die PSF ist abhängig von verschiedenen mikroskopischen Parametern (Typ, Fabrikat, Justierung, Objektiv, numerische Apertur, Brechungsindex des Immersionsmediums etc.). Nach erfolgter Kalibrierung wurden auf Grundlage der Schichtaufnahmen (\*.stk) der einzelnen Farben 3D-Bilder errechnet, in denen die Kolokalisierung zweier Lichtpunkte möglich war. Die Dekonvolution erfolgte an einem separatem Rechner, da die Rechenzeit je nach Größe der Stapeldatei bis zu 10 Stunden betrug.

## **2.7 Herstellung monoklonaler Antikörper**

### **2.7.1 Immunisierung von Mäusen**

Am Tag 0 wurden 2 weibliche NMRI-Mäuse mit je 30 $\mu$ g Peptid immunisiert. Als Adjuvans diente Aluminium-Hydroxid (Titermax®), das im Verhältnis 3:2 mit dem in PBS gelöstem Peptid zu einer Emulsion vermischt und den Mäusen subcutan und intraperitoneal appliziert wurde. Die zweite Immunisierung erfolgte intraperitoneal am Tag 21. Drei Tage vor der

geplanten Fusion (Tag 47) wurde erneut geboostet, diesmal jedoch wurde das in PBS gelöste Peptid intravenös appliziert.

### **2.7.2 Gewinnung von Serum aus Vollblut**

Zur Gewinnung von Serum aus Vollblut wurde das abgenommene Blut zum Gerinnen erst eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend nach einem Kreuzschnitt durch den Ppropf über Nacht bei 4°C stehengelassen. Am darauf-folgenden Tag wurde das geronnene Blut bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -20°C weggefroren.

### **2.7.3 Gewinnung von Peritoneal-Makrophagen (Feeder-Zellen)**

Die Feeder-Zellen wurden zusammen mit fusionierten Hybridomen kultiviert, um konditioniertes Medium zu erzeugen und um tote Zellen und Zellreste durch Phagozytose zu beseitigen. Die Vorgehensweise war folgende: Einer Maus wurden 1ml steriles PBS intraperitoneal appliziert. 16 Stunden später wurde sie durch Genickbruch getötet und nach komplettem Ausbluten wurde der Bauchraum mit 10ml kaltem PBS/FCS gespült. Die Peritoneal-Lavage einer Maus wurde auf eine 96-Well-Platte verteilt, wobei die Zell-Ausbeute etwa  $2 \times 10^6$  Peritoneal-Exsudat-Zellen pro Maus betrug wovon wiederum ca. 50% Makrophagen waren. Die nicht adhärenten Zellen wurden am nächsten Tag abgewaschen so dass etwa  $10^4$  Peritoneal-Makrophagen pro Well in Kultur verblieben.

### **2.7.4 Gewinnung von Milzzellen**

Die Maus wurde durch Genickbruch getötet und komplett ausgeblutet. Aus dem Blut wurde zur weiteren Analyse Serum gewonnen. Die Milz wurde steril entnommen und mit Hilfe eines Zellsiebes in eine Einzelzellsuspension überführt. Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem RPMI-Medium gewaschen, um Bindegewebs- und Fettreste zu entfernen, gezählt und für die Zellfusion verwendet. Eine Mausmilz enthält ca.  $1 \times 10^8$  Zellen.

### **2.7.5 Zellfusion mit Polyethylenglykol**

Zur Fusion wurde die Maus-Myelomzelllinie SP2/0-Ag14 (SP2/0 Zellen) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Hybridom aus BALB/c-Milzzellen und der Myelomzelllinie P3X63AAG8, das sich gut mit PEG 1500 fusionieren lässt (Shulman, 1978).

Die Myelomzellen wurden mit RPMI-Medium zweimal serumfrei gewaschen und gezählt.  $5 \times 10^7$  Milzzellen wurden mit  $1,5 \times 10^7$  SP2/0 Zellen (Verhältnis ca. 3:1) in einem 50ml

Falcontube gemischt und durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig ganz trocken gesaugt und vorsichtig aufgeklopft. Ein Milliliter vortemperierte PEG1500 wurde zugegeben und die Mischung für 1min ins Wasserbad gestellt. Innerhalb der nächsten 5 min wurde anfangs ganz langsam, dann zunehmend schneller HAT-Medium zugegeben bis 50 ml erreicht waren. Dann wurde auf ein Gesamtvolumen von 150ml mit HAT-Medium aufgefüllt und auf 15 96-Well-Platten, die tags zuvor mit Peritonealzellen beschichtet worden waren, verteilt (pro Well 100µl). Die Selektion fusionierter Zellen erfolgte im HAT-Medium, das Screenen positiver Klone mittels ELISA.

### **2.7.6 Klonierung von positiven Hybridomzellen**

Um den monokonalen Ursprung der Hybridome sicher zu stellen, wurden aus den positiv getesteten Kulturen Zellen entnommen und soweit verdünnt, dass theoretisch nur noch 0,5 Zellen pro Kultur vorhanden waren. Die daraus gewachsenen Klone wurden wiederum getestet und zunächst an HT-Medium und schließlich an RPMI-Medium adaptiert.

### **2.8 Tierhaltung**

Alle verwendeten Tiere waren entsprechend der Haltungsvorschriften untergebracht, hatten einen 12 Stunden Hell-Dunkel Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser ad libitum.

## C. Ergebnisse

### 1. Projektbeschreibung

Bei Untersuchungen zur regulierten humanen p75TNFR-Expression war eine neue hp75TNFR-cDNA identifiziert worden, die zur Expression einer vermutlich intrazellulären, funktionellen Isoform des hp75TNFR führt (Seitz, 2001). Erste Versuche hatten gezeigt, dass Zellen durch hicp75TNFR-Expression gegenüber TNF-Zytotoxizität resistent werden. Eine Abhängigkeit dieses Schutzes von TRAF2-Bindung und NF $\kappa$ B-Aktivierung wurde aufgrund von Vorversuchen postuliert. Die exakte subzelluläre Lokalisierung und die Aktivierungsmechanismen (endogenes und/oder exogenes TNF) des hicp75TNFR sollten in diesem Forschungsprojekt mit Hilfe pseudo-konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und magnetischer Rezeptosomen-Isolierung untersucht werden.

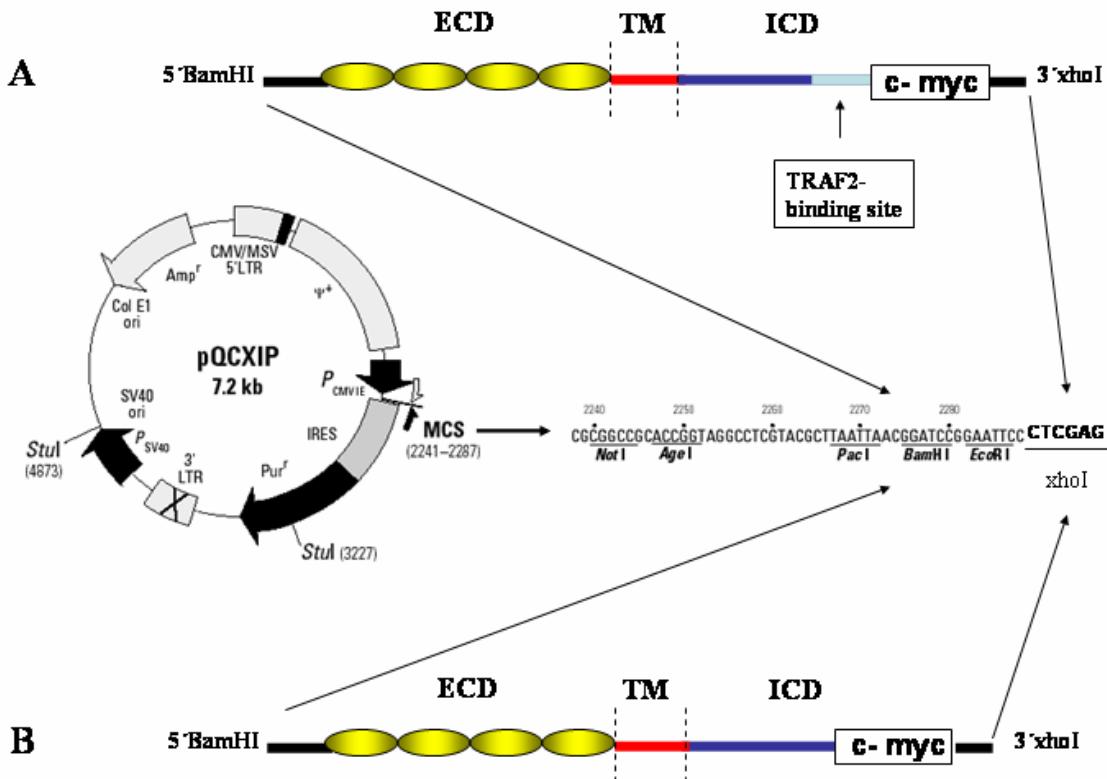
Des Weiteren sollte eine biochemische Untersuchung des hicp75TNFR-Proteins erfolgen und untersucht werden, ob die Produktion monoklonaler Antikörper gegen das für diese Rezeptor-Isoform spezifische Peptid aus Exon 1a möglich ist. Um ein besseres Bild der hicp75TNFR-Funktionen zu erhalten, sollten stabile Rezeptor- und Rezeptormutanten-exprimierende Zelllinien generiert und in verschiedenen Zytotoxizitäts-Assays getestet werden.

### 2. Klonierung von tag-markierten hicp75TNFR-Expressionskonstrukten

#### 2.1 Rezeptorkonstrukte mit humaner c-myc-Markierung

Die Generierung stabiler rezeptorexprimierender Zelllinien erfolgte durch retroviralen Gentransfer. Hierfür wurde die cDNA in den proviralen Vektor pQCXIP kloniert und am 3' Ende mit einem humanem c-myc-Epitop versehen. Dieses Epitop besteht aus 10 Aminosäuren des Proto-Onkogens c-myc, befindet sich nach der Translation am C-Terminus des Proteins und beeinträchtigt in dieser Position weder die Funktion noch die Lokalisation der Rezeptoren. Für die Charakterisierung eines Proteins ist dieses zusätzliche Epitop sehr hilfreich, da bereits Antikörper gegen dieses Epitop existieren.

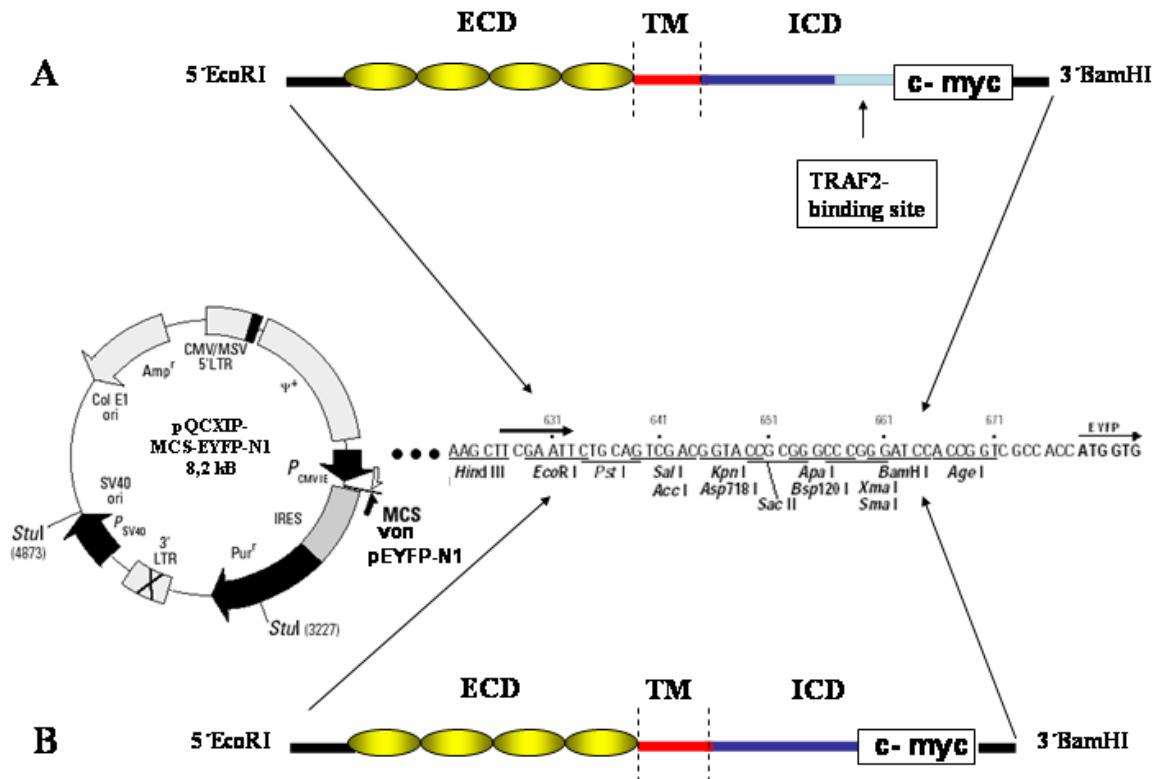
Mittels PCR wurden die bereits im pcDNA3.1 Vektor vorhandenen myc-getaggten cDNA's vervielfältigt und am 5' und 3' Ende mit passenden Restriktionsschnittstellen versehen. Die Produkte wurden aufgereinigt, verdaut und in den modifizierten pQCXIP-Vektor (AG Schneider) kloniert. Die Sequenzen wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert.



**Abb. 3: Klonierung der Rezeptorkonstrukte mit humarer c-myc-Markierung.** Die bereits myc-getaggten cDNA's von (A) hp75TNFR-myc bzw. hcip75TNFR-myc und (B) hcip75TNFR ΔTRAF wurden mittels PCR amplifiziert und in den modifizierten proviralen Expressionsvektor pQCXIP (zusätzliche xhoI Schnittstelle) kloniert. Die Restriktions-schnittstellen wurden über passende Primer eingeführt.

## 2.2 Fusionsproteine aus GFP-Analoga und humanen p75TNFR-Isoformen

Wird eine cDNA im Leseraster zu GFP-Analoga kloniert entstehen fluoreszierende Fusionsproteine. Mit seinen 322 Aminosäuren stellt YFP einen sehr großen Marker dar, der in einigen Fällen die Funktionen des ursprünglichen Proteins beeinflussen kann (sterische Hinderung etc.). Da für die subzelluläre Rezeptorlokalisierung stabile Fusionsprotein-exprimierende Zellen benötigt wurden, wurden die Konstrukte ebenfalls in einen modifizierten pQCXIP-Vektor kloniert. Dieser enthielt statt seiner ursprünglichen „multiple cloning site (MCS)“ die Sequenz für YFP und MCS aus pEYFP-N1 (AG Schneider). Somit konnten PCR Produkte mit geeigneten Schnittstellen direkt „in frame“ zu YFP in einen proviralen Vektor kloniert werden. Die Sequenzen wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert.



**Abb. 4: Klonierung der Rezeptorkonstrukte mit YFP-tag.** Um fluoreszierende Fusionsproteine zu erhalten wurden die bereits myc-getaggenen cDNA's von (A) hp75TNFR-myc bzw. hcip75TNFR-myc und (B) hcip75TNFR ΔTRAF mittels PCR amplifiziert und in den modifizierten proviralen Expressionsvektor pQXIP kloniert. Die Restriktions-schnittstellen wurden über passende Primer eingeführt.

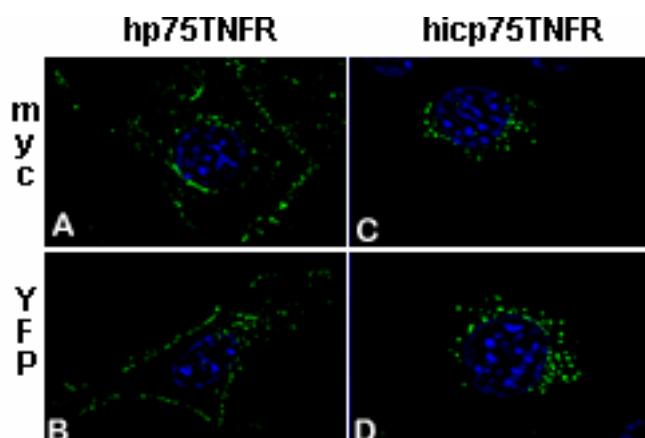
### 3. Subzelluläre Lokalisierung

In den folgenden Lokalisierungsexperimenten wurde die exakte subzelluläre Lokalisierung der neuen Isoform hcip75TNFR mit der des bereits bekannten membranständigen hp75TNFR verglichen. In NIH3T3-Zellen, die nach viraler Gentransduktion entweder hcip75TNFR oder hp75TNFR als YFP-Fusionsproteine stabil exprimierten wurden unterschiedliche Kompartimente spezifisch gefärbt. Um eine Kolokalisierung im dreidimensionalen Raum zu ermöglichen, wurde in jeder Farbe eine Schichtaufnahme angefertigt und nach erfolgter EPR-Berechnung analysiert. Die farbigen Bilder bilden jeweils eine repräsentative Ebene der Stapelaufnahme ab. Eine Kolokalisierung der Farben Grün und Rot ergibt Gelb. Der „Overview“ kann hierbei nicht als Ersatz für eine Phasenkontrastaufnahme dienen, sondern stellt vielmehr alle Ebenen der Rezeptorfärbung

in einer 3D-Rekonstituierung dar. Als Nebeneffekt werden somit aber die Abmessungen der Zelle sichtbar.

### 3.1 Vergleich der beiden Färbeprotokolle

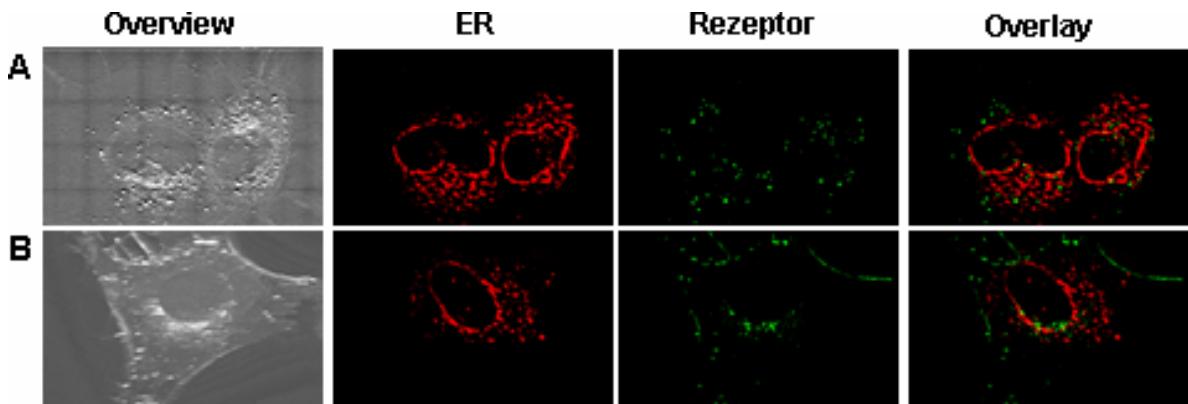
Da die subzelluläre Lokalisierung des hicp75TNFR anhand des YFP-Fusionsproteins erfolgten sollte, musste untersucht werden ob die Modifikation des Proteins Auswirkungen auf dessen Lokalisierung hat. Transduzierte NIH3T3-Zellen exprimierten sowohl die myc- als auch die YFP-markierten p75TNFR-Isoformen. Während die myc-markierten Proteine mit Hilfe klassischer Immunhistochemie detektiert wurden, konnten die YFP-Fusionsproteine direkt nach Fixierung der Zellen mikroskopiert werden. Nach einer z-Achsen-Schichtung und anschließender EPR-Analyse zeigte der hp75TNFR in beiden Fällen das typische Expressionsmuster eines membranständigen Rezeptors, wohingegen der hicp75TNFR eine distinkte perinukleäre Verteilung aufwies. Da die YFP-Fusionsproteine sich im Expressionsmuster von myc-markierten Proteinen nicht unterschieden und darüber hinaus schonender zu präparieren waren, wurde in den folgenden Experimenten das jeweilige YFP-Fusionsprotein im Vergleich zu gefärbten subzellulären Kompartimenten analysiert.



**Abb. 5: Expressionsmuster myc- und YFP-markierter hp75TNFR-Isoformen.** Untersuchungen an transduzierten NIH3T3-Zellen zeigen für beide Detektionssysteme eine identische Rezeptorverteilung. Das myc-Epitop (A; C) wurde mit dem monoklonalen Mausantikörper 9E10 und sekundärem FITC-konjugiertem anti-Maus-Antikörper gefärbt. (Kernfärbung DAPI in A und C; Hoechst 33342 in B und D).

### 3.2 Gegenfärbung des Endoplasmatischen Retikulums

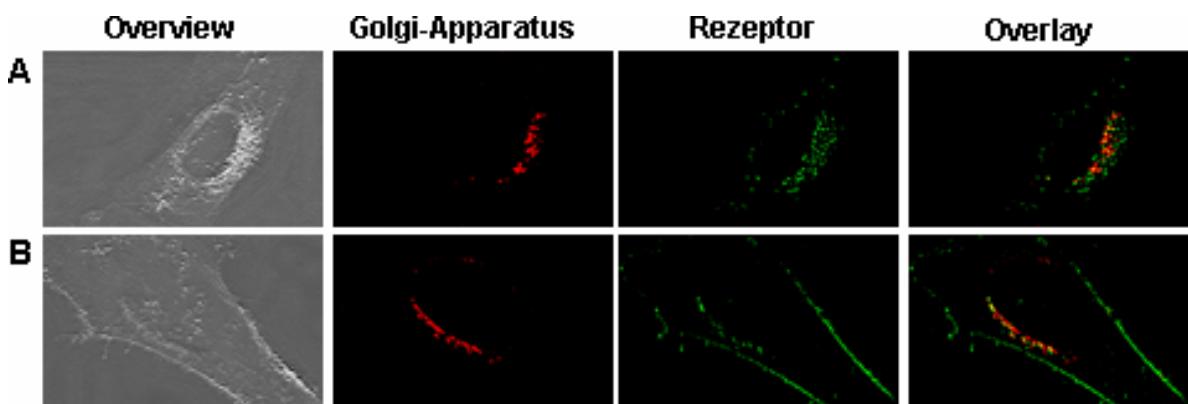
Als Protein mit hydrophobem Membrananker wird der hicp75TNFR am rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und in die ER-Membran translociert. Die Analyse der EPR-gerechneten Aufnahmen zeigt, dass der icp75TNFR das ER verlässt und die von Exon 1a codierte Präsequenz nicht als ER-Retentionssignal fungiert, da keine Überlappung der spezifischen Färbungen erfolgte.



**Abb. 6:** NIH3T3-Zellen exprimieren entweder hicp75TNFR-YFP (Reihe A) oder hp75TNFR-YFP (Reihe B). Kompartimentfärbung: 100 nM ER-Tracker-Blue-White-DPX.

### 3.3 Gegenfärbung des Golgi-Apparates

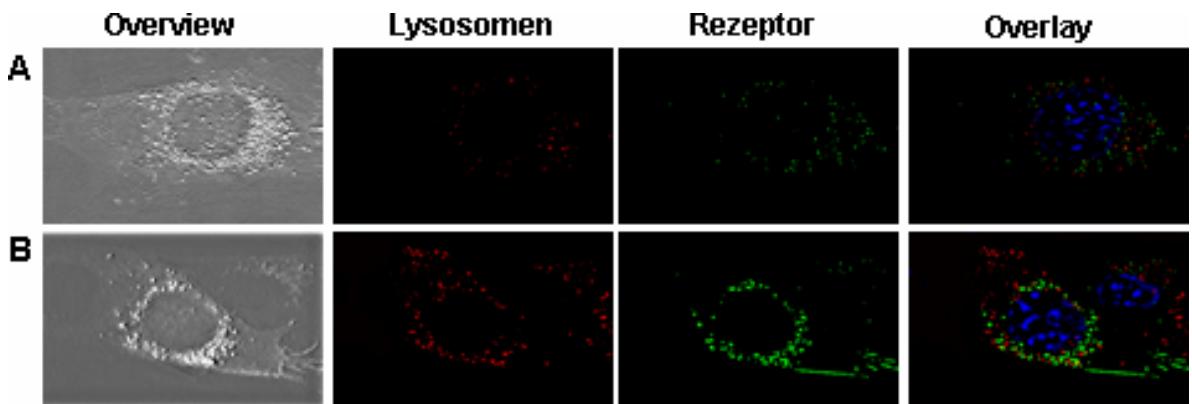
Membranproteine, die das ER verlassen, gelangen anschließend in den Golgi-Apparat, von dem aus sie in Vesikeln zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden. Überexprimierte Proteine reichern sich neben dem Zielkompartiment auch im Golgi-Apparat an. Dies konnte auch für beide hp75TNFR-Isoformen gezeigt werden. Die EPR-Analyse belegte für beide Fusionsproteine eine Kolokalisierung mit dem Golgi-Apparat. Der hp75TNFR lief darüber hinaus auf der Plasmamembran auf, wohingegen sich der hicp75TNFR in perinukleären Vesikeln auch außerhalb des gefärbten Golgi-Apparates konzentrierte.



**Abb. 7:** NIH3T3-Zellen exprimieren entweder hicp75TNFR-YFP (Reihe A) oder hp75TNFR-YFP (Reihe B). Kompartimentfärbung: 0,5 mM BODIPY TR C<sub>5</sub>-ceramide.

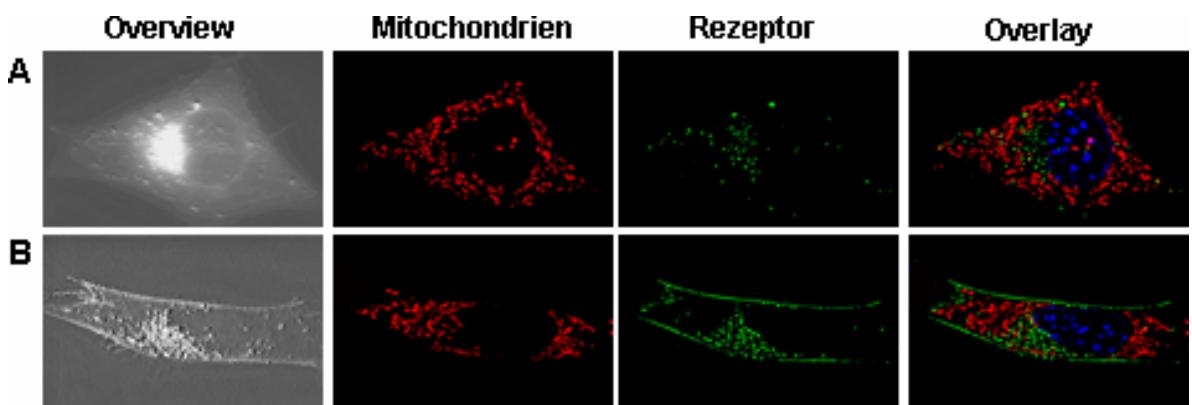
### 3.4 Gegenfärbung der Lysosomen

Exogenes TNF kann nach Bindung an den p55TNFR in sogenannten Rezeptosomen internalisiert werden (Mosselmans, 1988, Schneider-Brachert, 2004). Diese Komplexe aktivieren Signalkaskaden und fusionieren mit Lysosomen, in denen die Proteine abgebaut werden. Um zu untersuchen, ob der hicp75NFR womöglich in Lysosomen lokalisiert ist und dort durch internalisiertes TNF aktiviert wird, wurden neben isolierten Rezeptosomen (siehe B:9.1) auch fluoreszenzmikroskopische Bilder analysiert. Eine Kolokalisierung des hicp75TNFR mit Lysosomen konnte nicht festgestellt werden.



**Abb. 8:** NIH3T3-Zellen exprimieren entweder hicp75TNFR-YFP (Reihe A) oder hp75TNFR-YFP (Reihe B). Kompartimentfärbung: 50 nM Lyso-Tracker-Red-DND-99; Kernfärbung: Hoechst 33342.

### 3.5 Gegenfärbung der Mitochondrien

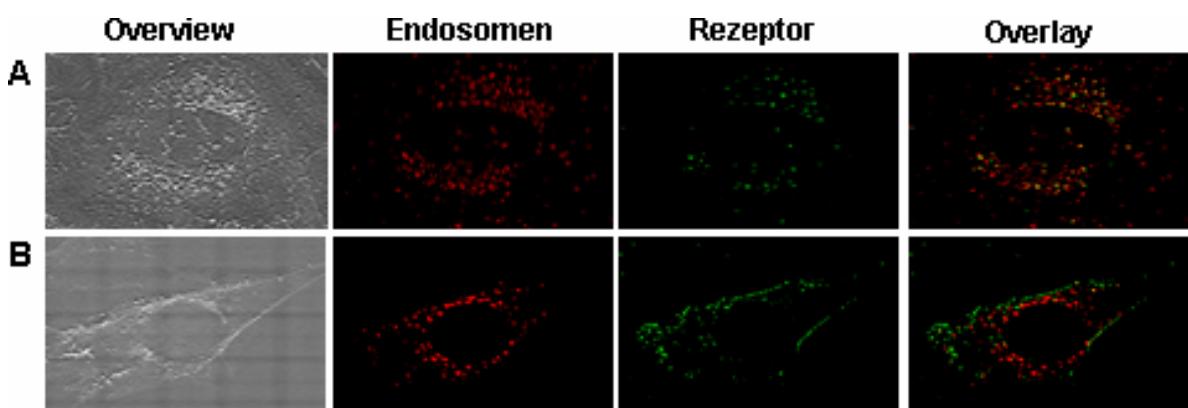


**Abb. 9:** NIH3T3-Zellen exprimieren entweder hicp75TNFR-YFP (Reihe A) oder hp75TNFR-YFP (Reihe B). Kompartimentfärbung: 100 nM Mito-Tracker-Red-CMX-Ros; Kernfärbung: Hoechst 33342.

Die Gruppe um Bradley berichtete von einem TNF-bindenden Protein in den Mitochondrien, das darüber hinaus mit einem Antikörper gegen hp75TNFR angefärbt werden konnte (Ledgerwood, 1998). Die Möglichkeit, dass der hicp75TNFR mit diesem Protein identisch sein könnte und in den Mitochondrien lokalisiert ist, war bereits immunhistochemisch ausgeschlossen worden (Seitz, 2001). Der hier gewählte alternative YFP-Fusionsprotein-Ansatz bestätigte diese Daten. Weder der hp75TNFR noch der hicp75TNFR kolokalisierten mit dem Mitochondrien-Farbstoff.

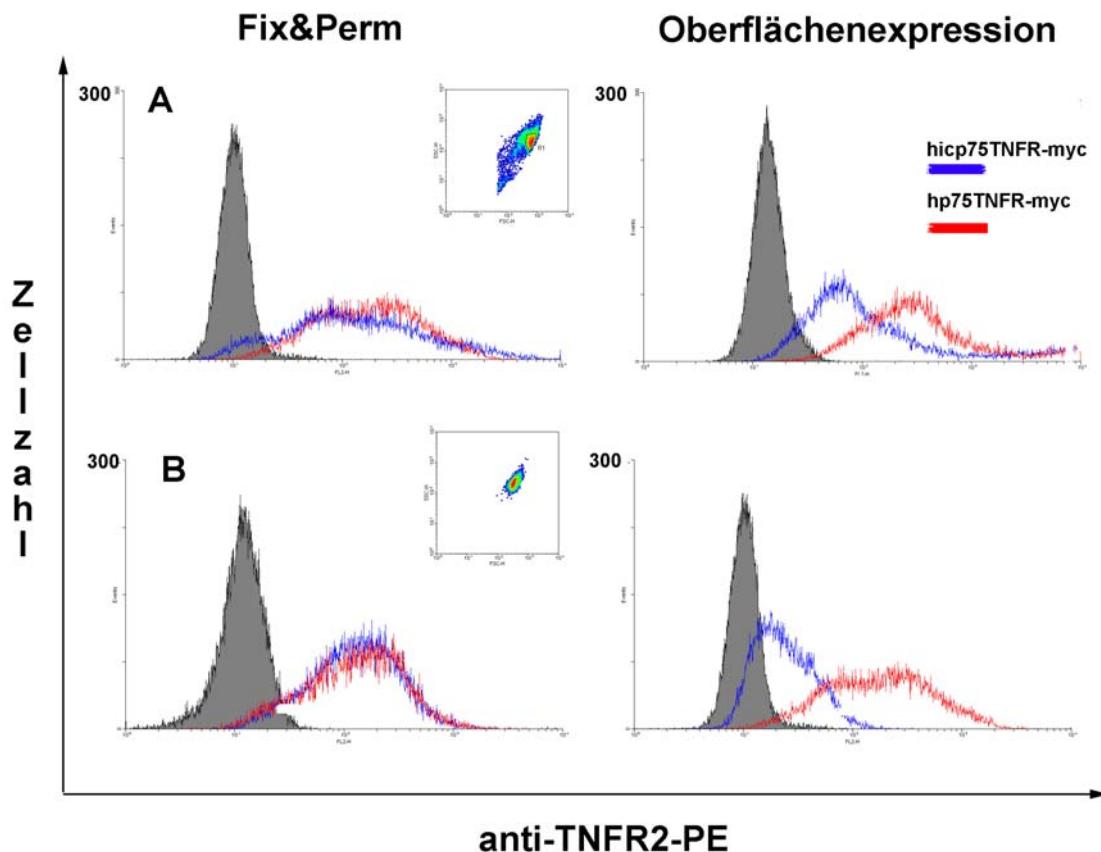
### 3.6 Gegenfärbung der Endosomen

Der Begriff Endosom bezeichnet eine Gruppe uneinheitlicher, membranumhüllter Röhren und Transportvesikel eukaryontischer Zellen. Eine Analyse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des hicp75TNFR und gefärbter Endosomen zeigte eine starke Retention des Rezeptors in Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN). Somit konnte gezeigt werden, dass der hicp75TNFR weder im ER noch im Golgi-Apparat zurückgehalten wird. Das Knospen von Transportvesikel findet statt. Der Transport zur Plasmamembran jedoch erfolgt aufgrund des Fehlens eines definierten N-terminalen Signalpeptids stark verzögert, was den „Stau“ im TGN erklärt. Durch den aktiven und zielgerichteten Transport des hp75TNFR zur Plasmamembran lässt sich diese Isoform im TGN kaum nachweisen.



**Abb. 10:** NIH3T3-Zellen exprimieren entweder hicp75TNFR-YFP (Reihe A) oder hp75TNFR-YFP (Reihe B). Kompartimentfärbung: Cotransfektion mit pENDO-ECFP.

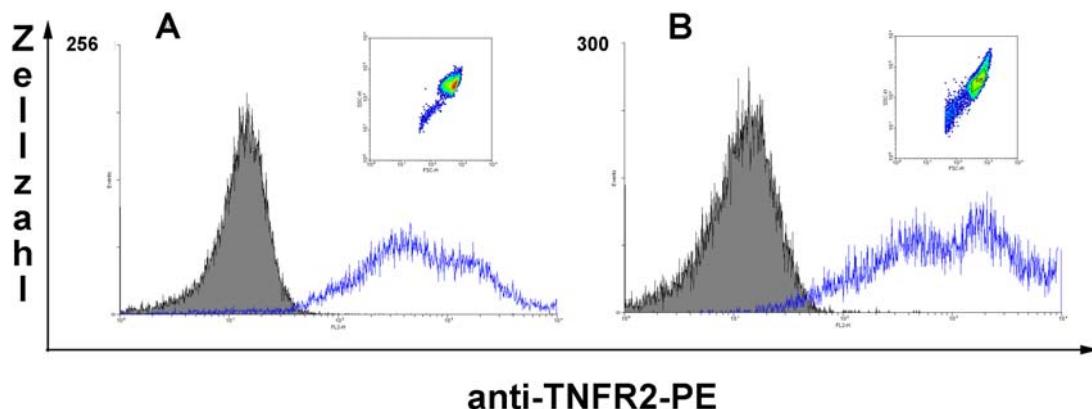
#### 4. Untersuchungen zur Membranexpression beider hp75TNFR-Isoformen



**Abb. 11:** Konventionell transfizierte HEK293T-Zellen (A) und retroviral transduzierte L929-Zellen (B) wurden auf die Oberflächenexpression der p75TNFR-Isoformen untersucht. Die fixierten und permeabilisierten Zellen zeigen eine annähernd gleiche Epitopdichte, wohingegen hicp75TNFR im Vergleich zu p75TNFR in geringerer Menge auf der Plasmamembran vorkommt. (— hicp75TNFR-myc, — hp75TNFR-myc, grauer Peak = Isotypkontrolle). Das Profil der jeweiligen Zelllinie wird im „Densitiy Blot“ (SSC gegen FSC) dargestellt.

Bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen war für den hicp75TNFR keine Membranexpression sichtbar. Time-lapse-Aufnahmen jedoch zeigten vereinzelt hicp75TNFR-YFP Vesikelwanderungen zur Membran, was bedeuten könnte, dass der Rezeptor auch membranständig, in einer Dichte, die unterhalb der Detektionsschwelle des Mikroskops liegt, vorkommen könnte. In der Literatur wird ähnliches bereits für den p55TNFR beschrieben (Bradley, 1995, Jones, 1999). Die Oberflächenexpression der p75TNFR-Isoformen wurde daher durchflusszytometrisch an konventionell transfizierten (Abb. 11A) und mehreren retroviral transduzierten (Abb. 11B, Abb. 12) Zelllinien direkt nach der Selektion untersucht. Durch die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen

(Fix&Perm) waren sowohl die intrazellulären als auch die membranständigen Epitope für einen PE-konjugierten, spezifischen anti-human-p75TNFR-Antikörper zugänglich. Die Gesamtexpression der beiden Isoformen war annähernd gleich (Abb. 11 linke Reihe). Wurden die Zellen nicht permeabilisiert, konnten die Antikörper nur an membranständige Epitope binden. Es zeigte sich in beiden Expressionsmodellen eine unerwartete Membranexpression des hicp75TNFR, die jedoch im Vergleich zu p75TNFR immer schwächer ausfiel. Der hicp75TNFR ließ sich neben transduzierten L929 Zellen (Abb. 11B) auch noch auf der Oberfläche transduzierter NIH3T3-Zellen (Abb.12A) und TNFR1/2 doppelt-defizienten Mausfibroblasten (Abb.12B) nachweisen.



**Abb. 12:** Retroviral transduzierte NIH3T3-Zellen (Abb.12A) und TNFR1/2 doppelt-defizienten Mausfibroblasten (Abb.12B) zeigen in der durchflusszytometrischen Analyse ebenfalls hicp75TNFR-Membranexpression. (—— hicp75TNFR-myc, grauer Peak = Isotypkontrolle). Das Profil der jeweiligen Zelllinie wird im „Densitiy Blot“ (SSC gegen FSC) dargestellt.

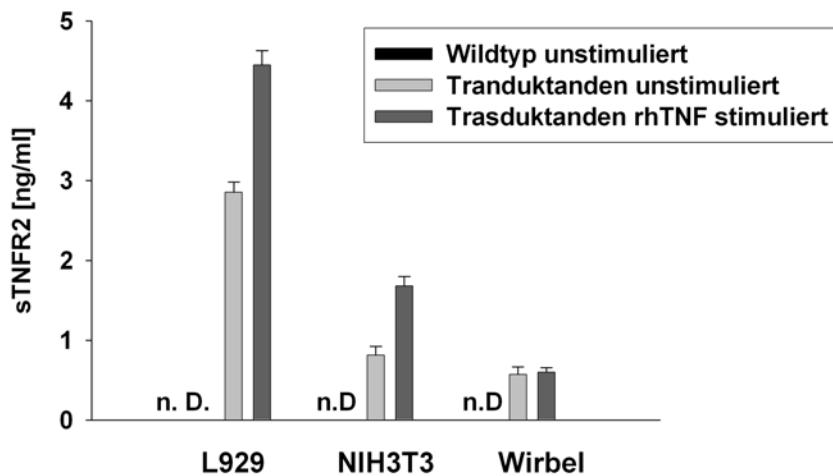
Durch Verwendung einer sensitiveren Methode konnte somit gezeigt werden, dass der hicp75TNFR auch ohne distinktes Signalpeptid den Weg zur Plasmamembran findet. Diese Beobachtung ist Methoden- und Zelllinien-unabhängig.

## 5. Untersuchungen zur Prozessierung löslicher hp75TNFR-Isoformen

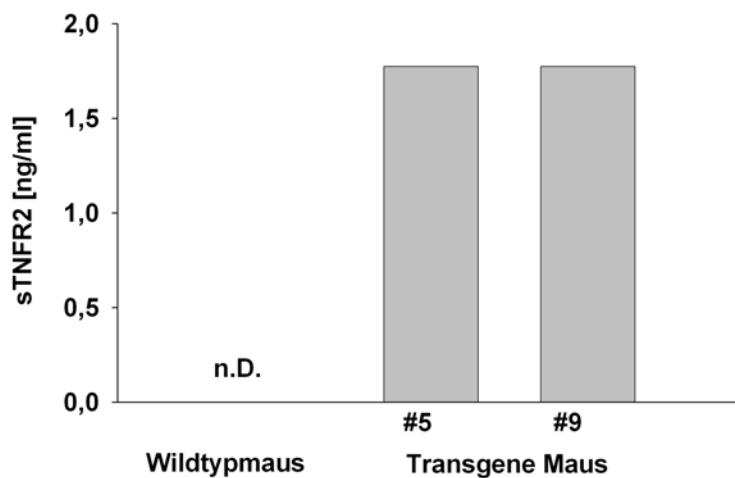
### 5.1 Identifizierung von löslichem hicp75TNFR

Für den p55TNFR und den p75TNFR sind lösliche TNF-Rezeptor-Formen beschrieben worden. Diese entstehen durch proteolytische Prozesse an der Zellmembran und bestehen aus der Extrazellulärdomäne des jeweiligen Rezeptors. Nachdem der hicp75TNFR auch auf

Zellmembranen detektiert werden konnte, sollte untersucht werden, ob auch diese Isoform des p75TNFR einem proteolytischen Abspaltungs-Prozess unterworfen ist. Hierfür wurde der Überstand transduzierter Zelllinien im human-p75TNFR-ELISA untersucht.



**Abb. 13: Detektion von löslichem hicp75TNFR im Überstand dreier transduzierter Zelllinien.** Während bei Wildtypzellen keine löslichen TNF-Rezeptoren detektiert werden konnten, geben transduzierte Zellen shicp75TNFR in den Überstand ab. Eine Stimulation mit rhTNF [6ng/ml] steigert die Menge in p55TNFR-tragenden Zellen.



**Abb. 14: Detektion von löslichem hicp75TNFR in Seren hicp75TNFR-transgener Mäuse nach LPS-Stimulation**

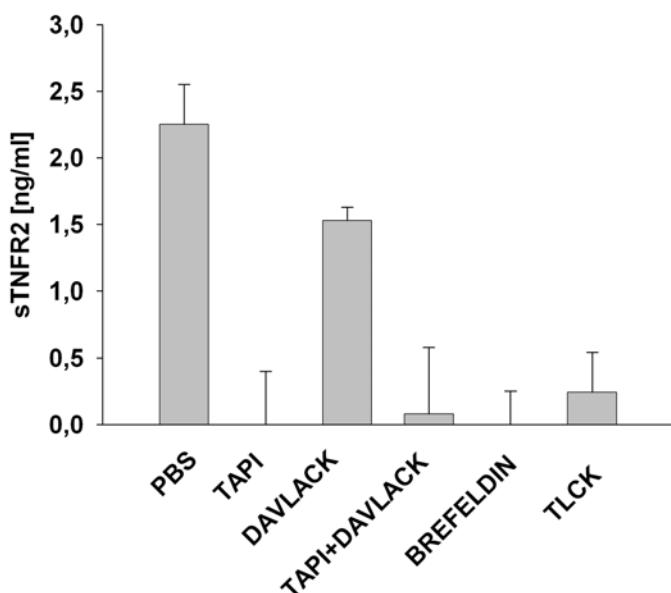
In drei unterschiedlichen Zelllinien, die mit hicp75TNFR-myc transduziert wurden, konnte im Gegensatz zur Wildtypkontrolle löslicher Rezeptor im Überstand nachgewiesen werden. Die Zugabe von rekombinantem humanem TNF induzierte wie bereits für den p75TNFR aus der Literatur bekannt war (Pedron, 2003), vermehrtes Shedding. Da in TNFR1/2 doppelt-defizienten Fibroblasten die Proteolyse durch Stimulierung mit rhTNF nicht

gesteigert werden konnte, zeigt, dass hierfür die Bindung von TNF an den p55TNFR notwendig ist (Abb. 13).

Aufgrund dieser Daten wurde auch das Serum hicp75TNFR transgener Mäuse auf löslichen hicpTNFR untersucht. Das Transgen steht unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors und wird somit in allen Geweben exprimiert. Die Tatsache, dass löslicher hicp75TNFR in den Seren dieser Mäuse (Abb. 14) nachgewiesen werden kann, muss bei der Planung von Experimenten mit diesen Tieren berücksichtigt werden.

## 5.2 Identifizierung der proteolytisch aktiven Enzyme

Die beobachtete Induktion der Prozessierung des löslichen hicp75TNFR legt die Beteiligung eines oder mehrerer proteolytischer Enzyme nahe. Da diese für den hp75TNFR bereits gut charakterisiert sind, sollte überprüft werden, ob die neue Isoform des p75TNFR ebenfalls das Substrat der gleichen Enzyme ist.



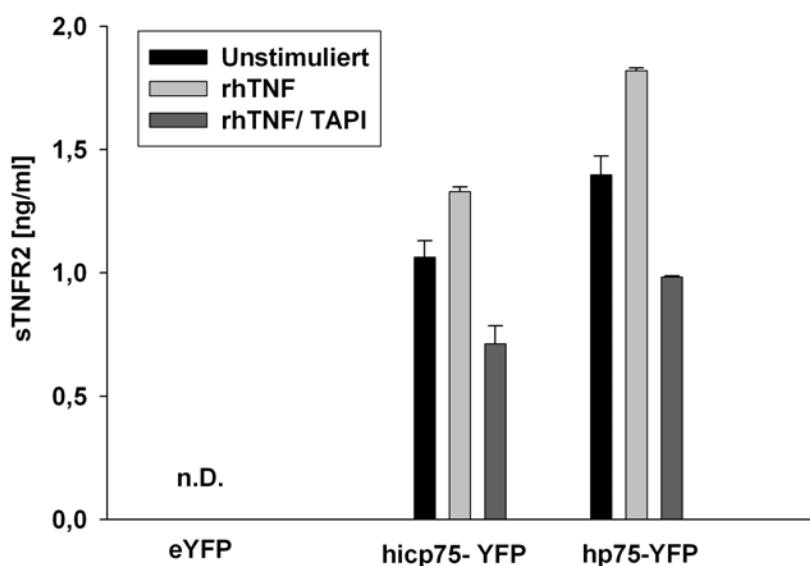
**Abb. 15: Hemmung des konstitutiven hicp75TNFR-Shedding durch Zugabe von Inhibitoren.** Stabil hicp75TNFR-myc transduzierte L929-Zellen wurden in Gegenwart von Inhibitoren über Nacht inkubiert. Der Kulturüberstand wurde auf löslichen hicp75TNFR untersucht. Kontrolle: PBS; TAPI (100 $\mu$ M); DAVLACK (100  $\mu$ M); Brefeldin (10 $\mu$ g/ml); TLCK (20  $\mu$ M).

Brefeldin blockt den Proteintransport vom ER zum Golgi-Apparat und unterbindet somit jegliche aktive Freisetzung von Proteinen, in diesem Fall von löslichem hicp75TNFR (Abb.15). Dieser Effekt wird auch bei der intrazellulären Zytokin-Färbung für die Durchflusszytometrie genutzt.

Die Metalloproteinase TACE, auch bekannt als ADAM17, ist an der Prozessierung von TNF und TNF-Rezeptoren beteiligt. Durch die Abspaltung einer Prodomäne durch Serin-Proteasen (z.B. Furin) wird ursprünglich inaktives TACE in den aktiven Zustand überführt und spaltet geeignete Substrate. TAPI gilt als spezifischer Inhibitor von TACE (Mohler, 1994). Eine nahezu komplett Hemmung des hicp75TNFR-Shedding durch TAPI (Abb.15) belegt, dass in diesem Fall die Aktivierung von TACE auch beim Prozessieren des hicp75TNFR notwendig ist. Durch die Verwendung eines generellen Serin-Protease-Inhibitors (TLCK) und eines spezifischen Furin-Inhibitors (DAVLACK) konnte ebenfalls die Beteiligung von Serin-Proteasen beim Abspaltvorgang gezeigt werden.

### 5.3 Vergleich der Freisetzung beider löslicher hp75TNFR-Isoformen

Da der hicp75TNFR in geringerem Ausmaß auf der Membran exprimiert wird als der p75TNFR, sollte untersucht werden ob zwischen der Membranexpression und der Menge löslicher Rezeptoren ein Zusammenhang besteht. Hierfür wurden hicp75TNFR-YFP und hp75TNFR-YFP transduzierte L929-Zellen auf äquivalente Gesamtexpression des Fusionsproteins sortiert und die Überstände auf lösliche p75TNFR-Isoformen untersucht.



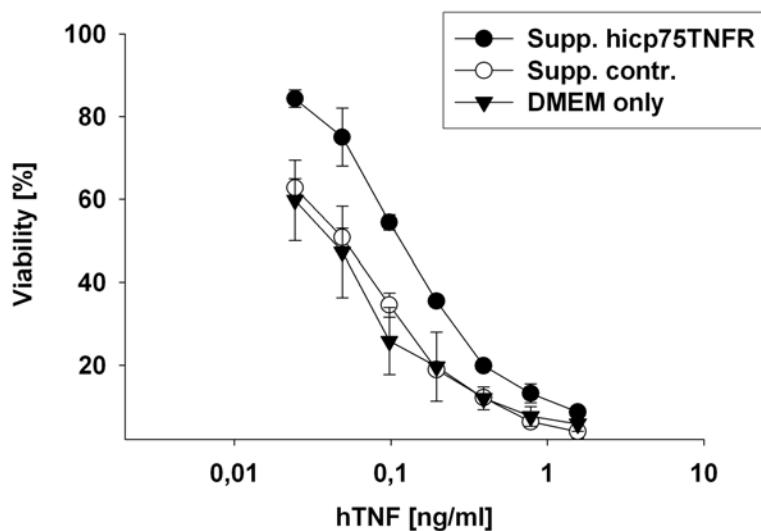
**Abb. 16: Semiquantitativer Vergleich beider löslicher hp75TNFR-Isoformen.** Durch Zellsortierung wurden L929-Zellen mit gleicher YFP-Fusionsprotein-Gesamtexpression erhalten. Die konstitutive und induzierbare Menge an löslichen hp75TNFR-Isoformen im Überstand wurde mittels ELISA quantifiziert.

Da beide Zelllinien auf die annähernd gleiche Rezeptorenzahl normiert wurden, konnte gezeigt werden, dass im Überstand der hicp75TNFR-YFP-Transduktanden im Vergleich zu den hp75TNFR-YFP-Transduktanden konstitutiv und induzierbar weniger löslicher Rezeptor abgegeben wird (Abb. 16). Der Unterschied kann nicht durch eine unterschiedliche Aktivität von TACE in den beiden Zelllinien zustande kommen, was die gleiche Induzierbarkeit und Hemmbarkeit des Sheddings belegen. Setzt man die konstitutive Freisetzung gleich eins, beträgt die Induktion in beiden Linien ca. 30% und deren Blockierung durch TAPI ca. 70% (Tab.1).

	hicp75-YFP	hp75- YFP
unstimuliert	1	1
rhTNF	1,25	1,3
rhTNF/TAPI	0,67	0,7

**Tab. 1: Bestimmung der TACE-Aktivität in den auf gleiche Rezeptorzahl sortierten Zelllinien**

## 6. Bioaktivität des löslichen hicp75TNFR

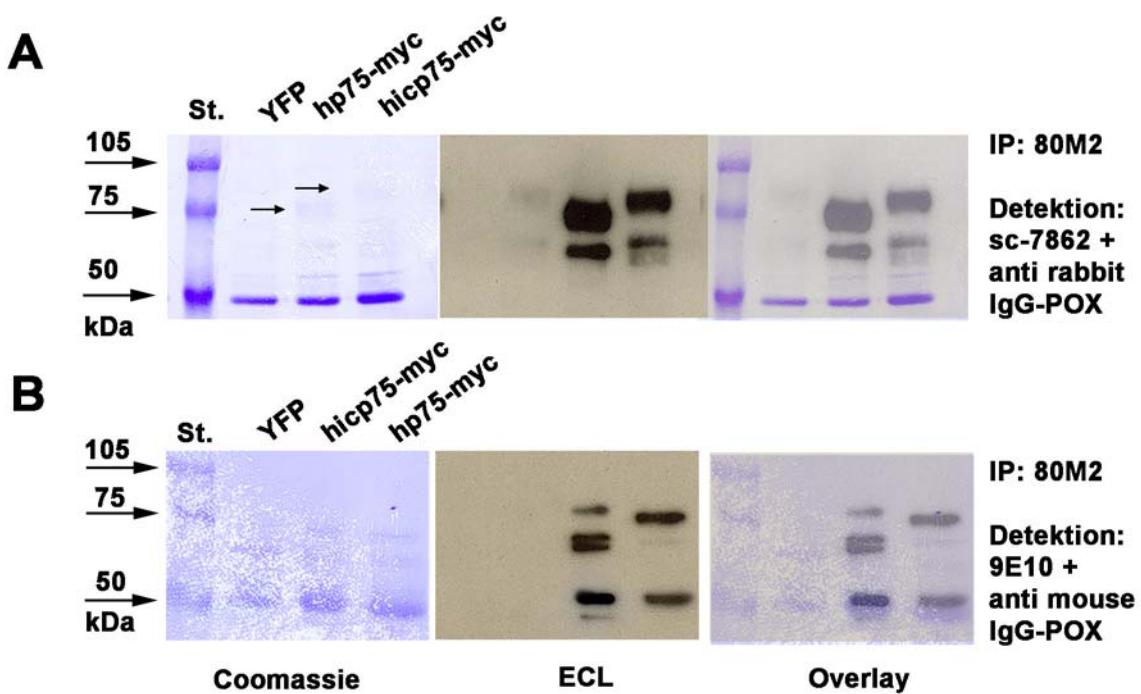


**Abb.17: Der Überstand von hicp75TNFR-Transduktanden zeigt Hemmwirkung im TNF-Zytoxizitäts-Assay.**

Die löslichen TNF-Rezeptoren sind in der Lage TNF zu komplexieren und zu neutralisieren. Im TNF-Zytotoxizitäts-Assay an L929-Zellen konnte gezeigt werden, dass löslicher hicp75TNFR im Überstand von hicp75TNFR Transduktanden bioaktiv ist und die Zytotoxizität von TNF kompetitiv hemmt. Als Kontrolle dienten der Überstand von YFP-transduzierten Zellen und unkonditioniertes Medium.

## 7. Biochemische Charakterisierung des hicp75TNFR-Proteins

Die beiden Isoformen des hp75TNFR unterscheiden sich kaum in der Länge ihrer mRNA. Wird mRNA des hp75TNFR translatiert, kodiert das Exon 1 für ein 22 Aminosäuren langes Signalpeptid, das im ER durch Signalpeptidasen entfernt wird. Das reife Protein ist somit rechnerisch ca. 3 kDa leichter als das translatierte Protein. Da im Falle des hicp75TNFR das Exon 1a keine bekannte Signalpeptid-Sequenz darstellt, sollte untersucht werden, ob diese Präsequenz ebenfalls von Signalpeptidasen geschnitten wird oder am reifen Peptid verbleibt. Verbleibt die Sequenz am reifen Protein, dann müsste das hicp75TNFR-Protein mindestens 3 kDa größer als das hp75TNFR-Protein sein.

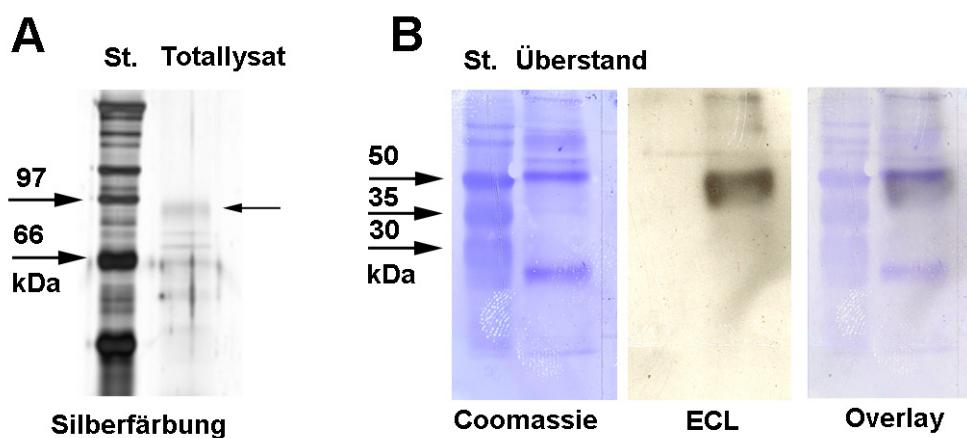


**Abb. 18: Bestimmung des Molekulargewichts des hicp75TNFR durch Immunpräzipitation.** Aus den Totallysaten von transduzierten L929-Zellen (A) und NIH 3T3-Zellen (B) wurde unter Verwendung spezifischer Antikörperpaare das jeweilige reife Protein durch IP isoliert und im Western-Blot detektiert (Gel: 8% SDS-PAGE; IP: Immunopräzipitation; ECL: enhanced chemolumineszenz; St: Standard)

Die Zelllysate von transduzierten L929-Zellen (Abb. 18A) und NIH3T3-Zellen (Abb. 18B) wurden mit einem Antikörper (80M2), der an die Extrazellulärdomäne beider hp75TNFR-Isoformen bindet, inkubiert. Durch Zugabe von Protein-G-Sepharose wurde der Antikörper-hp75TNFR-Proteinkomplex aus dem Lysat isoliert und durch SDS-PAGE-Elektrophorese aufgetrennt. Da für die Detektion Antikörper gegen die Intrazellulärdomäne bzw. das C-terminal gelegene myc-Epitop verwendet wurden, gelang es, das jeweilige reife Protein darzustellen.

Für das hp75TNFR-Protein zeigte sich in beiden Zelllinien die erwartete Bande bei 75 kDa, die dem Protein auch seinen Namen gibt. Es zeigten sich zusätzlich Banden bei ca. 65 kDa, die in der Literatur als weitere Glycosilierungsformen beschrieben werden (Corti, 1995, Pimentel-Muinos, 1999).

Das Protein, das aus beiden hicp75TNFR-transduzierten Zelllinien isoliert wurde, ist deutlich schwerer, und läuft bei ca. 85 kDa. Auch diese Isoform weist weitere leichtere Glycosilierungsstufen auf. Die 50 kDa-Bande, die sich bei den NIH 3T3-Zellen (Abb. 18B) zeigt, ist die schwere Kette des Maus-IgG1-Antikörpers (80M2), der bei der Immunopräzipitation verwendet wurde und im Western-Blot ebenfalls gefärbt wird. Die leichte Kette ist bereits aus dem Gel gelaufen. Da der Detektionsantikörper gegen das myc-Epitop ebenfalls von der Maus stammt, ergibt sich dieses Bandenmuster. Die YFP-Kontrollen zeigen in beiden Fällen keine Banden.



**Abb. 19: Affinitätsgereinigte hicp75TNFR-Proteinfragmente.** Aus dem Zelllysat hicp75TNFR transduzierter TNFR1/2 defizienten Fibroblasten (Wirbel-Zellen) wurde das reife Protein über die Bindung an immobilisiertes humanes TNF gereinigt. Auf dieselbe Weise wurde aus dem Überstand dieser Zellen die abgespaltene Extrazellulärdomäne des hicp75TNFR aufgereinigt. Bei beiden Fragmenten wurden mittels SDS-PAGE und geeigneter Längenstandards das jeweilige Molekulargewicht ermittelt. (A: 8%; B: 12%; IP: Immunopräzipitation; ECL: enhanced chemolumineszenz; St: Standard).

Da Wirbel-Zellen aus Mäusen stammen, die keine TNF-Rezeptoren exprimieren sollten diese Zellen nach Transduktion mit hicp75TNFR nur ein einziges TNF-bindendes Protein besitzen. Um die errechneten 85kDa für das reife hicp75TNFR-Protein nochmal in einer weiteren Zelllinie und durch eine andere Methode zu bestätigen, wurde aus dem Zelllysat dieser Zellen der Rezeptor durch Bindung an den immobilisierten Liganden TNF aufgereinigt. Die Silberfärbung des Polyacrylamid-Gels und die Verwendung eines geeigneten Längenstandards zeigen ebenfalls ein Molekulargewicht von ca. 85 kDa (Abb. 19A).

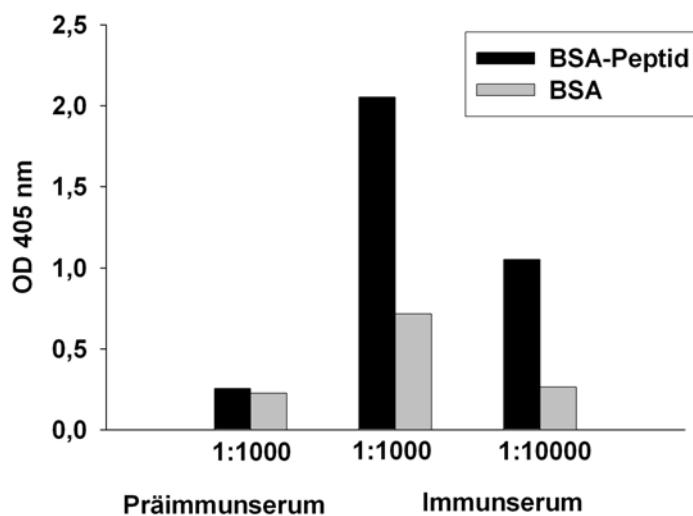
Mit Hilfe der „human-TNF-Säule“ gelang es ebenfalls die gesheddete Extrazellulärdomäne des hicp75TNFR aus dem Überstand der transduzierten Wirbel-Zellen aufzureinigen (Abb. 19B). Diese zeigt nach Detektion mit einem spezifischen Antikörper und ECL-Entwicklung eine distinkte Bande bei 50 kDa wohingegen sich aus der Literatur für die Extrazellulärdomäne des hp75TNFR 40 kDa ergibt (Kohno, 1990, Pennica, 1992). Diese Daten zeigen, dass die Präsequenz des hicp75TNFR, die von Exon 1a codiert wird, am reifen Protein verbleibt was sich in einer Zunahme des Molekulargewichts um 10 kDa widerspiegelt. Da die zusätzlichen 22 Aminosäuren jedoch rechnerisch nur 3 kDa beitragen sind zusätzliche Glykosilierungen an Threonin 7 und Serin 11 wahrscheinlich. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die leichteren, aus dem Zelllysat isolierten, volle-Länge-Rezeptoren unvollständig glycosilierte Vorstufen im Golgi-Apparat sind, da sich im Überstand nur eine distinkte reife Form nachweisen ließ.

## **8. Herstellung monoklonaler Antikörper gegen die Präsequenz des hicp75TNFR**

Durch die biochemische Charakterisierung des hicp75TNFR konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Präsequenz am reifen Peptid verbleibt. Somit bietet sich neben der mRNA-Ebene auch auf Protein-Ebene die Möglichkeit beide Isoformen des hp75TNFR zu unterscheiden, vorausgesetzt man besitzt spezifische Antikörper. Da die verfügbaren Antikörper gegen hp75TNFR auch immer den hicp75TNFR erkennen, sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, monoklonale Antikörper gegen die Präsequenz des hicp75TNFR zu erzeugen.

## 8.1 Immunisierung und Fusion

Eine Maus wurde, wie unter B:2.7.1 beschrieben, dreimal mit der synthetisch hergestellten Präsequenz des hcip75TNFR immunisiert. Mit Hilfe eines ELISAs wurden im Serum der Maus Antikörper gegen das immunisierte Antigen festgestellt (Abb. 20). Als Spezifitätskontrolle dienten das Präimmunserum der Maus und BSA als Carrier des an die Mikrotiterplatte gebundenen Peptids. Milzzellen der in Abb. 20 untersuchten Maus wurden wie unter B:2.7.5 zur Zellfusion verwendet.



**Abb. 20: Nachweis spezifischer Antikörper gegen das von Exon 1a codierte Peptid im Serum einer immunisierten Maus.** Um eine höhere Affinität des Antigens zur Oberfläche der Wells zu erreichen wurde das Peptid kovalent an BSA gekoppelt. BSA bzw. BSA-Peptid wurde in die Wells gecoatet und mit Immun- bzw. Präimmunserum versetzt. Gebundene Antikörper wurden mit anti-Maus-Peroxidase-Antikörpern und anschließender Substratumsetzung detektiert.

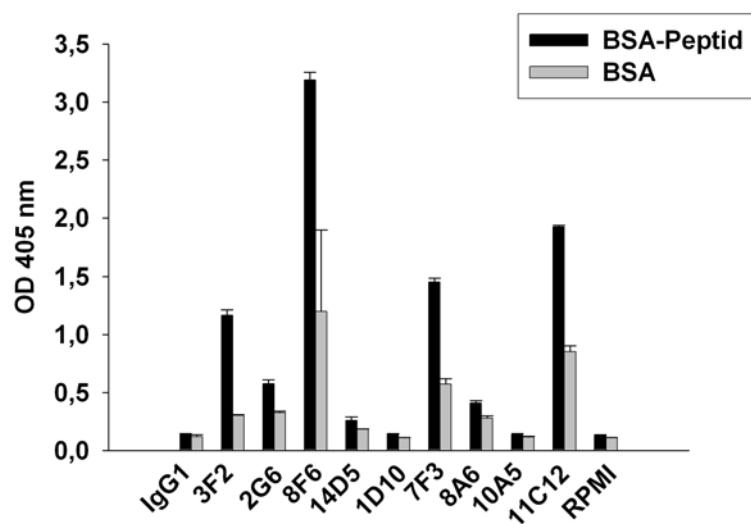
## 8.2 Stabil etablierte anti-Exon 1a-Peptid-Antikörper produzierende Hybridome

Etwa zwei Wochen nach der Zellfusion wuchsen in 266 Kulturen der insgesamt 15 Mikrotiterplatten Hybridome, die mittels ELISA auf anti-Exon 1a-Peptid-Antikörper Produktion getestet wurden. Mindestens dreimal positiv getestete Klone wurden subkloniert und schrittweise an das RPMI-Medium ohne Zusatz von Hypoxanthin und Thymidin gewöhnt.

Von den neun verbliebenen positiven Hybridomen wurde der jeweilige Isotyp des produzierten Antikörpers durch ELISA bestimmt (Abb. 21).

Bezeichnung	Ig-Isotyp
1D10	IgM
2G6	IgG2a
3F2	IgG1
7F3	IgG2a
8A6	IgM
8F6	IgG1
10A5	IgG2b
11C12	IgM
14D5	IgM

**Abb. 21: Übersicht über die stabil etablierten anti-Exon 1a-Peptid-Antikörper produzierenden Hybridome.** Nachdem die Antikörper an BSA-Peptid gebunden hatten wurden sie mit spezifischen Antikörpern gegen die schwere Kette der unterschiedlichen Isotypen detektiert.

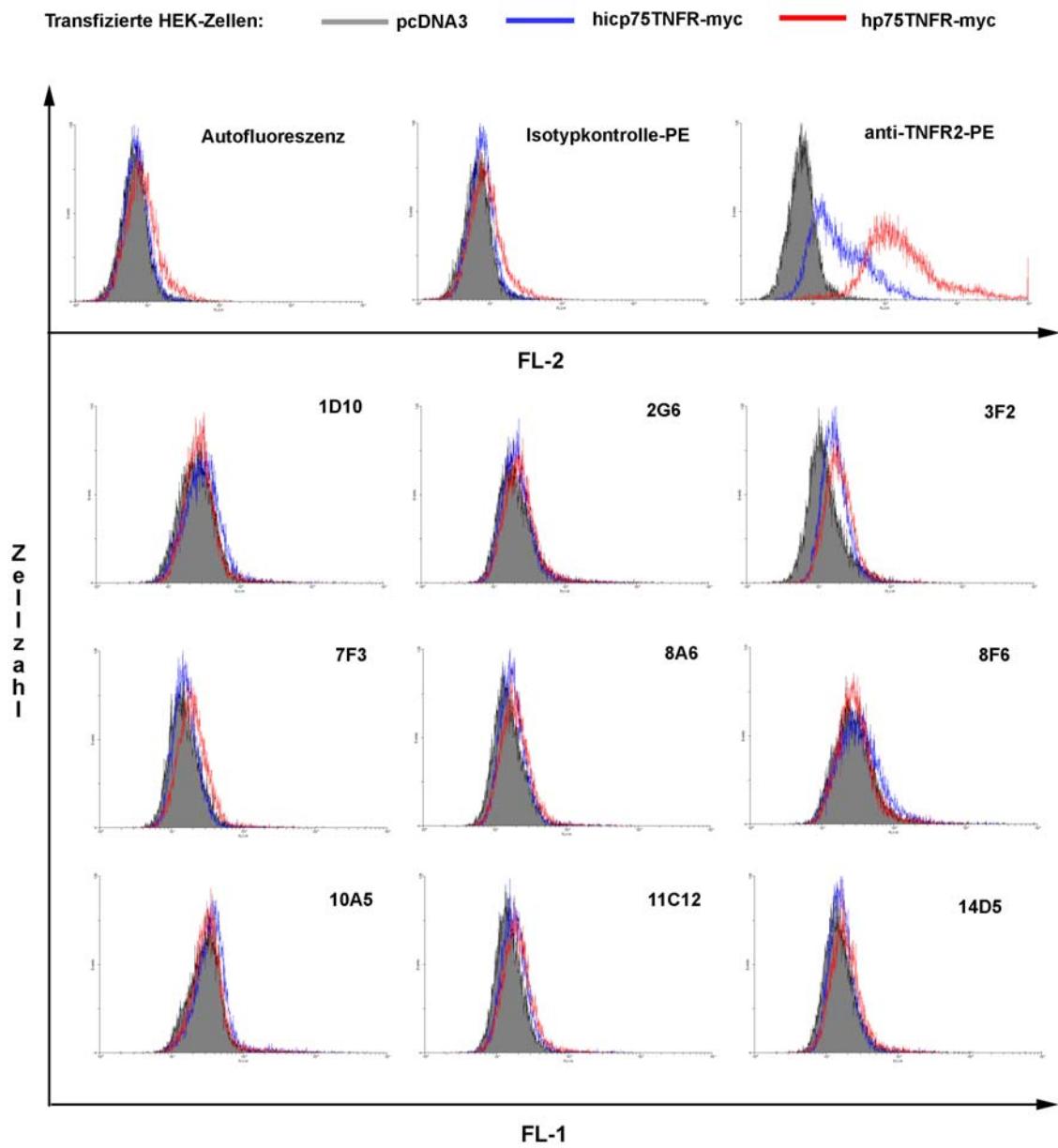


**Abb. 22: Spezifität der von den Hybridomen sezernierten Antikörper.** BSA bzw. BSA-Peptid wurde in die Wells gecoatet und mit den Überständen der Hybridome versetzt. Gebundene Antikörper wurden mit anti-Maus-Peroxidase-Antikörpern und anschließender Substratumsetzung detektiert.

Abbildung 22 zeigt in einer Übersicht die Peptidspezifität der generierten Antikörper. IgG1 und RPMI-Medium, sowie gecoatetes BSA alleine dienten als Negativkontrollen. Die von den Hybridomen sezernierten Antikörper binden spezifisch an das von Exon 1a codierte Peptid, mit dem die Maus immunisiert worden war. Der geringere Unterschied der Bindung an BSA-Peptid im Vergleich zu BSA alleine zeigt darüber hinaus, dass die Epitop-Spezifität der vier IgM's nicht so hoch ist wie die der IgG's. Im weiteren Verlauf wurden jedoch alle Antikörper näher charakterisiert.

### 8.3 Detektion des Peptids als Präsequenz des hicp75TNFR

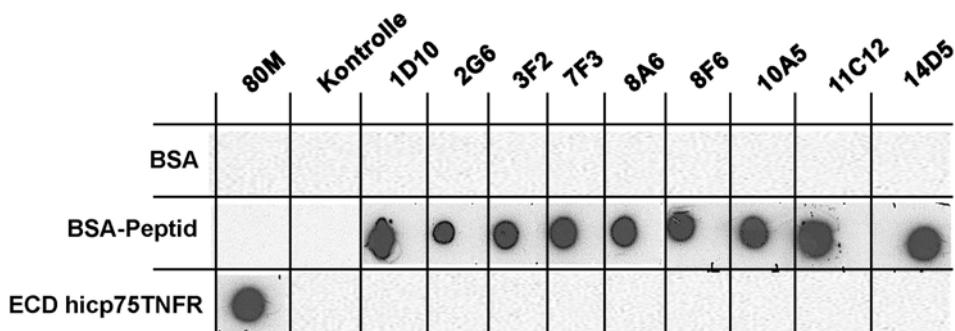
#### 8.3.1 Natives Protein



**Abb. 23:** Erkennung des nativen Epitops auf transfizierten HEK 293T-Zellen durch die monoklonalen Antikörper. Nachdem durch einen spezifischen anti-human-TNFR2-PE Antikörper durchflusszytometrisch gezeigt wurde, dass die transfizierten Zellen die jeweilige Isoform auf der Zellmembran exprimieren (oben rechts), wurden die Zellen mit den Überständen der Hybridome inkubiert. Die an die Oberfläche der Zellen gebundenen Antikörper wurden durch einen FITC-konjugierten anti-Maus-Antikörper detektiert

Nachdem spezifische monoklonale Antikörper gegen die Präsequenz des hicp75TNFR im ELISA zur Verfügung standen, sollte untersucht werden, ob diese an die Peptidsequenz binden wenn dieses das N-terminale Ende des reifen nativen Rezeptors bildet. Als Testsystem konnte die Durchflusszytometrie verwendet werden, da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, dass hicp75TNFR ebenfalls auf der Zelloberfläche detektierbar ist. Transfizierte HEK-Zellen trugen jeweils die eine der beiden hp75TNFR-Isoformen wie die Kontrollfärbung mit dem Phycoerythrin (PE)-konjugierten, spezifisch gegen den humanen p75TNFR gerichteten Antikörper zeigt (Abb. 22 rechts oben). Als Negativkontrolle dienten HEK-Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert waren. Wenn die Antikörper in den Hybridomüberständen an die Präsequenz des hicp75TNFR binden, sollte sich nach Inkubation mit einem FITC-konjugierten Zweitantikörper ausschließlich für die hicp75TNFR transfizierte Zelllinie (blauer Peak) ein Shift im Kanal 1 (FL-1) ergeben. Da keiner der Überstände das erwartete Signal lieferte, muss davon ausgegangen werden, dass die Antikörper das Peptid bzw. die Präsequenz als Bestandteil des nativen Rezeptors nicht erkennen.

### 8.3.2 Reduziertes Protein



**Abb. 24: Erkennung des hicp75TNFR durch die generierten Antikörper im Dot-Blot-Verfahren.** Jeweils 1 $\mu$ g BSA, BSA-Peptid und affinitätsgereinigte Extrazellulärdomäne (ECD) des hicp75TNFR wurden, nach Spaltung der Disulfidbrücken, auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht. Gebundene Antikörper wurden durch Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper und anschließender Chemolumineszenz-Reaktion detektiert.

Um die Möglichkeit zu testen, ob durch die 3D-Struktur des Rezeptors das Epitop maskiert wird, wurde die aufgereinigte Extrazellulärdomäne des hicp75TNFR (siehe Abb.19) durch Aufkochen mit Mercaptoethanol reduziert und auf eine Nitrocellulose-Membran

aufgebracht (Abb.24). Als Kontrollen wurden ebenfalls BSA und an BSA gekoppeltes Peptid aufgetragen (Dot Blot). Die Membranen wurden anschließend mit den Hybridomüberständen inkubiert. Durch Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper und Chemolumineszenz-Reaktion wurden gebundene Antikörper detektiert. Die Antikörper zeigten keine Reaktion mit BSA, wohl aber mit dem an BSA gekoppeltem Peptid. Dies unterstreicht erneut die Spezifität der Antikörper. Die Extrazellulärdomäne des hicp75TNFR wird von der Positivkontrolle 80M, einem polyklonalen Kaninchenserum gegen den humanen p75TNFR, detektiert. Die dazugehörige Negativkontrolle, das Präimmunserum des Kaninchens, bindet dagegen nicht. Für die Hybridomüberstände konnte auch in diesem Testsystem keine Bindung an den in diesem Fall reduzierten hicp75TNFR festgestellt werden.

## 9. Untersuchungen zur Ligand-Rezeptor-Interaktion

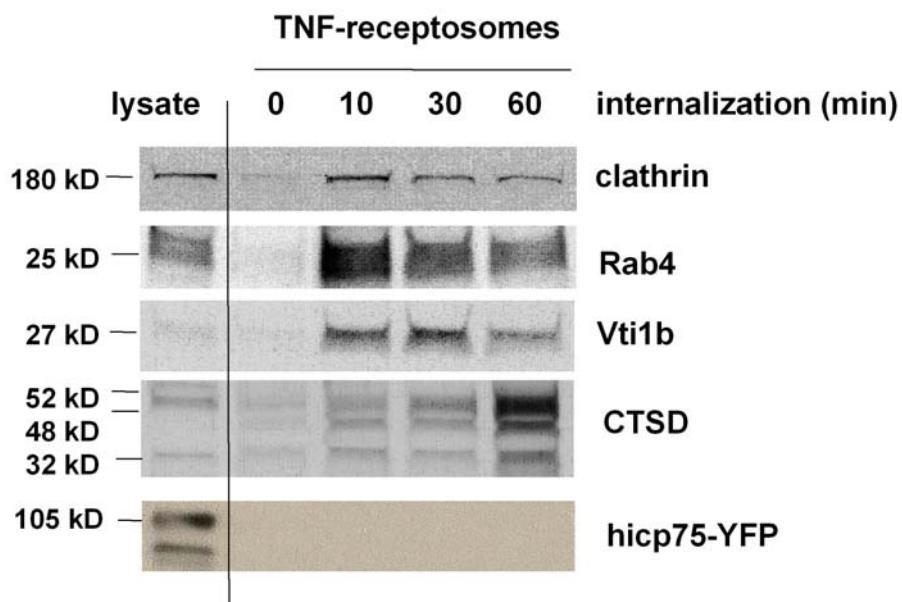
Die Daten aus dem Abschnitt „subzelluläre Lokalisierung“ zeigen, dass der hicp75TNFR überwiegend im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert ist. Es stellte sich die Frage, ob in diesem Kompartiment eine Rezeptor-Ligand-Interaktion stattfinden kann und wenn ja, ob exogenes bzw. internalisiertes und/oder endogenes TNF den hicp75TNFR aktivieren kann.

### 9.1 Aktivierung des hicp75TNFR durch exogenes TNF

Durch Bindung von TNF an den p55TNFR wird der Rezeptor-Ligand-Komplex internalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass biotinyliertes TNF trotz Bindung an Streptavidin-beschichtete magnetische Beads bioaktiv ist und die Rezeptosomen-Internalisierung auslöst (Schneider-Brachert, 2004). Durch das Einbringen einer magnetischen Komponente in die Rezeptosomen konnten nun diese in einer Magnetkammer von den übrigen Zellbestandteilen getrennt und auf die Protein Zusammensetzung hin untersucht werden.

An L929-Zellen, die nach Transduktion den hicp75TNFR-YFP exprimierten, wurde die Rezeptosomen-Reifung verfolgt, um zu klären, ob hicp75TNFR Moleküle des TGN's in diese Rezeptosomen gelangen und möglicherweise das internalisierte TNF an den hicp75TNFR weitergereicht wird. Anhand der Markerproteine (Abb. 25) konnte der Zustand und die Lokalisierung der Rezeptosomen verfolgt werden. Nach 10 min ist die Endozytoserate maximal, sichtbar an Hand der frühen Endozytosemarker Clathrin und

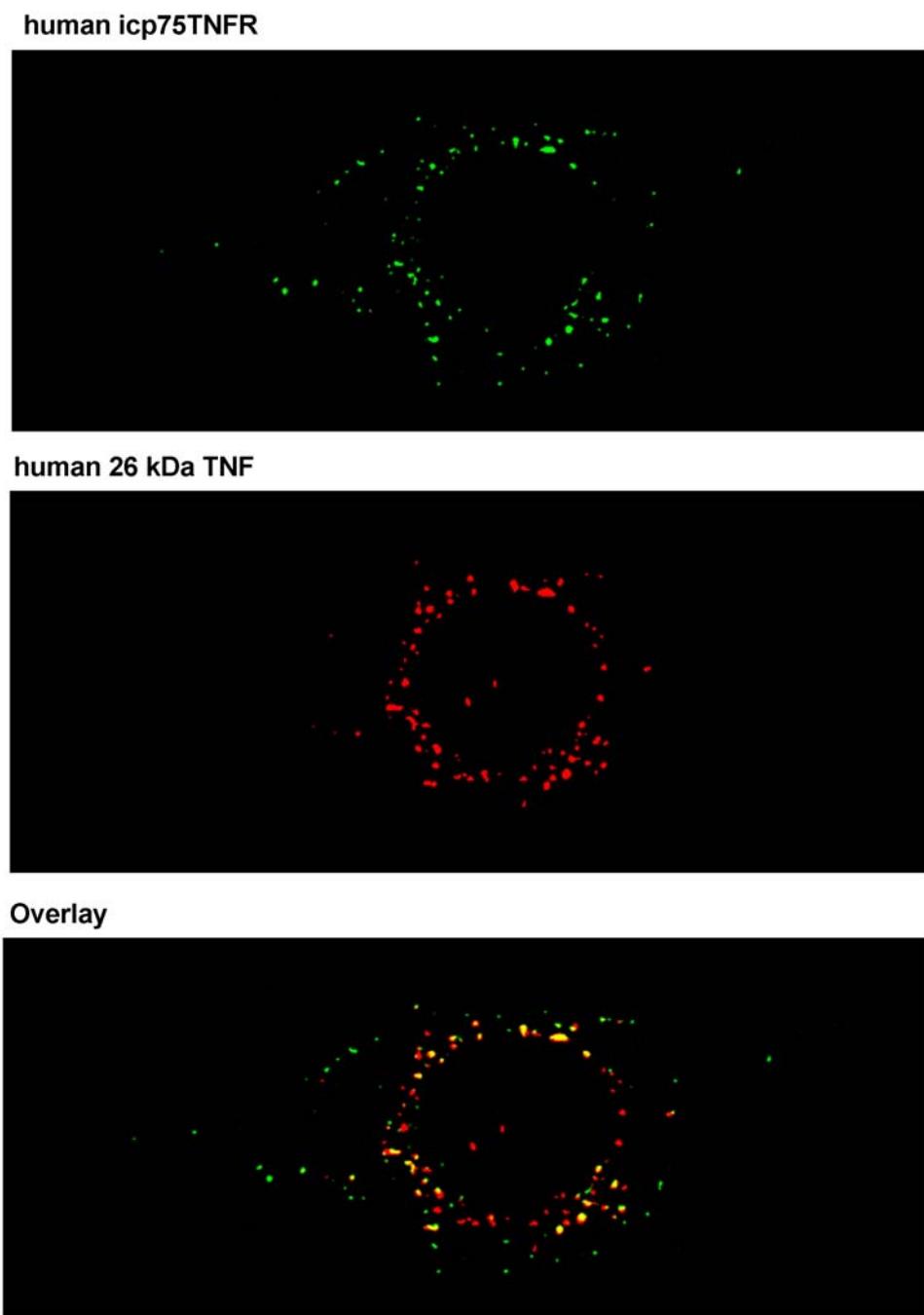
Rab4. Nach 30 min fusioniert der Großteil der Rezeptosomen mit Vesikeln des TGN, sichtbar durch maximale Anreicherung des Proteins Vti1. Hier befindet sich der kritische Punkt eines möglichen „Ligand-passings“. Da in keiner der Fraktionen hicp75TNFR nachgewiesen werden konnte, kann man davon ausgehen, dass exogenes TNF nicht an hicp75TNFR-Moleküle im TGN weitergereicht werden. Das Maximum von Cathepsin D nach einer Stunde deutet die Fusion der Rezeptosomen mit den Lysosomen an, in denen die Proteine degradiert und recycled werden.



**Abb. 25: Untersuchung zur möglichen Aktivierung des hicp75TNFR durch exogenes TNF.** L929-Zellen die nach Transduktion hicp75TNFR exprimierten, bzw. das Lysat der Zellen, wurden mit biotinyliertem TNF und Streptavidin-beschichteten magnetischen Beads inkubiert. Rezeptosomen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten magnetisch isoliert und durch SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert.

## 9.2 Aktivierung des hicp75TNFR durch endogenes TNF

Die Aktivierung des hicp75TNFR durch endogenes TNF erscheint durchaus möglich, da beide Proteine in TNF-produzierenden Zellen, wie z.B. Makrophagen nachgewiesen wurden. Um diese Option zu untersuchen, wurden L929-Zellen, die bereits humanes 26 kDa TNF exprimieren, mit hicp75TNFR-myc transduziert. Ligand und Rezeptor wurden immunhistochemisch mit unterschiedlich markierten Antikörpern gefärbt, geschichtet und EPR-berechnet. Eine Kolokalisierung der beiden Proteine in intrazellulären Kompartimenten konnte nachgewiesen werden.



**Abb. 26: Untersuchung zur möglichen Aktivierung des hicp75TNFR durch endogenes TNF.** L929-Zellen, die sowohl hTNF als auch hicp75TNFR exprimieren, wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. TNF wurde mit polyklonalen Kaninchen-anti-human-TNF-Antikörpern detektiert. Der Sekundärantikörper war TRITC-konjugiert. Die hicp75TNFR-Moleküle wurden mit dem monoklonalen Antikörper 80M2 und FITC-konjugiertem Sekundärantikörper gefärbt.

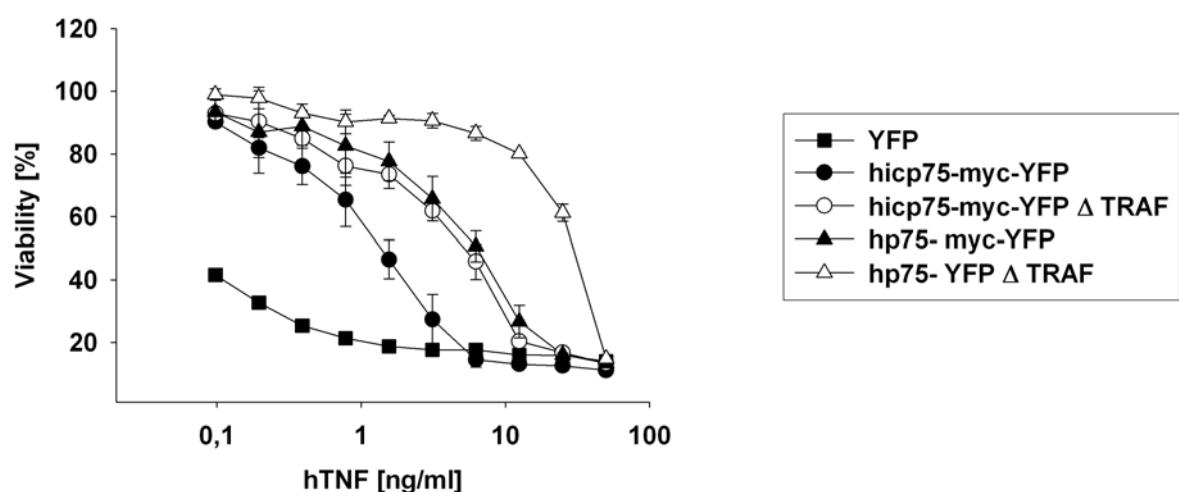
## 10. Untersuchungen zur Funktion des hicp75TNFR

Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Überexpression des hicp75TNFR Zellen vor der TNF-Zytotoxizität geschützt waren (Dissertation C. Seitz). Um diese Beobachtung weiter zu untersuchen, wurden verschiedene transduzierte Zelllinien hergestellt und im TNF-Zytotoxizitäts-Assay auf ihre TNF-Sensitivität getestet.

### 10.1 Gesortete, transduzierte L929-Zelllinien im TNF-Zytotoxizitäts-Assay

Durch Transduktion wurden Zelllinien hergestellt, die entweder den hicp75TNFR oder den hp75TNFR tragen. Darüber hinaus wurden beide Isoformen mit deletierter TRAF2-Bindedomäne exprimiert, um Signalling-abhängige Prozesse verfolgen zu können. Da alle Rezeptorkonstrukte als YFP-Fusionsproteine exprimiert wurden, war es möglich, die Zellen durch Zellsortierung auf die gleiche Rezeptormenge zu normieren, um Effekte, die sich durch einen unterschiedlichen Rezeptorstatus ergeben, von vornherein auszuschließen. Die YFP-exprimierende Zelllinie diente in allen Fällen als Kontrolle.

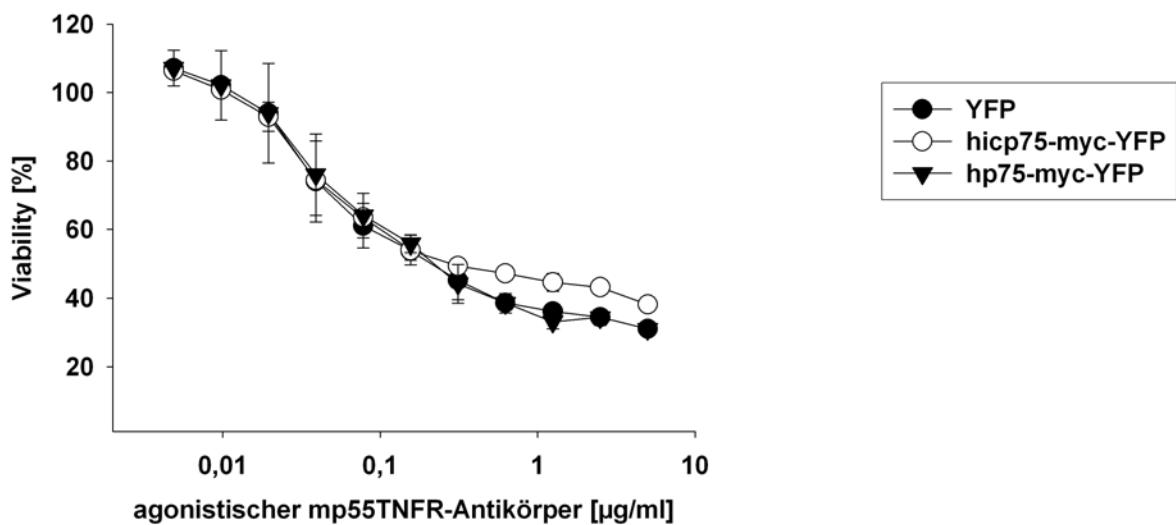
Beide hp75TNFR-Isoformen schützen die Zellen vor TNF-Zytotoxizität (Abb. 27), wobei die Protektion durch den hp75TNFR die des hicp75TNFR noch übertrifft. Die dazugehörigen jeweiligen  $\Delta$ TRAF-Mutanten sind den volle-Länge-Rezeptoren überlegen.



**Abb. 27: Auf gleiche YFP-Rezeptorproteinexpression sortierte L929-Transduktanden im TNF-Zytotoxizitäts-Assay.** Die stabil transduzierten Zelllinien wurden über Nacht mit hTNF und 2 $\mu$ g/ml Actinomycin D inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Viabilität im MTT-Test quantifiziert.

## 10.2 Induktion des Zelltods durch einen agonistischen Antikörper gegen p55TNFR

TNF induziert den Zelltod durch die Bindung an den Todesrezeptor p55TNFR. Wird der Zelltod nicht durch TNF sondern durch einen agonistischen Antikörper gegen den p55TNFR induziert, ist in keiner Zelllinie ein Schutz zu beobachten (Abb. 28).

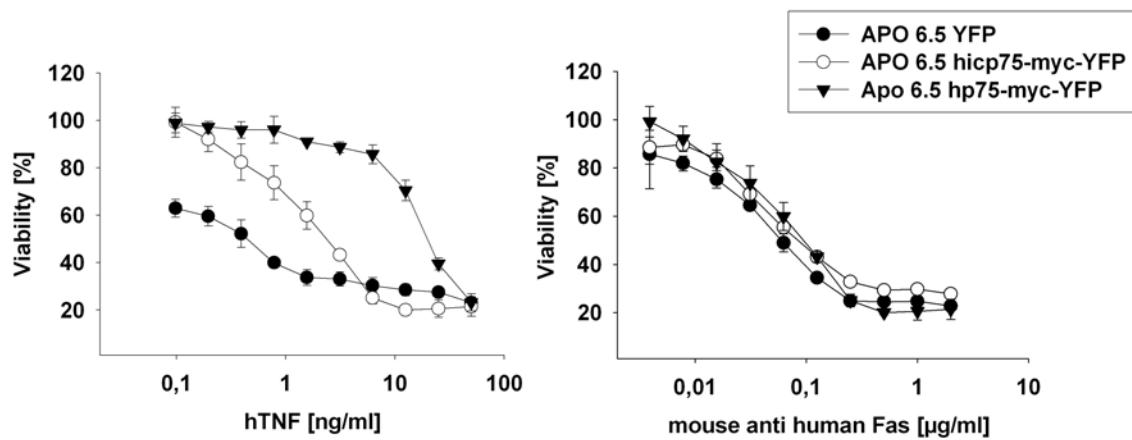


**Abb. 28: Induktion des Zelltods durch einen agonistischen Antikörper.** Die stabil transduzierten, sortierten Zellen wurden über Nacht mit agonistischen anti-Maus-p55TNFR-Antikörpern und 2 $\mu$ g/ml Actinomycin D inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Viabilität im MTT-Test quantifiziert.

## 10.3 Induktion des Zelltodes durch Aktivierung von FAS .

Die Versuche an human FAS-positiven L929 Zellen vervollständigen das Bild. Werden diese Zellen (Abb. 29) mit einer der beiden p75TNFR-Isoformen transduziert, zeigt sich wiederum ein Schutz gegenüber der TNF-vermittelten-Zytotoxizität. Wird der Zelltod jedoch durch FAS, einem weiteren Todesrezeptor aus der TNF-Rezeptor-Superfamilie, induziert, ist keine Hemmung der Toxizität zu beobachten.

Der Schutzeffekt beider hp75TNFR-Isoformen ist somit streng auf den TNF-induzierten-Zelltod beschränkt und TRAF-unabhängig.



**Abb. 29: Induktion des Zelltodes durch Aktivierung von FAS .** Die stabil transduzierten Zelllinien wurden über Nacht mit einem agonistischen anti-human-FAS-Antikörper und 2 $\mu$ g/ml Actinomycin D inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Viabilität im MTT-Test quantifiziert.

## D. Diskussion

TNF steht als pleiotropes Zytokin oft im Mittelpunkt inflammatorischer Prozesse und vermittelt seine biologische Aktivität über zwei Transmembranrezeptoren, die in ihrer Funktion weitgehend charakterisiert sind. Die Möglichkeit des alternativen Splicens ermöglicht einem Organismus aus einem Gen mehrere unterschiedliche Proteine zu machen. Bringt die neu erworbene Alternative eines Proteins einen Vorteil im evolutiven Wettstreit, wird sie beibehalten und findet ihren Platz im Gesamtreertoire. Da die in dieser Arbeit beschriebene Isoform des humanen p75TNFR auf eine interessante genomische Entstehungsgeschichte verweisen kann (Singer, 2004) und ein weiterer Rezeptor für ein derart zentrales Molekül wie TNF von grundlegender Bedeutung sein könnte, wurde die Untersuchung der Aktivierung und Lokalisierung sowie der biochemischen Eigenschaften und möglicher Funktion des hicp75TNFR in den Mittelpunkt dieser Arbeit gestellt.

### 1. Lokalisierung der neuen hp75TNFR-Isoform

Das alternativ gespligte mRNA-Transkript des hicp75TNFR unterscheidet sich in der 5' untranslatierten Region (5'UTR) von der bereits bekannten p75TNFR mRNA und besitzt darüber hinaus ein alternatives erstes Exon (Exon1a). Bei den meisten Vertretern der TNFR-Superfamilie codiert das erste Exon für ein Signalpeptid, das die Proteine als plasmamembranständig ausweist. Die Rezeptoren werden während der Synthese am rauen ER aufgrund der hydrophoben Aminosäuresequenz, die die Transmembrandomäne bildet, in die Membran translociert und bleiben somit immer an Zellmembranen gebunden. Die so verankerten Proteine erreichen in Vesikeln den Golgi-Apparat, in dem die spätere Extrazellulärdomäne durch Zuckerreste modifiziert wird. Der Transport durch das Trans-Golgi-Netzwerk erfolgt auf Grund des N-terminalen Sortiersignals schnell und zielgerichtet zur Plasmamembran, dem eigentlichen Bestimmungsort der Rezeptoren (Alberts, 1995).

Da Exon 1a nicht für ein bekanntes Signalpeptid codiert (Seitz, 2001) stellt sich die Frage wie sich diese Isoform während und nach der Biosynthese hinsichtlich der Lokalisierung verhält. Erste Versuche mit myc-markierten Rezeptorkonstrukten zeigten eine intrazelluläre Anreicherung des Proteins. Durch die Generierung eines hicp75TNFR Fusionsproteins mit dem „yellow fluorescent protein“ (YFP) und fluoreszenzmikroskopischer Analyse

gegengefärbter Kompartimente gelang es, das intrazelluläre Verteilungsmuster des hicp75TNFR genau aufzukären.

Für Proteine mit einem KDEL-Motiv ist bekannt, dass sie im ER zurückgehalten werden (Teasdale, 1996). Der hicp75TNFR weist diese Sequenz nicht auf und enthält, wie Abbildung 6 zeigt, auch kein anderes unbekanntes ER-Retentionssignal. Die biochemische Analyse des hicp75TNFR-Proteins (Abb.18) zeigt eindeutig Glycosilierung und Glycosilierungsvorstufen, was in Verbindung mit den mikroskopischen Daten (Abb.6) ein Durchqueren des Golgi-Apparates belegt, da in diesem Kompartiment Glycosilierungen stattfinden (van Vliet, 2003).

Aufgrund der Literatur wurden zwei weitere Kompartimente als mögliche Aufenthaltsorte des hicp75TNFR untersucht, obwohl die hierfür bekannten Sortiersignale in der Sequenz des hicp75TNFR nicht auftauchen. Zum einen könnte internalisiertes TNF in Lysosomen, in denen es degradiert wird (Mosselmans, 1988), den Rezeptor aktivieren. Ebenso könnte das TNF-bindende Protein, das in den Mitochondrien beschrieben wurde (Ledgerwood, 1998), der icp75TNFR sein. In beiden Fällen konnte jedoch keine Kolokalisierung beobachtet werden (Abb. 8 und 9).

Die Überlagerung der hicp75TNFR-Signale mit endosomal angereichertem „cyan-fluorescent-protein“ vervollständigt des Bild des intrazellulären icp75TNFR-Färbemusters (Abb. 10) und identifizieren den Großteil der Rezeptor-positiven Färbung als abgeschnürte Vesikel des Trans-Golgi-Netzwerks. Diese Vesikel stellen jedoch kein statisches Kompartiment dar, sondern dienen als Carrier von Membranproteinen und als Bestandteil des zellulären Membranflusses (van Vliet, 2003). In der Tat konnte in Zeitrafferaufnahmen von hicp75TNFR-YFP-transduzierten Zellen die Wanderung dieser Vesikel zur Plasmamembran beobachtet werden. Dort verliert sich das Signal auf Grund der Rezeptordiffusion in der Membran, passend zu anderen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, in denen keine membranständigen hicp75TNFR-Moleküle nachgewiesen werden konnten.

Betrachtet man fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des hp55TNFR zeigt sich erstaunlicherweise für diesen gut charakterisierten, membranständigen Rezeptor ein Expressionsmuster, das ähnlich dem des hicp75TNFR ist, sprich perinukläre, trans-Golgi-Netzwerk-Anreicherung und ebenfalls keine Membranfärbung (Bradley, 1995, Jones, 1999). Die niedrige Sensitivität der Mikroskopie und der Fluoreszenzmikroskopie im Besonderen wird somit als Nachteil deutlich.

Um die möglicherweise geringe Membranexpression des hicp75TNFR zu untersuchen, wurde die Durchflusszytometrie angewandt. Diese Methode ist insofern sensitiver, da das Fluoreszenzsignal eines markierten Antikörpers oder eines YFP-Fusionsproteins durch einen Photomultiplier verstärkt wird, und somit Antigene oder Signale mit geringer Dichte nachgewiesen werden können. Tatsächlich ließen sich Moleküle des transfizierten oder retroviral transduzierten hicp75TNFR auf der Oberfläche verschiedener Zelllinien nachweisen (Abb. 11 und 12). Die Anzahl ist jedoch im Vergleich zu hp75TNFR-exprimierenden Zellen, wie erwartet, deutlich geringer, da ja im Mikroskop für den hp75TNFR eine deutlich ausgeprägte, über dem Detektionslimit liegende Membranfärbung sichtbar ist, während der hicp75TNFR in diskreten Vesikeln in perinukleären Bereichen gesehen wurde (Abb. 5).

Nach Betrachtung aller Daten hinsichtlich der Lokalisierung der neuen hp75TNFR-Isoform zeigen sich Parallelen zu anderen Rezeptoren der TNFR-Superfamilie. So besitzen zum Beispiel die drei Rezeptoren, an die das Zytokin BAFF bindet, nämlich BAFF-Rezeptor, BCMA und TACI sowie der Zytokinrezeptor XEDAR ebenfalls kein erkennbares N-terminales Signalpeptid und fungieren dennoch als Membranrezeptoren in wichtigen immunologischen Prozessen. Diese Ausnahmen werden auch auf Grund dieser Charakteristik im Gegensatz zu den übrigen TNFR-Superfamilienmitgliedern, die Typ-I-Membranproteine darstellen, als Typ-III-Membranproteine bezeichnet (Bodmer, 2002).

Studien am Transferrin-Rezeptor (CD71), einem Protein das ebenfalls kein N-terminales Signalpeptid aufweist und dennoch in der Zytoplasmamembran lokalisiert ist, zeigen, dass alleine das Vorhandensein einer hydrophoben Transmembrandomäne ausreicht, um ein Protein in die ER-Membran zu translocieren. Ist das Protein einmal verankert, folgt es dem Membranfluss zum Golgi-Apparat, und wird durch den permanenten Membran-Turnover passiv zur Zellmembran transportiert. Der größte Teil des Transferrin-Rezeptors findet sich somit analog zum hicp75TNFR in Vesikeln des trans-Golgi-Netzwerks, und nur ein geringer Anteil tritt als funktioneller Rezeptor der Zytoplasmamembran in Erscheinung (Prinz, 2003, Zerial, 1986).

## 2. Untersuchung des löslichen hicp75TNFR

Für die Entstehung löslicher Rezeptoren der TNFR-Superfamilie gibt es mehrere Möglichkeiten. Zum einen können durch proteolytische Prozesse an der Zellmembran die jeweiligen Extrazellulärdomänen der Rezeptoren vom Rest des Moleküls proteolytisch abgespalten werden. Dies wird für CD27, CD30 und beide TNF-Rezeptoren beschrieben (Gruss, 1995). Des weiteren können durch alternative Splicevorgänge, wie bereits in A: 4.2 beschrieben, direkt lösliche Rezeptoren ohne hydrophoben Membrananker generiert werden. Eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigt eine Variante auf, bei der volle-Länge-p55TNFR über sogenannte Exosomen ins menschliche Serum und in den Überstand humaner Lungenepithezelzen gelangen konnten (Hawari, 2004).

Die Detektion löslicher hicp75TNFR-Moleküle in den Überständen transduzierter Zelllinien (Abb. 13) kann als logische Konsequenz der nachgewiesenen Membranexpression (Abb. 11 und 12) gewertet werden, da der Rezeptor dort für Proteasen der ADAM-Familie zugänglich ist und sich von dem Substrat hp75TNFR nicht unterscheidet. Es verwundert somit nicht, dass die hauptsächlich für hp75TNFR-Abspaltung verantwortliche Protease TACE, auch bekannt unter der Bezeichnung ADAM 17, auch beim Prozessieren des hicp75TNFR eine entscheidende Rolle (Abb. 15) spielt. Die beiden Isoformen sind im Bereich der Cleavage-Domäne, im Bereich um Valin 114 (Hooper, 1997), absolut identisch.

TACE wird als inaktives Proenzym synthetisiert, indem die N-terminale Prodomäne mit einem ungepaarten Cystein an das zentrale  $Zn^{2+}$ -Ion der katalytischen Domäne bindet und diese hierdurch effektiv blockiert. Eine proteolytische Spaltung zwischen Prodomäne und katalytischer Domäne durch Serin-Proteasen ermöglicht einen so genannten „Cystein-switch“-Mechanismus, der schließlich zur Aktivierung der Protease führt. Die membranständige Form von ADAM-17 / TACE besitzt die Furin-Erkennungssequenz R-X-K/R-R zwischen ihrer Prodomäne und der katalytischen Domäne. Diese ermöglicht die Aktivierung dieser Proteasen durch furinähnliche Proprotein-Convertasen bereits in der Zelle auf dem sekretorischen Weg (Black, 1997, Moss, 1997). Im Falle der Prozessierung des hicp75TNFR konnte durch Blockade von Serin-Proteasen und Furin im Speziellen gezeigt werden, dass das beobachtete Shedding-Ereignis TACE-abhängig und induzierbar (Abb. 15 und 16) ist. Hinsichtlich der upstream beteiligten Proprotein-Convertasen unterscheidet sich das beobachtete Shedding ebenfalls nicht von dem hp75TNFR-Shedding.

Da, wie bereits diskutiert, in äquivalent transduzierten Zellen weniger hicp75TNFR als hp75TNFR auf der Plasmamembran exprimiert wird, steht der Protease TACE weniger Substrat zur Verfügung. Dies erklärt die niedrigeren löslichen Rezeptor-Level im Überstand von hicp75TNFR-Transduktanden (Abb. 16) und zeigt im Umkehrschluss, dass die Mehrzahl der intrazellulär lokalisierten hicp75TNFR-Moleküle im Gegensatz zu den vornehmlich membranständigen hp75TNFR-Molekülen dem Shedding-Prozess entzogen sind.

Weiterhin weist das apparette Molekulargewicht des gereinigten, löslichen hicp75TNFR-Moleküls dieses eindeutig als abgespaltene Extrazellulärdomäne aus (Abb. 19). Eine Freisetzung des volle-Länge-Proteins, wie für den hp55TNFR beschrieben (Hawari, 2004), kann ausgeschlossen werden.

Lösliche Zytokinrezeptoren wirken meist als Inhibitoren, indem sie das Zytokin binden und den signaltransduzierenden Membranrezeptoren den Liganden entziehen. Der neutralisierende Effekt des löslichen hicp75TNFR konnte im TNF-Zytotoxizitäts-Assay an L929 Zellen gezeigt werden (Abb. 17).

### 3. Die Biochemie des hicp75TNFR

Berechnet man das theoretische Molekulargewicht der 461 Aminosäuren des hp75TNFR, abzüglich der ersten 22 Aminosäuren, die als Signalpeptid entfernt werden, ergibt sich ein Wert von 45 kDa. Im SDS-PAGE zeigt sich jedoch ein apparettes Molekulargewicht von 75 kDa, das dem Protein auch seinen Namen eintrug. Durch die Entfernung der Zuckerreste konnte belegt werden, dass der Anteil von Glycosilierungen nur 4 kDa beträgt. Die bestehende Diskrepanz von 26 kDa zwischen theoretischem und beobachtetem Gewicht erklärt man sich durch eine besondere Tertiärstruktur des bereits reduzierten Proteins in SDS und den Bedingungen im PAGE-Gel (Kohno, 1990).

Auf Proteinebene besteht eine Möglichkeit die beiden hp75TNFR-Isoformen zu unterscheiden, vorausgesetzt die durch Exon 1a codierte N-terminale Peptidsequenz (Präsequenz) fungiert nicht als Signalpeptid und wird deshalb nicht von Signalpeptidasen geschnitten. Bezieht man diese Hypothese in eine Molekulargewichtsberechnung ein, sollte der hicp75TNFR etwa 3 kDa größer als der hp75TNFR sein. Durch die Wahl geeigneter Antikörper gelang es, beide volle-Länge-Proteine aus transduzierten Zellen zu isolieren und mittels Immunoblotting darzustellen. Neben leichteren, noch nicht vollständig

glycosilierten Vorstufen konnte in der Tat für den hicp75TNFR ein Molekulargewicht von ca. 85 kDa belegt werden (Abb. 18 und 19). Da die N-terminale Präsequenz Bestandteil der Extrazellulärdomäne ist, zeigt sich darüber hinaus für die hicp75TNFR-Extrazellulärdomäne (ECD) mit 50 kDa (Abb. 19) ebenfalls ein Molekulargewichtszuwachs von 10 kDa gegenüber der ECD des hp75TNFR, die mit 40 kDa gesichert publiziert ist (Kohno, 1990, Pennica, 1992). Da die zusätzlichen 22 Aminosäuren nur 3 kDa ausmachen, liegt der Schluss nahe, dass die fehlenden 7 kDa auf Glycosilierungen zurückzuführen sind. Eine direkte Protein-Sequenzierung des hicp75TNFR war nicht möglich, da eine N-terminale Blockade, wie sie ca. zwei Drittel aller eukaryontischen Proteine betrifft, die Sequenzierung verhinderte. Auf die Ligandbindung hat das Verbleiben der Präsequenz am reifen Peptid keinen Einfluss, wie die Versuche zur biologischen Aktivität der ECD des hicp75TNFR zeigen (Abb.17). Eine Beeinträchtigung der „pre-ligand-assembly-domain“, die durch die Struktur des N-Terminus gebildet wird (Chan, 2000), tritt ebenfalls nicht auf.

Die Präsequenz des hicp75TNFR bietet einen möglichen Ansatzpunkt, um auf Proteinebene beide hp75TNFR-Isoformen von einander unterscheiden zu können, vorausgesetzt man verfügt über spezifische Antikörper gegen die von Exon 1a codierte Peptidsequenz. Die Herstellung solcher Antikörper wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit angestrebt.

#### **4. Monoklonale Antikörper gegen die Präsequenz des hicp75TNFR**

Die Tatsache, dass alle verfügbaren Antikörper gegen hp75TNFR auch die neue Isoform des hp75TNFR erkennen, konnte zur Charakterisierung des hicp75TNFR genutzt werden, da die transduzierte Zelllinie immer nur jeweils eine Isoform selektiv exprimiert. Für die Untersuchung des hicp75TNFR in primären Zellen, in denen beide Isoformen nebeneinander vorkommen, ist jedoch ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen den hicp75TNFR unerlässlich. Da, wie die Daten belegen, die N-terminale, von Exon 1a codierte Präsequenz am hicp75TNFR verbleibt, wurde die klassische Strategie zur Produktion monoklonaler Antikörper gegen dieses Target angewandt.

Üblicherweise wird ein Peptid zur Immunisierung an ein größeres Carrier-Protein, meist KLH (keyhole limpet hemocyanin), gekoppelt, um eine bessere Immunreaktion zu erzielen. Im ELISA-Screen wurde das Peptid an BSA gekoppelt, um zum einen eine bessere Affinität des Antigens zum Material der Mikrotiterplatte zu bekommen und zum anderen

störende Antikörper z.B. gegen KLH auszuschließen. Da das Peptid in diesem Fall ziemlich lange (23 Aminosäuren) ist, wurde auf die Kopplung an KLH für die Immunisierung verzichtet. Das gewählte Immunisierungsschema brachte den gewünschten Titer im Serum der Maus (Abb. 20). Durch anschließende Zellfusion konnten 9 Hybridome, vier IgM und 5 IgG-sezernierende Klone, isoliert werden, die nach erfolgter Subklonierung spezifisch an das verwendete Immunogen binden (Abb. 22).

Hierauf folgten Tests, um zu erkennen ob die generierten Antikörper ihr Epitop auch am hicp75TNFR-Molekül erkennen. Um die Bindungseigenschaften am nativen Rezeptorprotein zu untersuchen, konnte aufgrund der nachgewiesenen Oberflächenexpression des hicp75TNFR bei transfizierten HEK-Zellen (Abb. 11) die Durchflusszytometrie angewandt werden. Kein Hybridom produzierte jedoch einen Antikörper, der in diesem Assay positiv gefärbt hätte (Abb. 23). Eine theoretisch denkbare sterische Behinderung der Antikörperbindung durch die 3D-Struktur des Proteins wurde ausgeschlossen, da auch Untersuchungen an reduziertem und somit linearisiertem Rezeptor-Protein negativ verliefen (Abb. 24).

Für das Scheitern dieses Ansatzes gib es eine mögliche Erklärung. Betrachtet man die Präsequenz, finden sich in diesem kurzen Peptid zwei potentielle O-Glycosilierungsstellen an Threonin Nummer 7 und Serin Nummer 11, die anhand der Daten aus der biochemischen Charakterisierung (Abb. 18 und 19) höchstwahrscheinlich glykosiliert sind. Durch diese Modifikationen werden die bereits limitierten Epitope auf diesem Abschnitt weiter eingeschränkt. Darüber hinaus entspricht das zur Immunisierung verwendete, synthetisierte Peptid nicht mehr den tatsächlichen Strukturen am Rezeptor-Peptid.

Um dennoch spezifische Antikörper gegen die tatsächliche N-terminale Struktur des hicp75TNFR zu erhalten, müsste man, auf Grund der neuen Erkenntnisse, mit der in Eukaryonten exprimierten und aufgereinigten Extrazellulärdomäne des hicp75TNFR immunisieren und im Screen alle Hybridome aussondern, die gleichzeitig an die Extrazellulärdomäne des hp75TNFR binden.

## 5. Ligand-Rezeptor-Interaktionen

Die Daten der Lokalisierung des hicp75TNFR zeigen, dass ein Grossteil dieser Isoform in Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerks lokalisiert ist. Die Anzahl der Rezeptor-Moleküle auf der Zellmembran ist jedoch nicht unerheblich und gerade hinsichtlich der Ligand-Rezeptor-

Interaktion interessant. Da sich beide Isoformen des hp75TNFR weder im Bereich der Ligand-Bindungsdomäne noch in der Transmembran- und Intrazellulärdomäne unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass sich beide hp75TNFR-Isoformen, hinsichtlich der Ligand-Interaktionen und proteolytischer Abspaltung gleich verhalten. So konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der Entstehung löslicher hp75TNFR-Isoformen durch Proteolyse nur durch die Anzahl der zugänglichen Rezeptormoleküle auf der Zellmembran zustande kommen (Abb. 16). Die beteiligten Enzyme und deren Affinität zu der jeweiligen Isoform waren identisch. Für die Bindung von exogenem TNF auf der Zelloberfläche durch die beiden Isoformen gilt dies ebenso (Abb. 27).

Nun stellt sich die Frage nach der möglichen Funktion dieser intrazellulären Anhäufung eines TNF-Rezeptors. Kann in den Vesikeln des TGN's bereits eine Rezeptoraktivierung durch exogenes oder endogenes TNF stattfinden?

Exogenes TNF kann als Homotrimer mit 51 kDa eine Zellmembran nicht passiv überwinden, um den intrazellulären hcip75TNFR zu aktivieren. Es bedarf der Bindung an den membranständigen p55TNFR und anschließender Internalisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes (Rezeptosom) (Schneider-Brachert, 2004). Die Untersuchungen an isolierten Rezeptosomen belegen, dass exogenes TNF zwar internalisiert, jedoch nicht an den intrazellulären hcip75TNFR weitergereicht wird, um ihn zu aktivieren (Abb. 25). Bei genauerer Betrachtung ist dieses Szenario eher unwahrscheinlich, da die Affinität von löslichem TNF zu dem p55TNFR um ein Vielfaches höher ist als zu p75TNFR (Grell, 1998). Ein umgekehrtes Ligand-Passing-Modell, in dem der p75TNFR den Liganden an den p55TNFR weiterreicht, ist theoretisch möglich und wurde bereits in der Literatur diskutiert (Tartaglia, 1993).

Andererseits besitzt endogenes TNF, das bis zur Sezernierung als membranverankertes 26 kDa Protein vorliegt, eine höhere Affinität zu p75TNFR als zu p55TNFR. Da endogenes 26 kDa-TNF in LPS-aktivierten Makrophagen ein dem hcip75TNFR ähnliches intrazelluläres Verteilungsmuster zeigt (Shurety, 2000) und hcip75TNFR in TNF-produzierenden Zelllinien nachgewiesen werden konnte (Seitz, 2001), sollte untersucht werden, ob beide Moleküle kolokalisieren. In der Tat konnte diese Hypothese in L929-Zellen, die nach Transfektion bzw. Transduktion sowohl Ligand als auch Rezeptor exprimierten, bestätigt werden (Abb. 26).

Die Konsequenz dieser Kolokalisierung bleibt jedoch unklar. Eine Rezeptoraktivierung ist möglich, wenn auch nicht nachweisbar, da in diesem Zellsystem neben dem intrazellulären

26 kDa-TNF und hicp75TNFR zugleich auch sowohl lösliches 17 kDa-TNF und membranständiger hicp75TNFR vorhanden sind. Auch ein NFκB-Aktivierungstest könnte somit nicht klären, durch welche Rezeptoraktivierung dieser Transkriptionsfaktor aktiviert würde.

Für den intrazellulär lokalisierten p55TNFR ist eine Aktivierung im TGN bereits ausgeschlossen worden (Jones, 1999). Darüber hinaus zeigt sich, dass in Zellen, die sowohl TNF als auch p55TNFR exprimieren, intrazellulär gebildete Rezeptor-Ligand-Komplexe schnell degradiert werden (Decoster, 1998).

## 6. Mögliche biologische Funktion des hicp75TNFR

Die Maus Fibrosarkom-Zelllinie L929 eignet sich aufgrund der hohen Dichte von p55TNFR für *in vitro* Untersuchungen, um die biologische Aktivität und vor allem die zytotoxische Aktivität von TNF zu bestimmen. Die Zugabe von Actinomycin D, einem Antibiotikum, das an doppelsträngige DNA bindet und somit Enzyme der Replikation und Transkription blockiert, unterbindet die von TNF parallel induzierte Expression anti-apoptotischer Proteine und beschleunigt somit den TNF induzierten Zelltod. Eine Expression des hicp75TNFR in L929-Zellen und nachfolgende TNF-Stimulierung führte zu einem Anstieg des Transkriptionsfaktors NFκB (Seitz, 2001) und einer TNF-Resistenz im Zytotoxizitäts-Assay (Dissertation C. Seitz). Die funktionellen Daten der vorliegenden Arbeit helfen, diese Beobachtungen zu erklären:

Exogenes TNF aktiviert via p55TNFR den NFκB-Weg. Werden die Zellen mit hicp75TNFR transfiziert, erhöht sich die Gesamtaktivität des Transkriptionsfaktors, da über membranständige hicp75TNFR-Moleküle ebenfalls NFκB aktiviert wird. Des Weiteren wird über NFκB endogenes TNF induziert, was wiederum, diesmal als membranständiges 26 kDa-Molekül, mit hoher Affinität an intrazelluläre hicp75TNFR-Moleküle bindet (Abb. 26) und somit den „feedback-loop“ verstärkt. In L929 Zellen ist diese Möglichkeit durchaus gegeben, da diese Zelllinie nach Stimulation niedrige mRNA-Level für TNF aufweist (Vercammen, 1995).

Ein erhöhter NFκB-Spiegel führt zur Expression von NF-κB-abhängigen Schutzgenen und ist ein wichtiger Bestandteil eines zellulären Schutzsystems. Dafür spricht, dass embryonale Fibroblasten von Mäusen, die defizient für eine NF-κB-Komponente (p65/RelA) sind, sehr sensiv gegenüber TNF-induzierter Apoptose sind (Beg, 1994). Daneben zeigen auch

Arbeiten mit dominant negativen Mutanten des NF- $\kappa$ B-Inhibitor-Moleküls I $\kappa$ B, daß diese Zellen gegenüber TNF-induzierter Apoptose sensibilisiert sind (Brown, 1995, Van Antwerp, 1996).

Die beobachtete Resistenz im TNF-Zytotoxizitäts-Assay transfizierter L929-Zellen kann dadurch jedoch nicht erklärt werden. Wie bereits erwähnt, unterbindet der Zusatz von Actinomycin D die Neusynthese von Proteinen und somit auch die induzierte Synthese von endogenem TNF. Intrazelluläre hicp75TNFR-Moleküle können somit nicht aktiviert werden, da kein endogenes TNF vorhanden ist und exogenes TNF, wie gezeigt, nicht an Rezeptoren des trans-Golgi-Netzwerks bindet (Abb. 25). Für den sichtbaren Schutz-Effekt kommen also nur kompetitive Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen auf der Zellmembran in Frage, die durch die Verwendung von Rezeptormutanten aufgeklärt werden konnten (Abb. 27 und 28).

Durch die Verwendung von YFP-markierten Rezeptoren und anschließendem Sortieren war es möglich, die Zelllinien auf identische Fusionsproteinlevel zu normieren. Demnach scheiden Effekte, die auf unterschiedliche Rezeptorexpression zurückgeführt werden können, aus.

Die hicp75TNFR-transduzierten L929-Zellen zeigen den bereits beschriebenen Schutz im TNF-Zytotoxizitätsassay. Der Schutz ist jedoch TRAF- und folglich NF $\kappa$ B-unabhängig, da auch die Rezeptormutante ohne TRAF-Bindestelle geschützt ist. Dies war zu erwarten, da durch die Blockade der Transkription eine potentielle NF $\kappa$ B-induzierte Expression von anti-apoptotischen Proteinen ausgeschlossen werden kann. Ein ähnliches Bild ergibt sich für den hp75TNFR. Die Expression dieser Isoform schützt L929 gleichermaßen NF $\kappa$ B-unabhängig vor dem TNF-induzierten Zelltod.

Hinsichtlich der Qualität des Schutzes ergeben sich quantitative Unterschiede. Die hp75TNFR-Konstrukte sind effektiver in der Hemmung des Zelltodes als die jeweiligen hicp75TNFR-Konstrukte. Dies korreliert mit der vorhandenen Menge der entsprechenden hp75TNFR-Isoform im Überstand (Abb. 16) bzw. auf der Zellmembran (Abb. 11) und stützt die Hypothese, dass der Schutz durch Bindung von TNF zustande kommt.

Ein weiteres Experiment unterstreicht die Theorie des Schutzes durch kompetitive Hemmung:

Da die Induktion des Zelltodes durch TNF über den Todesrezeptor p55TNFR erfolgt, wurde anstelle von TNF ein agonistischer Antikörper gegen p55TNFR eingesetzt. In

diesem TNF-freien Szenario geht der schützende Effekt beider hp75TNFR verloren (Abb. 28).

Desweiteren verursacht die Transduktion mit hp75TNFR-Isoformen eine grundsätzliche Resistenz gegenüber induziertem Zelltod. Dies belegen die Experimente an transduzierten Apo 6.5-Zellen, die humanes FAS, einen weiteren Todesrezeptor aus der TNF-Rezeptor-Superfamilie, tragen. In Gegenwart von TNF zeigt sich nach Transduktion dieser Zellen der bereits beschriebene Schutz durch hp75TNFR- bzw. hicp75TNFR-Transduktion; inkubiert man die Zellen jedoch mit einem agonistischen Antikörper gegen FAS verlaufen die Absterbekurven gleich.

Zusammen ergeben die Daten ein komplettes Bild und erklären, wie der beobachtete Schutz gegenüber der TNF-Zytotoxizität nach hicp75TNFR-Expression zustande kommt. Eine erhöhte NF $\kappa$ B-Aktivität schützt Zellen vor TNF-induziertem Zelltod. Im L929-Zell-Assay, als etabliertem *in vitro* TNF-Sensitivitätstest, konnte ebenfalls eine Schutzfunktion des hicp75TNFR gezeigt werden. Dieses Testsystem ist jedoch NF $\kappa$ B-unabhängig und der Schutz basiert demzufolge auf Blockade von TNF bereits im Überstand und auf der Zellmembran. Eine Funktion des hicp75TNFR, die dem hp75TNFR fehlt, konnte in diesen Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Die Tatsache, dass die  $\Delta$ TRAF-Mutanten beider hp75TNFR-Isoformen besser schützen als die volle-Länge-Konstrukte, gehen mit bereits publizierten Daten konform. Nach Aktivierung von hp75TNFR wird das Adapterprotein TRAF2 und cIAP1 rekrutiert. Das Protein cIAP besitzt eine E3-Ubiquitin-Ligase Aktivität und überträgt Ubiquitinreste auf TRAF2, das daraufhin in Proteasomen degradiert wird (Li, 2002). Die TRAF2-Verarmung der Zelle beschleunigt die p55TNFR induzierte Caspase 8 Aktivität und verstärkt somit den Zelltod (Fotin-Mleczek, 2002). Da lösliches TNF zwar gut an den hp75TNFR bindet, ihn aber relativ schlecht aktiviert, überwiegt der TNF-neutralisierende Effekt. Der Schutzmechanismus wird zwar durch TRAF2-Degradation abgeschwächt, aber nicht aufgehoben.

Die Charakterisierung der neuen Isoform des hp75TNFR im Rahmen dieser Arbeit zeigt, dass der hicp75TNFR, sobald er die Zellmembran erreicht, sich in seiner Funktion und seinen Eigenschaften nicht von dem hp75TNFR unterscheidet. Die vorwiegend intrazelluläre Lokalisation des hicp75TNFR ermöglicht jedoch theoretisch die Verstärkung der NF $\kappa$ B-Aktivierung durch endogenes TNF (Abb. 26). Des Weiteren bietet die intrazelluläre Anreicherung der Isoform einen Schutz gegenüber proteolytischen Prozessen

(Rezeptor-Shedding), die sich hauptsächlich an der Plasmamembran ereignen (Abb. 16). Der intrazellulär lokalisierte hicp75TNFR stellt somit auch eine Art Depot aus funktionellem und bioaktivem hp75TNFR dar. Dies erscheint sinnvoll, da eine Zelle nach TNF- oder LPS-Stimulierung transient an membranständigen TNF-Rezeptoren verarmt. Diese Möglichkeit wurde bereits für intrazellulär lokalisierte p55TNFR-Moleküle diskutiert (Wang, 2003).

## E: Zusammenfassung

Sowohl in Zellen hämatopoetischen als auch nicht-hämatopoetischen Ursprungs konnte die mRNA einer neuen Isoform des humanen p75TNFR nachgewiesen werden. Diese unterscheidet sich durch das Fehlen eines distinkten N-terminalen Signalpeptids von der bereits beschriebenen membranständigen Isoform des hp75TNFR. Erste immunhistochemische Färbungen zeigten eine intrazelluläre Lokalisierung dieses Rezeptors, woraufhin dieses Protein als intrazellulärer (ic) p75TNFR bezeichnet wurde (Seitz, 2001).

Die Daten der vorliegenden Arbeit tragen dazu bei, den hicp75TNFR hinsichtlich exakter subzellulärer Lokalisierung, Aktivierung und biochemischer Eigenschaften in das bereits gut erforschte TNF-TNF-Rezeptor-System einzuordnen. Es konnte im Einzelnen gezeigt werden:

- Durch das Fehlen einer N-terminalen Leadersequenz wird der hicp75TNFR nur passiv zur Plasmamembran transportiert.
- Der überwiegende Teil der hicp75TNFR-Moleküle ist im Golgi-Apparat, bzw. in Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerks lokalisiert.
- Im Gegensatz zum hp75TNFR wird der hicp75TNFR in geringerer Menge auf der Zelloberfläche exprimiert.
- Die hicp75TNFR-Moleküle auf der Zelloberfläche sind in ihren Eigenschaften nicht von denen des hp75TNFR zu unterscheiden. Dies betrifft sowohl die proteolytische Spaltung durch TACE wie auch die Aktivierung durch exogenes TNF. Die beobachteten Unterschiede sind Folgen der unterschiedlich starken Membranexpression.
- Der lösliche hicp75TNFR besteht aus der Extrazellulärdomäne des hicp75TNFR (50 kDa).

- Löslicher hicp75TNFR entsteht durch die proteolytische Aktivität der Metalloproteinase TACE.
- Löslicher hicp75TNFR ist bioaktiv und neutralisiert lösliches TNF.
- Das apparente Molekulargewicht des reifen hicp75TNFR beträgt 85 kDa.
- Es besteht die Möglichkeit beide hp75TNFR-Isoformen auf Proteinebene voneinander zu unterscheiden, da die von Exon 1a codierte Präsequenz am reifen Protein verbleibt. Glykosilierungen verhindern jedoch die Bindung von den generierten Antikörpern gegen die Peptidsequenz.
- Exogenes TNF ist nicht in der Lage nach erfolgter Internalisierung den intrazellulären hicp75TNFR zu aktivieren.
- Endogenes TNF kolokalisiert mit hicp75TNFR-Molekülen im Bereich des Golgi-Apparates und des Trans-Golgi-Netzwerks.
- Die beobachtete Resistenz hicp75TNFR-transduzierter Zellen im Zytotoxizitäts-Assay ist TNF spezifisch, NFκB-unabhängig und somit die Folge der neutralisierenden Eigenschaften von löslichen und membranständigen hicp75TNFR-Molekülen.

## F: Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Lichtmann, A. H., Pober, J. S.** (2000) Cellular and molecular immunology. *W.B.Saunders company*
- Abramovich, C., Ratovitski, E., Lundgren, E., Revel, M.** (1994) Identification of mRNAs encoding two different soluble forms of the human interferon alpha-receptor. *FEBS Lett.* **338**, 295-300.
- Aderka, D., Englemann, H., Hornik, V., Skornick, Y., Levo, Y., Wallach, D., Kushtai, G.** (1991) Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res.* **51**, 5602-5607.
- Aderka, D., Sorkine, P., Abu-Abid, S., Lev, D., Setton, A., Cope, A. P., Wallach, D., Klausner, J.** (1998) Shedding kinetics of soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors after systemic TNF leaking during isolated limb perfusion. Relevance to the pathophysiology of septic shock. *J.Clin.Invest* **101**, 650-659.
- Aderka, D., Wysenbeek, A., Engelmann, H., Cope, A. P., Brennan, F., Molad, Y., Hornik, V., Levo, Y., Maini, R. N., Feldmann, M., .** (1993) Correlation between serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **36**, 1111-1120.
- Aggarwal, B. B., Kohr, W. J., Hass, P. E., Moffat, B., Spencer, S. A., Henzel, W. J., Bringman, T. S., Nedwin, G. E., Goeddel, D. V., Harkins, R. N.** (1985) Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol.Chem.* **260**, 2345-2354.
- Aggarwal, B. B., Natarajan, K.** (1996) Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur.Cytokine Netw.* **7**, 93-124.
- Aggarwal, B. B., Shishodia, S., Ashikawa, K., Bharti, A. C.** (2002) The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy* **1**, 327-341.
- Aksentijevich, I., Galon, J., Soares, M., Mansfield, E., Hull, K., Oh, H. H., Goldbach-Mansky, R., Dean, J., Athreya, B., Reginato, A. J., Henrickson, M., Pons-Estel, B., O'Shea, J. J., Kastner, D. L.** (2001) The tumor-necrosis-factor receptor-associated periodic syndrome: new mutations in TNFRSF1A, ancestral origins, genotype-phenotype studies, and evidence for further genetic heterogeneity of periodic fevers. *Am J Hum.Genet.* **69**, 301-314.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D.** (1995) Molekularbiologie der Zelle. *Wiley-VCH, Weinheim* **3. Auflage**.
- Alexopoulou, L., Pasparakis, M., Kollias, G.** (1997) A murine transmembrane tumor necrosis factor (TNF) transgene induces arthritis by cooperative p55/p75 TNF receptor signaling. *Eur.J Immunol.* **27**, 2588-2592.

- Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S.** (2002) Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp.Med* **196**, 379-387.
- Aspalter, R. M., Eibl, M. M., Wolf, H. M.** (2003) Regulation of TCR-mediated T cell activation by TNF-RII. *J Leukoc.Biol.* **74**, 572-582.
- Beg, A. A., Baldwin, A. S., Jr.** (1994) Activation of multiple NF-kappa B/Rel DNA-binding complexes by tumor necrosis factor. *Oncogene* **9**, 1487-1492.
- Berg, P. A.** (2004) Risks and side effect reactions during therapy with TNF-alpha blockers. An immunologic analysis. *Dtsch.Med Wochenschr.* **129**, 1631-1634.
- Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J. D., Chang, M., Pan, Y. C., Mathison, J., Ulevitch, R., Cerami, A.** (1985) Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* **316**, 552-554.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., Cerretti, D. P.** (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**, 729-733.
- Bodmer, J. L., Schneider, P., Tschopp, J.** (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem.Sci* **27**, 19-26.
- Bradley, J. R., Thiru, S., Pober, J. S.** (1995) Disparate localization of 55-kd and 75-kd tumor necrosis factor receptors in human endothelial cells. *Am.J.Pathol.* **146**, 27-32.
- Brink, R., Lodish, H. F.** (1998) Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 2A (TRAF2A), a TRAF2 splice variant with an extended RING finger domain that inhibits TNFR2-mediated NF-kappaB activation. *J Biol.Chem.* **273**, 4129-4134.
- Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G., Siebenlist, U.** (1995) Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* **267**, 1485-1488.
- Butler, D. M., Malfait, A. M., Mason, L. J., Warden, P. J., Kollias, G., Maini, R. N., Feldmann, M., Brennan, F. M.** (1997) DBA/1 mice expressing the human TNF-alpha transgene develop a severe, erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition. *J Immunol.* **159**, 2867-2876.
- Butty, V. L., Roux-Lombard, P., Garbino, J., Dayer, J. M., Ricou, B.** (2003) Anti-inflammatory response after infusion of p55 soluble tumor necrosis factor receptor fusion protein for severe sepsis. *Eur.Cytokine Netw.* **14**, 15-19.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B.** (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **72**, 3666-3670.

- Chan, F. K.-M., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., Lenardo, M. J.** (2000) A Domain in TNF Receptors That Mediates Ligand-Independent Receptor Assembly and Signaling. *Science* **288**, 2351-2354.
- Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J. P., Brauer, M. J., Kiefer, M. C., Barr, P. J., Mountz, J. D.** (1994) Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* **263**, 1759-1762.
- Coley, W. B.** (1893) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 487-
- Cope, A. P., Aderka, D., Doherty, M., Engelmann, H., Gibbons, D., Jones, A. C., Brennan, F. M., Maini, R. N., Wallach, D., Feldmann, M.** (1992) Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* **35**, 1160-1169.
- Corti, A., D'Ambrosio, F., Marino, M., Merli, S., Cassani, G.** (1995a) Identification of differentially glycosylated forms of the soluble p75 tumor necrosis factor (TNF) receptor in human urine. *Eur.Cytokine Netw.* **6**, 29-35.
- Corti, A., Merli, S., Bagnasco, L., D'Ambrosio, F., Marino, M., Cassani, G.** (1995b) Identification of two forms (31-33 and 48 kD) of the urinary soluble p55 tumor necrosis factor receptor that are differentially N- and O-glycosylated. *J Interferon Cytokine Res.* **15**, 143-152.
- Crowe, P. D., VanArsdale, T. L., Goodwin, R. G., Ware, C. F.** (1993) Specific induction of 80-kDa tumor necrosis factor receptor shedding in T lymphocytes involves the cytoplasmic domain and phosphorylation. *J.Immunol.* **151**, 6882-6890.
- Decoster, E., Vanhaesebroeck, B., Boone, E., Plaisance, S., De Vos, K., Haegeman, G., Grooten, J., Fiers, W.** (1998) Induction of unresponsiveness to tumor necrosis factor (TNF) after autocrine TNF expression requires TNF membrane retention. *J.Biol.Chem.* **273**, 3271-3277.
- Domonkos, A., Udvardy, A., Laszlo, L., Nagy, T., Duda, E.** (2001) Receptor-like properties of the 26 kDa transmembrane form of TNF. *Eur.Cytokine Netw.* **12**, 411-419.
- Eggermont, A. M., Schraffordt, K. H., Klausner, J. M., Lienard, D., Kroon, B. B., Schlag, P. M., Ben Ari, G., Lejeune, F. J.** (1997) Isolation limb perfusion with tumor necrosis factor alpha and chemotherapy for advanced extremity soft tissue sarcomas. *Semin.Oncol.* **24**, 547-555.
- Ehrenstein, M. R., Evans, J. G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D. A., Mauri, C.** (2004) Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp.Med* **200**, 277-285.
- Eigler, A., Sinha, B., Hartmann, G., Endres, S.** (1997) Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol.Today* **18**, 487-492.

- Eissner, G., Kirchner, S., Lindner, H., Kolch, W., Janosch, P., Grell, M., Scheurich, P., Andreesen, R., Holler, E.** (2000) Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages. *J Immunol.* **164**, 6193-6198.
- Erickson, S. L., de Sauvage, F. J., Kikly, K., Carver-Moore, K., Pitts-Meek, S., Gillett, N., Sheehan, K. C., Schreiber, R. D., Goeddel, D. V., Moore, M. W.** (1994) Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature* **372**, 560-563.
- Feldmann, M., Brennan, F. M., Paleolog, E., Cope, A., Taylor, P., Williams, R., Woody, J., Maini, R. N.** (2004) Anti-TNFalpha therapy of rheumatoid arthritis: what can we learn about chronic disease? *Novartis Found Symp.* **256**, 53-69.
- Fotin-Mleczek, M., Henkler, F., Samel, D., Reichwein, M., Hausser, A., Parmryd, I., Scheurich, P., Schmid, J. A., Wajant, H.** (2002) Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J Cell Sci* **115**, 2757-2770.
- Frater-Schroder, M., Risau, W., Hallmann, R., Gautschi, P., Bohlen, P.** (1987) Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **84**, 5277-5281.
- Fukunaga, R., Seto, Y., Mizushima, S., Nagata, S.** (1990) Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **87**, 8702-8706.
- Goodwin, R. G., Friend, D., Ziegler, S. F., Jerzy, R., Falk, B. A., Gimpel, S., Cosman, D., Dower, S. K., March, C. J., Namen, A. E., .** (1990) Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell* **60**, 941-951.
- Grell, M.** (1995a) Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *J Inflamm.* **47**, 8-17.
- Grell, M., Becke, F. M., Wajant, H., Mannel, D. N., Scheurich, P.** (1998a) TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur J Immunol.* **28**, 257-263.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., .** (1995b) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **83**, 793-802.
- Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., Scheurich, P.** (1998b) The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **95**, 570-575.
- Gruss, H. J., Dower, S. K.** (1995) Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* **85**, 3378-3404.

- Hajeer, A. H., Hutchinson, I. V.** (2000) TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc.Res.Tech.* **50**, 216-228.
- Haskill, S., Martin, G., Van Le, L., Morris, J., Peace, A., Bigler, C. F., Jaffe, G. J., Hammerberg, C., Sporn, S. A., Fong, S., .** (1991) cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin 1 receptor antagonist associated with epithelium. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **88**, 3681-3685.
- Hawari, F. I., Rouhani, F. N., Cui, X., Yu, Z. X., Buckley, C., Kaler, M., Levine, S. J.** (2004) Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: a mechanism for generation of soluble cytokine receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 1297-1302.
- Heaney, M. L., Golde, D. W.** (1996) Soluble cytokine receptors. *Blood* **87**, 847-857.
- Hoher, D., Benyoucef, S., Delannoy, A. S., De Groote, D., Ajana, F., Mouton, Y., Wattre, P.** (1996) High plasma level of soluble tumor necrosis factor receptor type II (sTNFRII) in asymptomatic HIV-1-infected patients. *Infection* **24**, 213-217.
- Hooper, N. M., Karran, E. H., Turner, A. J.** (1997) Membrane protein secretases. *Biochem.J* **321** ( Pt 2), 265-279.
- Ibelgaufits, H.** (2004) Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia. <http://www.copewithcytokines.de>
- Jacobsen, F. W., Dubois, C. M., Rusten, L. S., Veiby, O. P., Jacobsen, S. E.** (1995) Inhibition of stem cell factor-induced proliferation of primitive murine hematopoietic progenitor cells signaled through the 75-kilodalton tumor necrosis factor receptor. Regulation of c-kit and p53 expression. *J Immunol.* **154**, 3732-3741.
- Jacobsen, F. W., Rothe, M., Rusten, L., Goeddel, D. V., Smeland, E. B., Veiby, O. P., Slordal, L., Jacobsen, S. E.** (1994) Role of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor: inhibition of early hematopoiesis. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **91**, 10695-10699.
- Jones, S. J., Ledgerwood, E. C., Prins, J. B., Galbraith, J., Johnson, D. R., Pober, J. S., Bradley, J. R.** (1999) TNF recruits TRADD to the plasma membrane but not the trans-Golgi network, the principal subcellular location of TNF-R1. *J.Immunol.* **162**, 1042-1048.
- Kohno, T., Brewer, M. T., Baker, S. L., Schwartz, P. E., King, M. W., Hale, K. K., Squires, C. H., Thompson, R. C., Vannice, J. L.** (1990) A second tumor necrosis factor receptor gene product can shed a naturally occurring tumor necrosis factor inhibitor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 8331-8335.
- Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F., Kollias, G.** (1999) Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity*. **10**, 387-398.

- Lainez, B., Fernandez-Real, J. M., Romero, X., Esplugues, E., Canete, J. D., Ricart, W., Engel, P.** (2004) Identification and characterization of a novel spliced variant that encodes human soluble tumor necrosis factor receptor 2. *Int.Immunol.* **16**, 169-177.
- Lantz, M., Bjornberg, F., Olsson, I., Richter, J.** (1994) Adherence of neutrophils induces release of soluble tumor necrosis factor receptor forms. *J.Immunol.* **152**, 1362-1369.
- Layton, M. J., Cross, B. A., Metcalf, D., Ward, L. D., Simpson, R. J., Nicola, N. A.** (1992) A major binding protein for leukemia inhibitory factor in normal mouse serum: identification as a soluble form of the cellular receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **89**, 8616-8620.
- Ledgerwood, E. C., Prins, J. B., Bright, N. A., Johnson, D. R., Wolfreys, K., Pober, J. S., O'Rahilly, S., Bradley, J. R.** (1998) Tumor necrosis factor is delivered to mitochondria where a tumor necrosis factor-binding protein is localized. *Lab Invest* **78**, 1583-1589.
- Lewis, M., Tartaglia, L. A., Lee, A., Bennett, G. L., Rice, G. C., Wong, G. H., Chen, E. Y., Goeddel, D. V.** (1991) Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 2830-2834.
- Li, X., Yang, Y., Ashwell, J. D.** (2002) TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* **416**, 345-347.
- Locksley, R. M., Killeen, N., Lenardo, M. J.** (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501.
- Loetscher, H., Pan, Y. C., Lahm, H. W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H., Lesslauer, W.** (1990) Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* **61**, 351-359.
- Mannel, D. N., Echtenacher, B.** (2000) TNF in the inflammatory response. *Chem.Immunol.* **74**, 141-161.
- Marino, M. W., Dunn, A., Grail, D., Inglese, M., Noguchi, Y., Richards, E., Jungbluth, A., Wada, H., Moore, M., Williamson, B., Basu, S., Old, L. J.** (1997) Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **94**, 8093-8098.
- Mason, A. T., McVicar, D. W., Smith, C. A., Young, H. A., Ware, C. F., Ortaldo, J. R.** (1995) Regulation of NK cells through the 80-kDa TNFR (CD120b). *J Leukoc.Biol.* **58**, 249-255.
- Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Takedatsu, H., Cario, E., de Jong, Y. P., Ooi, C. J., Xavier, R. J., Terhorst, C., Podolsky, D. K., Bhan, A. K.** (2002) Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* **122**, 134-144.

- Mohler, K. M., Sleath, P. R., Fitzner, J. N., Cerretti, D. P., Alderson, M., Kerwar, S., Torrance, D. S., Otten-Evans, C., Greenstreet, T., Weerawarna, K.** (1994) Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing. *Nature* **370**, 218-220.
- Mohler, K. M., Torrance, D. S., Smith, C. A., Goodwin, R. G., Stremler, K. E., Fung, V. P., Madani, H., Widmer, M. B.** (1993) Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol.* **151**, 1548-1561.
- Mosley, B., Beckmann, M. P., March, C. J., Idzerda, R. L., Gimpel, S. D., VandenBos, T., Friend, D., Alpert, A., Anderson, D., Jackson, J., .** (1989) The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. *Cell* **59**, 335-348.
- Moss, M. L., Jin, S. L., Becherer, J. D., Bickett, D. M., Burkhardt, W., Chen, W. J., Hassler, D., Leesnitzer, M. T., McGeehan, G., Milla, M., Moyer, M., Rocque, W., Seaton, T., Schoenen, F., Warner, J., Willard, D.** (1997) Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Neuroimmunol.* **72**, 127-129.
- Mosselmans, R., Hepburn, A., Dumont, J. E., Fiers, W., Galand, P.** (1988) Endocytic pathway of recombinant murine tumor necrosis factor in L-929 cells. *J Immunol.* **141**, 3096-3100.
- Muller, R., Marmenout, A., Fiers, W.** (1986) Synthesis and maturation of recombinant human tumor necrosis factor in eukaryotic systems. *FEBS Lett.* **197**, 99-104.
- Palmer, G., Talabot-Ayer, D., Szalay-Quinodoz, L., Maret, M., Arend, W. P., Gabay, C.** (2003) Mice transgenic for intracellular interleukin-1 receptor antagonist type 1 are protected from collagen-induced arthritis. *Eur.J Immunol.* **33**, 434-440.
- Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Grell, M., Pfizenmaier, K., Bluethmann, H., Kollias, G.** (1997) Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **94**, 6319-6323.
- Pedron, T., Girard, R., Chaby, R.** (2003) TLR4-dependent lipopolysaccharide-induced shedding of tumor necrosis factor receptors in mouse bone marrow granulocytes. *J.Biol.Chem.* **278**, 20555-20564.
- Pennica, D., Lam, V. T., Mize, N. K., Weber, R. F., Lewis, M., Fendly, B. M., Lipari, M. T., Goeddel, D. V.** (1992) Biochemical properties of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. Characterization of ligand binding, internalization, and receptor phosphorylation. *J Biol.Chem.* **267**, 21172-21178.
- Petch, L. A., Harris, J., Raymond, V. W., Blasband, A., Lee, D. C., Earp, H. S.** (1990) A truncated, secreted form of the epidermal growth factor receptor is encoded by an alternatively spliced transcript in normal rat tissue. *Mol.Cell Biol.* **10**, 2973-2982.

- Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kundig, T. M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P. S., Kronke, M., Mak, T. W.** (1993) Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell* **73**, 457-467.
- Pimentel-Muinos, F. X., Seed, B.** (1999) Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. *Immunity*. **11**, 783-793.
- Porteu, F., Nathan, C.** (1990) Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. *J.Exp.Med.* **172**, 599-607.
- Prinz, B., Stahl, U., Lang, C.** (2003) Intracellular transport of a heterologous membrane protein, the human transferrin receptor, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int.Microbiol.* **6**, 49-55.
- Raines, M. A., Liu, L., Quan, S. G., Joe, V., DiPersio, J. F., Golde, D. W.** (1991) Identification and molecular cloning of a soluble human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **88**, 8203-8207.
- Renauld, J. C., Druez, C., Kermouni, A., Houssiau, F., Uyttenhove, C., Van Roost, E., Van Snick, J.** (1992) Expression cloning of the murine and human interleukin 9 receptor cDNAs. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **89**, 5690-5694.
- Rothe, J., Lesslauer, W., Lotscher, H., Lang, Y., Koebel, P., Kontgen, F., Althage, A., Zinkernagel, R., Steinmetz, M., Bluethmann, H.** (1993) Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* **364**, 798-802.
- Ruuls, S. R., Sedgwick, J. D.** (1999) Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models. *Am J Hum.Genet.* **65**, 294-301.
- Sambrook, J., Russel, D. W.** (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. *Molecular cloning: A laboratory manual 3nd Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY-
- Santee, S. M., Owen-Schaub, L. B.** (1996) Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization. *J Biol.Chem.* **271**, 21151-21159.
- Sato, T. A., Widmer, M. B., Finkelman, F. D., Madani, H., Jacobs, C. A., Grabstein, K. H., Maliszewski, C. R.** (1993) Recombinant soluble murine IL-4 receptor can inhibit or enhance IgE responses in vivo. *J Immunol.* **150**, 2717-2723.
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwender, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D., Schutze, S.** (2004) Compartmentalization of TNF Receptor 1 Signaling; Internalized TNF Receptosomes as Death Signaling Vesicles. *Immunity*. **21**, 415-428.

- Schroder, J., Stuber, F., Gallati, H., Schade, F. U., Kremer, B.** (1995) Pattern of soluble TNF receptors I and II in sepsis. *Infection* **23**, 143-148.
- Schutze, S., Machleidt, T., Adam, D., Schwandner, R., Wiegmann, K., Kruse, M. L., Heinrich, M., Wickel, M., Kronke, M.** (1999) Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling. *J.Biol.Chem.* **274**, 10203-10212.
- Schwarz, H., Valbracht, J., Tuckwell, J., von Kempis, J., Lotz, M.** (1995) ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. *Blood* **85**, 1043-1052.
- Schwid, S. R., Noseworthy, J. H.** (1999) TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* **53**, 457-465.
- Seitz, C., Mannel, D. N., Hehlgans, T.** (1998) Isolation and functional characterization of the mouse p75 TNF receptor promoter. *Genomics* **48**, 111-116.
- Seitz, C., Muller, P., Krieg, R. C., Mannel, D. N., Hehlgans, T.** (2001) A Novel p75TNF Receptor Isoform Mediating NF $\kappa$  B Activation. *J.Biol.Chem.* **276**, 19390-19395.
- Semenza, G. L.** (1998) Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *J Lab Clin.Med* **131**, 207-214.
- Shulman, M., Wilde, C. D., Kohler, G.** (1978) A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* **276**, 269-270.
- Shurety, W., Merino-Trigo, A., Brown, D., Hume, D. A., Stow, J. L.** (2000) Localization and post-Golgi trafficking of tumor necrosis factor-alpha in macrophages. *J.Interferon Cytokine Res.* **20**, 427-438.
- Singer, S. S., Mannel, D. N., Hehlgans, T., Brosius, J., Schmitz, J.** (2004) From "Junk" to Gene: Curriculum vitae of a Primate Receptor Isoform Gene. *Journal of Molecular Biology* **342**, 883-886.
- Slifman, N. R., Gershon, S. K., Lee, J. H., Edwards, E. T., Braun, M. M.** (2003) Listeria monocytogenes infection as a complication of treatment with tumor necrosis factor alpha-neutralizing agents. *Arthritis Rheum.* **48**, 319-324.
- Smith, C. A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M. P., Jerzy, R., Dower, S. K., Cosman, D., Goodwin, R. G.** (1990) A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* **248**, 1019-1023.
- Smith, C. W., Patton, J. G., Nadal-Ginard, B.** (1989) Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu.Rev.Genet.* **23**, 527-577.
- Snyers, L., Renaud, J. C., Szpirer, C., Content, J.** (1995) Cloning and chromosomal localization of a pseudogene corresponding to a mRNA for a soluble IL-6 receptor. *DNA Seq.* **5**, 311-314.

- Steed, P. M., Tansey, M. G., Zalevsky, J., Zhukovsky, E. A., Desjarlais, J. R., Szymkowski, D. E., Abbott, C., Carmichael, D., Chan, C., Cherry, L., Cheung, P., Chirino, A. J., Chung, H. H., Doberstein, S. K., Eivazi, A., Filikov, A. V., Gao, S. X., Hubert, R. S., Hwang, M., Hyun, L., Kashi, S., Kim, A., Kim, E., Kung, J., Martinez, S. P., Muchhal, U. S., Nguyen, D. H., O'Brien, C., O'Keefe, D., Singer, K., Vafa, O., Vielmetter, J., Yoder, S. C., Dahiyat, B. I.** (2003) Inactivation of TNF signaling by rationally designed dominant-negative TNF variants. *Science* **301**, 1895-1898.
- Stevenson, F. T., Bursten, S. L., Locksley, R. M., Lovett, D. H.** (1992) Myristylation of the tumor necrosis factor alpha precursor on specific lysine residues. *J Exp. Med* **176**, 1053-1062.
- Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T.** (1989) Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* **58**, 573-581.
- Takaki, S., Tominaga, A., Hitoshi, Y., Mita, S., Sonoda, E., Yamaguchi, N., Takatsu, K.** (1990) Molecular cloning and expression of the murine interleukin-5 receptor. *EMBO J* **9**, 4367-4374.
- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., Goeddel, D. V.** (1993a) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**, 845-853.
- Tartaglia, L. A., Goeddel, D. V., Reynolds, C., Figari, I. S., Weber, R. F., Fendly, B. M., Palladino, M. A., Jr.** (1993b) Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Immunol.* **151**, 4637-4641.
- Tartaglia, L. A., Pennica, D., Goeddel, D. V.** (1993c) Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol. Chem.* **268**, 18542-18548.
- Teasdale, R. D., Jackson, M. R.** (1996) Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 27-54.
- Todokoro, K., Kuramochi, S., Nagasawa, T., Abe, T., Ikawa, Y.** (1991) Isolation of a cDNA encoding a potential soluble receptor for human erythropoietin. *Gene* **106**, 283-284.
- Tsuzaka, K., Fukuhara, I., Setoyama, Y., Yoshimoto, K., Suzuki, K., Abe, T., Takeuchi, T.** (2003) TCR zeta mRNA with an alternatively spliced 3'-untranslated region detected in systemic lupus erythematosus patients leads to the down-regulation of TCR zeta and TCR/CD3 complex. *J Immunol.* **171**, 2496-2503.
- Utsumi, T., Takeshige, T., Tanaka, K., Takami, K., Kira, Y., Klostergaard, J., Ishisaka, R.** (2001) Transmembrane TNF (pro-TNF) is palmitoylated. *FEBS Lett.* **500**, 1-6.

- Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Kafri, T., Green, D. R., Verma, I. M.** (1996) Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* **274**, 787-789.
- van Vliet, C., Thomas, E. C., Merino-Trigo, A., Teasdale, R. D., Gleeson, P. A.** (2003) Intracellular sorting and transport of proteins. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* **83**, 1-45.
- Vercammen, D., Vandenebeele, P., Declercq, W., Van de, C. M., Grooten, J., Fiers, W.** (1995) Cytotoxicity in L929 murine fibrosarcoma cells after triggering of transfected human p75 tumour necrosis factor (TNF) receptor is mediated by endogenous murine TNF. *Cytokine* **7**, 463-470.
- Vigón, I., Florindo, C., Fichelson, S., Guenet, J. L., Mattei, M. G., Souyri, M., Cosman, D., Gisselbrecht, S.** (1993) Characterization of the murine Mpl proto-oncogene, a member of the hematopoietic cytokine receptor family: molecular cloning, chromosomal location and evidence for a function in cell growth. *Oncogene* **8**, 2607-2615.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P.** (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death.Differ.* **10**, 45-65.
- Wang, J., Al Lamki, R. S., Zhang, H., Kirkiles-Smith, N., Gaeta, M. L., Thiru, S., Pober, J. S., Bradley, J. R.** (2003) Histamine antagonizes tumor necrosis factor (TNF) signaling by stimulating TNF receptor shedding from the cell surface and Golgi storage pool. *J Biol.Chem.* **278**, 21751-21760.
- Zerial, M., Melancon, P., Schneider, C., Garoff, H.** (1986) The transmembrane segment of the human transferrin receptor functions as a signal peptide. *EMBO J.* **5**, 1543-1550.

## Danksagung

Bei allen, die mir beim Anfertigen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. Daniela N. Männel für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Überlassung des interessanten Themas. Die diskussionsfreudige Atmosphäre in den Montagsbesprechungen, „Journal-Clubs“ und Mittwochsseminaren haben enorm dazu beigetragen das wissenschaftliche Arbeiten zu erlernen.
- Herrn Prof. Dr. S. Elz, ohne dessen Bereitschaft die fakultätsinterne Vertretung dieser Dissertation zu übernehmen, diese Promotion nicht möglich gewesen wäre.
- Prof. S. Schütze aus Kiel für die Durchführung und Interpretation der Rezeptosomenisolierung.
- Dr. W. Schneider und seinen Mitarbeitern für die unermüdlichen Versuche, die Transduktion zu etablieren. Danke für das Abtreten von Reagentien, Wissen und Tricks für den alltäglichen Laboralltag.
- Prof. Schröder und seiner Crew von der Elektronenmikroskopie für die zeitintensiven Versuche ein Protokoll für die Immunogold-Markierung zu etablieren.
- Den Mitgliedern des Graduiertenkollegs 760 für die abwechslungsreichen und informativen Veranstaltungen (Workshop, Summer School). Darüber hinaus ermöglichten mir bewilligte Reisemittel den Besuch der Herbsttagung der deutschen Immunologen 2003 und des TNF-Kongresses 2004 in Lausanne.
- Prof. Hofstädter für die Bereitstellung des Tischfussballs. Das „Gerät“ half des Öfteren einen tristen Labortag aufzuhellen. Ein besonderer Dank auch an die allzeit bereiten Mitspieler.

- Den „noch-“ und „nicht-mehr-“ Teilnehmern der „Gingerino-Runde“.
- Allen Mitgliedern des Instituts für Immunologie und Pathologie die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern danken ohne deren stete Unterstützung meine schulische und berufliche Laufbahn nicht diesen erfolgreichen Verlauf genommen hätte.

## Anhang

Manuskripte die im Rahmen der Promotion entstanden sind:

**Colocalization of endogenous TNF with a functional intracellular splice form of human TNF receptor 2**

C. Scherübl, W. Schneider-Brachert, S. Schütze, T. Hehlgans, and D. N. Männel  
(Manuskript eingereicht)

**The casein kinase 1 motif at the intracellular N-terminus of transmembrane tumor necrosis factor (TNF) molecule regulates subcellular localization and shedding of TNF**

Éva Pócsik, Christoph Scherübl, Beáta Haraszti, Annamária Balázs, Róbert Rácz, Ildikó Keresztyén, Gábor Horváth, János Szöllősi, Peter J. Nelson, Peter Scheurich, Thomas Hehlgans, Daniela N. Männel  
(Manuskript in Vorbereitung)

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

---

Christoph Scherübl