

Untersuchungen zur biologischen Bedeutung des icp75TNF-Rezeptors in Maus und Mensch



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

**vorgelegt von
Andrea Hauser
aus Regensburg**

2005

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von September 2002 bis September 2005 unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Daniela N. Männel am Institut für Immunologie des Klinikums der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am:

16. November 2005

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Claudia Steinem

Prof. Dr. Daniela N. Männel

Prüfungsausschuß:

Prof. Dr. Armin Buschauer (Vorsitz)

Prof. Dr. Claudia Steinem

Prof. Dr. Daniela N. Männel

Prof. Dr. Jörg Heilmann

*Für meine Eltern
und meinen Bruder Markus
in Liebe und Dankbarkeit*

**Besser ist es, hinkend auf dem rechten Weg
zu gehen, als mit festem Schritt abseits.**

AUGUSTINUS

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	X
A Einleitung	1
1. Zytokine und ihre Rezeptoren	1
2. Die TNF-/TNF-Rezeptor-Superfamilie	3
3. TNF und seine Rezeptoren	5
3.1. Tumor Nekrose Faktor	6
3.2. Die TNF-Rezeptoren	8
3.2.1. Der p55TNF-Rezeptor	9
3.2.2. Der p75TNF-Rezeptor	10
4. TNF- und Anti-TNF-Therapie	12
4.1. TNF-Therapie	12
4.2. Anti-TNF-Therapie	13
B Material und Methoden	17
1. Material	17
1.1. Chemikalien und Reagenzien	17
1.2. Verbrauchsmaterial und Geräte	19
1.3. Kits	21
1.4. Molekulargewichtsstandards	21
1.5. Antikörper	21
1.6. Enzyme	22
1.7. Oligonukleotide	22
1.8. Plasmide	24
1.9. Puffer und Lösungen	25
1.10. Antikörper	29
1.11. Tiere	30
2. Methoden	31
2.1. Arbeiten mit Bakterien	
2.1.1. Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	31
2.1.2. Kultivierung von <i>E. coli</i>	31
2.1.3. Herstellung von Dauerkulturen	31
2.1.4. Herstellung von transformationskompetenten <i>E. coli</i> -Bakterien	31
2.1.5. Transformation von <i>E. coli</i>	31
2.1.6. Blau-Weiß-Selektion	31
2.2. Arbeiten mit RNA	32
2.2.1. Präparation von Gesamt-RNA	32

2.2.2.	Konzentrationsbestimmung der RNA	32
2.2.3.	Präparation von mRNA	33
2.3.	cDNA-Synthese	33
2.3.1.	cDNA-Synthese zum Nachweis des humanen icp75TNFR mittels RT-PCR	33
2.3.2.	cDNA-Synthese für die quantitative <i>Real Time</i> RT-PCR und den Nachweis des Maus-icp75TNFR	34
2.4.	<i>Ribonuclease Protection Assay</i> (RPA)	34
2.4.1.	Generierung der radioaktiv markierten RNA-Sonden	34
2.4.2.	Reinigung der radioaktiven Sonden	36
2.4.3.	Hybridisierung von RNA und Sonde	36
2.4.4.	Verdau und Aufarbeitung der Proben	37
2.4.5.	Auftrennung der Proben über ein Polyacrylamid-Gel	37
2.5.	RNA-Interferenz	38
2.5.1.	Theoretische Grundlagen	38
2.5.2.	Auswahl der Sequenz	39
2.5.3.	Klonierung der Konstrukte	39
2.6.	Arbeiten mit DNA	40
2.6.1.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
2.6.2.	Analytische und präparative Gelelektrophorese	41
2.6.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Klonierung	41
2.6.4.	Southern Blot	42
2.6.5.	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	43
2.6.6.	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme	43
2.6.7.	Ligation von DNA-Fragmenten	44
2.6.8.	Sequenzierung von Plasmid-DNA	44
2.6.9.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	45
2.7.	PCR zum Nachweis des humanen und des Maus-icp75TNFR	45
2.7.1.	Nachweis des humanen icp75TNFR mittels RT-PCR	45
2.7.2.	Nachweis des Maus-icp75TNFR mittels RT-PCR	46
2.7.3.	Quantitative <i>Real Time</i> RT-PCR	47
2.8.	Proteinchemische Methoden ⁴⁸	
2.8.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
2.8.2.	Coomassie-Färbung	49
2.8.3.	Western Blot	49
2.8.4.	Detektion membrangebundener Proteine durch Antikörper	50
2.8.5.	RIPA-Lyse	50
2.8.6.	Immunpräzipitation	50
2.9.	Zellbiologische Methoden	51
2.9.1.	Zellkulturbedingungen	51
2.9.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	51
2.9.3.	Bestimmung der Lebend-Zellzahl	52
2.9.4.	Mycoplasmentest	52
2.9.5.	TNF-induzierter Zytotoxizitäts-Test	52
2.9.6.	TNF-Zytotoxizitäts-Hemmtest mit löslichem humanen oder Maus-TNF	53
2.9.7.	TNF-Zytotoxizitäts-Hemmtest mit transmembranärem TNF	53
2.9.8.	Transfektion mit Hilfe kationischer Liposomen	54

2.9.9. Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation	54
2.9.10. Retrovirale Transduktion	55
2.9.11. Durchflusszytometrie	56
2.9.12. MACS-Reinigung	57
2.10. ELISA	58
2.10.1. ELISA zum Nachweis der micp-/p75TNFR-Ig-Fusionsproteine	58
2.10.2. ELISA für den Nachweis von mTNF	59
2.11. Fluoreszenzmikroskopie	59
2.11.1. Verwendete Filtersätze	59
2.11.2. Herstellung der Fixierlösung (Paraformaldehyd 4 %)	59
2.11.3. Immunhistochemische Färbung	60
2.12. Tierexperimente	60
2.12.1. Tierhaltung	60
2.12.2. D-Galactosamin-/LPS-induzierter Hepatotoxizitäts-Test	61
C Ergebnisse	62
1. Nachweis, Quantifizierung und funktioneller <i>knock down</i> des humanen icp75TNFR	62
1.1. Nachweis mittels RT-PCR und Southern-Hybridisierung	62
1.2. Nachweis des hicp75TNFR mittels <i>Ribonuclease Protection Assay</i> (RPA)	66
1.3. Nachweis und Quantifizierung des hip75TNFR mittels <i>Real Time</i> RT-PCR	69
1.3.1. Auswahl von Primern und Sonde für die quantitative <i>Real Time</i> RT-PCR	69
1.3.2. Nachweis des humanen icp75TNFR mit spezifischen TaqMan-Assays	71
1.4. Funktioneller <i>knock down</i> des humanen icp75TNFR durch RNA-Interferenz	72
1.4.1. Auswahl der für hicp75TNFR spezifischen shRNA und Klonierung des RNAi-vermittelnden Vektors	72
1.4.2. Einsatz der hicp- und p75TNFR-spezifischen shRNA in der quantitativen <i>Real Time</i> RT-PCR	74
1.4.3. Einsatz der hicp- und p75TNFR-spezifischen shRNAs in der Durchflusszytometrie	75
2. Nachweis, Quantifizierung und Charakterisierung des icp75TNFR in der Maus	77
2.1. Nachweis des micp75TNFR mittels RT-PCR und anschließender Southern Hybridisierung	78
2.1.1. Nachweis des micp75TNFR in Tumorzelllinien	78
2.1.2. Nachweis der micp75TNFR nach Induktion D-Galaktosamin-/LPS-vermittelter Hepatotoxizität	80
2.1.3. Nachweis des micp75TNFR in primären CD8 ⁺ T-Zellen	81
2.2. Nachweis und Quantifizierung des mcip75TNFR mittels <i>Real Time</i> RT-PCR	83
2.2.1. Auswahl von Primern und Sonde für die quantitative <i>Real Time</i> RT-PCR	83
2.2.2. Nachweis in Tumorzelllinien	84
2.2.3. Nachweis nach Induktion D-Galaktosamin-/LPS-vermittelter Hepatotoxizität	85
2.2.4. Nachweis in primären CD8 ⁺ T-Zellen	86
2.3. Charakterisierung des micp75TNFR	86

2.3.1.	Klonierung von Fusionsproteinen aus EYFP und den mp75TNFR-Isoformen mit humaner c-myc-Markierung	86
2.3.2.	Biochemische Charakterisierung des micp75TNFR	88
2.3.3.	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des micp75TNFR	89
2.3.4.	Untersuchung zur Membranexpression des micp75TNFR	90
2.3.5.	Untersuchung zur Prozessierung von löslichem micp75TNFR	91
2.3.6.	Rolle des micp75TNFR im TNF-induzierten Zytotoxizitätstest	94
2.3.7.	Untersuchungen zur Ligandbindung des micp75TNFR	96
2.3.7.1.	Bindung des micp75TNFR an lösliches TNF	99
2.3.7.2.	Bindung des micp75TNFR an membranständiges TNF	100
D	Diskussion	105
1.	Nachweis des humanen icp75TNFR	106
1.1.	Nachweis mittels RT-PCR	106
1.2.	Nachweis mittels <i>Ribonuclease Protection Assay</i>	107
1.3.	Nachweis mittels quantitativer <i>Real Time</i> RT-PCR	109
2.	Funktioneller <i>knock down</i> des hicp75TNFR mittels RNAi	111
3.	Die Rolle von Alu-Elementen in der Entstehung neuer Gene	115
4.	Nachweis des icp75TNFR in der Maus	118
5.	Charakterisierung des micp75TNFR	121
E	Zusammenfassung	128
F	Literaturverzeichnis	130
	Danksagung	143
	Erklärung	145

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMV	<i>Avian Myoblastosis Virus</i>
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
ARE	AU-reiches Element
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinder Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Ci	Curie
c-IAP	<i>cytosolic inhibitor of apoptosis</i>
CRD	<i>cysteine-rich domain</i>
C _t	<i>threshold cycle</i>
Da	Dalton
DD	<i>death domain</i> (Todesdomäne)
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonucleosid-triphosphat

ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent-assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FAM	6-Carboxyfluoreszein
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>granulocyte-/macrophage-colony stimulating factor</i>
h	Stunde
HACA	human anti-chimär Antikörper
HAHA	human anti-human Antikörper
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
I κ B	<i>inhibitory κB</i>
IKK	<i>inhibitory κB kinase</i> (Inhibitor- κ B-Kinase)
IL	Interleukin
ILP	<i>isolated limb perfusion</i> (isolierte Extremitäten-Perfusion)
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-thio-Galaktosid
JNK	<i>c-Jun NH₂-terminal kinase</i>

kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria Broth</i> , Bakterienmedium
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
LT	Lymphotoxin
m	aus der Maus oder milli (10^{-3}) oder Meter
M	molar (mol/l)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
MCS	<i>multiple cloning site</i>
M-CSF	<i>macrophage-colony stimulating factor</i>
memTNF	membranständiges (26 kDa) TNF
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
miRNA	micro RNA
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Multiple Sklerose
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid
neo	Neomycin
NF- κ B	<i>nuclear factor</i> κ B (Nukleärer Faktor κ B)
NOD	<i>non-obese diabetic</i>
nt	Nukleotide
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
NZB/W	<i>New Zealand Black/White</i>
OD	optische Dichte
oligo-dT	oligo-Desoxythymidin
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered salt solution</i>

	(phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
PLAD	<i>pre-ligand binding assembly domain</i>
r	rekombinant
RIP	<i>receptor interacting protein</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RPA	<i>Ribonuclease Protection Assay</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
s	<i>soluble</i> (löslich)
s.	siehe
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SINE	<i>short interspersed nuclear element</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
spez.	spezifisch
SSC	<i>sideward scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
T	Thymin
TACE	<i>TNF-alpha converting enzyme</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
sTNF	lösliches TNF
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TRADD	<i>TNF-receptor-associated death domain</i>
TRAF	<i>TNF-receptor-associated factor</i>
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand

TWEAK	TNF-like weak inducer of apoptosis
UV	ultraviolette Strahlung
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
z.B.	zum Beispiel

A Einleitung

Die Geschichte des Tumor Nekrose Faktors (TNF) nahm ihren Anfang bereits vor über einem Jahrhundert mit der Beobachtung des deutschen Arztes P. Bruns, der im Jahr 1888 von einer Tumorrogression bei Patienten nach bakterieller Infektion berichtete (Aggarwal, 2003). Mittlerweile listet die Publikationsdatenbank PubMed über 50 000 Treffer unter dem Stichwort TNF und in der Tat hat die Erforschung der zahlreichen TNF-vermittelten Effekte sowie der zu Grunde liegenden Mechanismen einen enormen Fortschritt erzielt. Trotzdem werden auch heute noch immer neue Aspekte von TNF entdeckt und vermutlich müssen noch erheblich mehr Informationen gewonnen werden, um ein volles Verständnis der TNF-Biologie zu erlangen.

1. Zytokine und ihre Rezeptoren

Zytokine sind Proteine, die sowohl von Zellen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems sezerniert werden und zahlreiche Funktionen dieser Zellen vermitteln. Dabei ist ihre Sezernierung ein kurzes und meist selbst limitierendes Ereignis, wobei die Synthese von Zytokinen üblicherweise durch eine *de novo* Transkription der entsprechenden Gene initiiert wird und die resultierenden Proteine dann relativ rasch und nur für einen kurzen Zeitraum aus der Zelle ausgeschleust werden. Bezüglich ihrer Funktion sind die meisten Zytokine durch einen enormen Pleiotropismus und große Redundanz gekennzeichnet. Das bedeutet, dass sie zum einen auf unterschiedliche Zelltypen wirken und dadurch verschiedene Effekte auslösen können, zum anderen kann aber die distinkte Wirkung eines bestimmten Zytokines durch andere ersetzt werden. Beide Eigenschaften erschweren enorm den Einsatz einer Zytokin- oder Antizytokintherapie, denn durch den Pleiotropismus ist immer mit einer Fülle von Nebeneffekten beim Einsatz oder Ausschalten eines speziellen Zytokins zu rechnen. Die Redundanz kann andererseits dazu führen, dass das Entfernen eines Zytokins aus dem komplexen Zusammenspiel im Organismus keine oder kaum Auswirkungen zeigt, weil die Funktionen anderweitig kompensiert werden können. Abgesehen von den beschriebenen Effekten beeinflussen sich Zytokine sehr stark untereinander, was zu additiven, synergistischen oder sogar antagonistischen Mechanismen führen kann. Ihre Wirkung bleibt dabei nicht unbedingt

auf die nähere Umgebung der produzierenden Zelle beschränkt, sondern kann im Extremfall, meist in biologischen Stresssituationen, endokrinen Charakter aufweisen. Ein weiteres Charakteristikum der Zytokine ist schließlich die Vermittlung ihrer Effekte über spezifische, membranständige Rezeptoren auf den jeweiligen Zielzellen. Die Bindung an die jeweiligen Rezeptoren weist dabei sehr hohe Affinitäten auf (K_d -Werte von 10^{-10} bis 10^{-12} M), wodurch schon geringste Zytokinmengen ausreichen, um biologische Effekte erzielen zu können (Abbas, 2000).

Die Zytokinrezeptoren sind alle über eine Transmembrandomäne in der Plasmamembran verankert und bilden mit der Extrazellulärdomäne die Bindungsstelle für das jeweilige Zytokin. Durch Bindung des Liganden wird typischerweise ein *clustern* der Rezeptoren ausgelöst, wodurch es zur intrazellulären Signaltransduktion kommt. Die Einteilung der Zytokinrezeptoren basiert auf strukturellen Homologien der Extrazellulärdomänen und resultiert in fünf unterschiedlichen Familien.

Die Rezeptoren, die zur ersten Familie gehören, werden als Typ I Zytokinrezeptoren bezeichnet. Sie enthalten extrazellulär mindestens ein Motiv aus zwei konservierten Cysteinpaaren, sowie proximal zur Membran einen kurzen Sequenzabschnitt aus Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin (WSXWS), wobei X eine beliebige Aminosäure sein darf. Diese Gruppe an Rezeptoren bindet über die genannten, konservierten Strukturen Zytokine, die sich in 4 α -Helices falten. Die Spezifität für die Bindung eines bestimmten Zytokins wird dann über andere Bereiche der Extrazellulärdomäne vermittelt. Prominente Vertreter dieser Gruppe sind die Rezeptoren für IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, für GM-CSF und Prolaktin.

Die Gruppe der Typ II Zytokinrezeptoren ähnelt sehr stark der vom Typ I, besitzt aber nicht die WSXWS-Sequenz. Vertreter dieser Gruppe sind die Rezeptoren für IFN- α/β , IFN- γ und IL-10.

Einige Rezeptoren enthalten in ihrer Extrazellulärdomäne Immunglobulin (Ig)-Domänen, weshalb sie zur sogenannten Ig-Superfamilie gerechnet werden. Zu dieser Gruppe zählt man sowohl die beiden Rezeptoren von Interleukin 1, als auch die Rezeptoren von M-CSF und SCF.

Die Rezeptoren für Chemokine bilden ebenfalls eine eigenständige Gruppe, die sich durch sieben transmembranäre α -Helices auszeichnet, was der Gruppe ihren Namen „Siebenspänner“ gibt. Wie in anderen Bereichen der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung

diesen Typs, so wird auch bei Bindung der Chemokine an ihre Rezeptoren die Signaltransduktion über G-Proteine vermittelt.

Die fünfte Gruppe wird schließlich von der TNF-Rezeptor-Superfamilie gebildet, die sich durch konservierte Cystein-reiche Domänen (*cystein-rich domains*, CRD) auszeichnet. Nach Aktivierung der Rezeptoren werden verschiedene Adapterproteine rekrutiert, die Apoptose auslösen oder Genexpression stimulieren (Abbas, 2000, Ibelgaufs, 2004).

2. Die TNF-/TNF-Rezeptor-Superfamilie

Nachdem Lymphotoxin (LT) und der Tumor Nekrose Faktor / Kachektin identifiziert (Carswell, 1975, Williams, 1968) und darauf folgend ihre cDNAs kloniert wurden (Aggarwal, 1985, Beutler, 1985, Pennica, 1984), hatte man damit die Prototypen einer neuen Genfamilie entdeckt, die mittlerweile auf Ligandseite 19 und auf der korrespondierenden Rezeptorseite 29 Mitglieder umfasst. Dabei interagieren membran-gebundene sowie lösliche Liganden mit einem oder mehreren spezifischen Rezeptoren, die ebenfalls membranständig oder löslich sein können. Das Ligand-Rezeptor-System vermittelt unterschiedliche physiologische Effekte, die von Proliferation und verbessertem Überleben von Zellen, über Zell-Differenzierung bis hin zur Induktion von Apoptose reichen. Andererseits vermögen einige Mitglieder der TNF-/TNFR-Superfamilie, darunter vor allem TNF, auch die Induktion pathophysiologischer Prozesse wie septischem Schock, Kachexie, Kanzerogenese und Autoimmunität (Aggarwal, 2002). Die übergeordnete Aufgabe scheint aber in der Koordination des Immunsystems zu liegen, in dem durch schnelle und potente Induktion von entsprechenden Signalkaskaden die Proliferation und Protektion der Zellen vermittelt werden kann, die für die Reaktion auf und Elimination von Pathogenen verantwortlich sind (Locksley, 2001).

Die Liganden der TNF-Superfamilie werden, bis auf zwei Ausnahmen (LT_{α} und TWEAK), als Typ II Transmembranproteine synthetisiert. Sie sind durch diese Lokalisierung auf der Membran für die proteolytischen Enzyme vornehmlich der Metalloprotease-Klasse zugänglich und einige können daher durch Abspaltung der Ektodomäne in ihre lösliche Form prozessiert werden (Idriss, 2000). Dies geschieht aber häufig nur unter nicht physiologischen Bedingungen, was den eigentlich lokalen Wirkmechanismus der Rezeptor-Ligand-Interaktion unterstreicht. So sind dann auch

messbare Serumspiegel an löslichen Liganden häufig mit pathologischen Zuständen verbunden (Aggarwal, 2003). Biologisch aktiv sind die Liganden der TNF-Superfamilie als nicht kovalent gebundene Homo- und Heterotrimere, die unabhängig vom jeweiligen Rezeptor selbständig assoziieren. Dadurch wird auch auf Rezeptorseite eine Trimerisierung initiiert oder es kommt zur Konformationsänderung bereits vorgeformter Rezeptormultimere, wie dies für Rezeptoren mit einer *pre-ligand-binding assembly domain* (PLAD), darunter beide TNF-Rezeptoren und CD40, gezeigt werden konnte (Chan, 2000).

Die Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie werden als Typ I Transmembranproteine exprimiert und können auf Grund ihrer intrazellulären Strukturen und den damit verbundenen Signalkaskaden in drei Gruppen eingeteilt werden. Die bekannteste ist wohl die Gruppe der Todesrezeptoren (*death receptors*, DR), die eine 60 bis 80 Aminosäuren umfassende Domäne enthalten, welche als Todesdomäne (*death domain*, DD) bezeichnet wird (Itoh, 1993, Tartaglia, 1993a) und über die nach homophiler Anlagerung weiterer DD-enhaltender zytosolischer Proteine (z.B. TRADD, FADD oder RIP) proteolytische Kaspasen aktiviert und programmierter Zelltod (Apoptose) induziert werden kann. Die prominentesten Vertreter der Todesrezeptoren sind wohl der p55TNFR/TNFR1/CD120a und Fas/CD95/Apo1, anhand derer ursprünglich auch die Relevanz der DD für die Induktion von Zelltod gezeigt werden konnte.

Die Gruppe der *Non-DD*-Rezeptoren zeichnet sich durch intrazelluläre Sequenzhomologien aus, an die TNF-Rezeptor assoziierte Faktoren (*TNF-receptor associated factors*, TRAFs) binden können und die daher als TRAF-Domäne bezeichnet werden. Erstmals beschrieben wurden sie nach Charakterisierung des p75TNFR und seinen Adaptorproteinen TRAF1 und TRAF2 (Rothe, 1994). Bisher sind sechs solcher TRAF-Moleküle beschrieben worden, die durch Anlagerung weiterer Proteine unterschiedliche Effekte auslösen können, wohl aber nur in Ausnahmefällen die direkte Induktion von Apoptose. Allerdings kann durch Aktivierung der Rezeptoren eine Induktion von Liganden wie TNF, FasL oder TRAIL verursacht werden, die ihrerseits durch Bindung an ihren jeweiligen Todesrezeptor Apoptose auslösen können (Grell, 1999, Vercammen, 1995).

Schließlich beinhaltet die TNFR-Superfamilie die Gruppe der sogenannten Decoy-Rezeptoren, die auf Grund einer fehlenden Intrazellulärdomäne nicht zur Signal-

transduktion befähigt sind. Sie dienen vermutlich dem Abfangen der Liganden und stellen damit kompetitive Hemmer der korrespondierenden *signaling*-kompetenten Rezeptoren dar.

3. TNF und seine Rezeptoren

TNF ist eines der zentralen Zytokine der angeborenen Immunität und vermittelt seine biologische Wirkung über zwei Rezeptoren, TNFR1, der 55 kDa schwer ist und daher auch als p55TNFR (CD120a/TNFRSF1A) bezeichnet wird, sowie der etwas schwerere TNFR2, dessen Molekulargewicht bei 75 kDa liegt und der daher auch unter dem Namen p75TNFR (CD120b/TNFRSF1B) in die Literatur eingegangen ist.

Eine Übersicht über die Moleküle des TNF-/TNF-Rezeptor System ist in folgender Abbildung dargestellt.

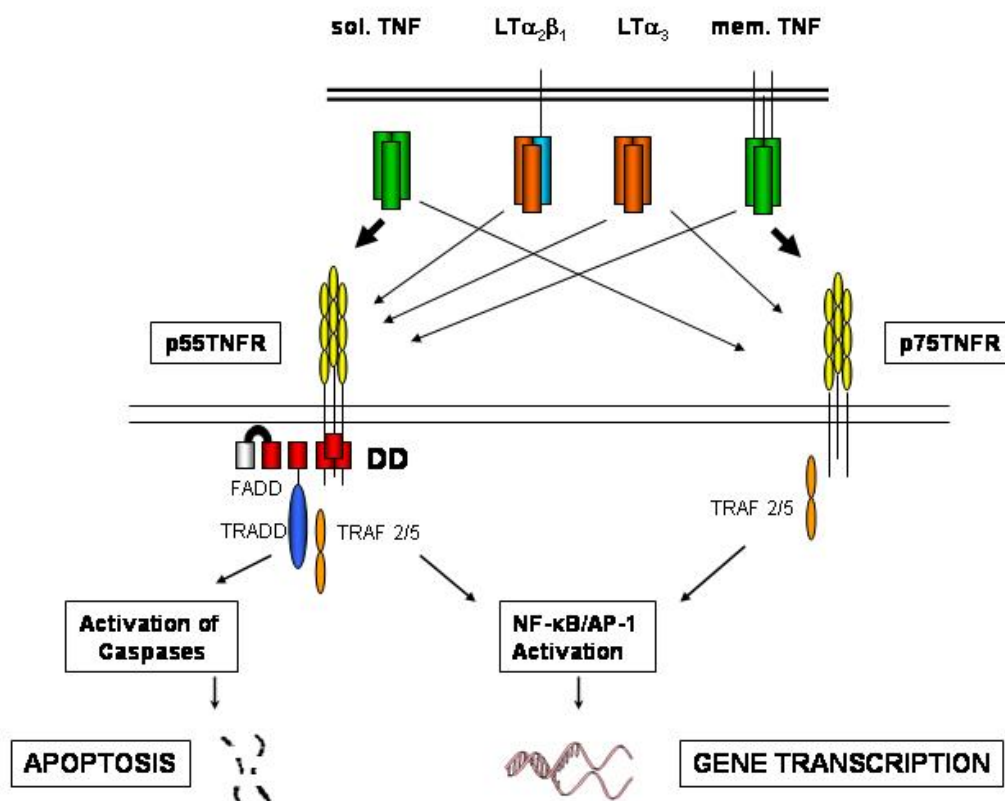


Abb. 1: Übersicht über die Moleküle des TNF/TNF-Rezeptor-Systems. Neben TNF bindet auch $LT\alpha_3$ an beide TNF-Rezeptoren, das Heterotrimer $LT\alpha_2\beta_1$ dagegen nur an den p55TNFR. Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit wurden nicht alle an der Signaltransduktion beteiligten Proteine in die Abbildung mit aufgenommen. TRADD: TNF-Rezeptor assoziierte DD; FADD: Fas assoziierte DD; LT: Lymphotoxin

3.1. Tumor Nekrose Faktor

Anhand gentechnisch veränderter Mäuse wird deutlich, welche ambivalente Rolle TNF im Organismus spielt. So weisen Mäuse, die gendefizient für TNF sind, Probleme bei der Kontrolle und Beseitigung mikrobieller Infektionen auf (Marino, 1997). Dies äußert sich im Human-System durch eine erhöhte Anfälligkeit für die Reaktivierung von Tuberkulose während einer Anti-TNF-Therapie (Berg, 2004). Andererseits zeigen Mäuse, die transgen für den TNF-Genlocus sind, die Gefahr einer Überexpression dieses Zytokins in Form eindeutiger Anzeichen von chronisch entzündlichen Erkrankungen (Butler, 1997). Durch diese gegenläufigen Effekte wird klar, warum TNF nicht konstitutiv exprimiert wird, sondern seine Synthese einer starken Regulation unterworfen ist (Aggarwal, 1996).

Das Gen für humanes TNF liegt, wie auch das für $LT\alpha$, auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (Chromosom 17 in der Maus) (Ware, 2005) im Bereich des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC). Beide Gene sind ungefähr 3000 Basenpaare lang und von drei Introns unterbrochen (Nedwin, 1985, Spies, 1989). Ausgehend von einer ca. 1500 bp langen mRNA, wird humanes TNF vor allem von aktivierten Monozyten und Makrophagen (Higuchi, 1990, Männel, 1980) aber auch von zahlreichen anderen Zellen, zunächst als 26 kDa schweres Transmembranprotein translatiert (memTNF) (Kriegler, 1988), kann aber durch proteolytische Spaltung ebenfalls membranständiger Metalloproteasen in eine lösliche Form von 17 kDa prozessiert werden (*soluble* TNF, sTNF). Die wichtigste, zur ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*)-Familie gehörende Protease für diesen als *shedding* bezeichneten Prozess ist TACE (*TNF- α converting enzyme*), auch unter der Bezeichnung ADAM17 bekannt (Black, 1997, Moss, 1997). Trotz der möglichen Überführung in die lösliche Form, kann unter physiologischen Bedingungen praktisch kein TNF im Serum nachgewiesen werden. Dies ändert sich unter pathophysiologischen Bedingungen, vor allem durch Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) oder anderen bakteriellen Produkten, sowie gram-positiven und gram-negativen Bakterien, dramatisch (Nachweis im nM Bereich) und kann durch die eigene Wirkung noch weiter verstärkt werden. So gilt TNF im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen als Schlüsselmolekül bei der Entstehung des septischen Schocks (Männel, 2000). Im Gegensatz zu den überschießenden TNF-Spiegeln in der Sepsis, wird durch eine langanhaltende Exposition geringerer TNF-Konzentrationen Kachexie vermittelt. Dieses

vor allem bei Tumorpatienten zu beobachtende, durch starken Gewichtsverlust gekennzeichnete Syndrom, war parallel zur Tumornekrose der erste für TNF beschriebene Effekt und zunächst einem als Kachektin bezeichneten Protein zugeschrieben worden, das sich durch Aufklärung der Sequenz aber als identisch mit TNF erwies (Beutler, 1985). Weitere, mit detektierbaren TNF-Plasmaspiegeln verbundene Erkrankungen sind bakterielle Meningitis, Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Multiple Sklerose, GvHD (*Graft-versus-Host-Disease*), Transplantatabstoßungen (Herz, Niere), akutes Lungen- und Leberversagen, sowie Herzinsuffizienz (NYHA III-IV) und Herzinfarkt (Eigler, 1997). Interessanterweise führen schon kleinere Veränderungen am TNF-Molekül zur Entstehung TNF-vermittelter Krankheitsbilder. Exprimiert man beispielsweise gelenkspezifisch eine Mutante von TNF, der die Aminosäuren 1 bis 12 (Δ 1-12) fehlen und damit eine der Schnittstellen für TACE, in Mäusen, so erkrankten die Tiere in Folge dieser Expression an kaum noch prozessierbarem TNF an Arthritis (Alexopoulou, 1997). Dies unterstreicht zudem die Rolle von transmembranärem TNF (pro-TNF) als *signaling*-kompetentem Liganden, der nicht nur als Vorstufe der löslichen Variante gesehen werden kann. Eine zweite Veränderung am TNF-Molekül betrifft den Bereich der *AU-rich elements* (ARE) der 3' untranslatierten Region der mRNA, der für die relative Instabilität des Transkriptes verantwortlich ist (Ruuls, 1999). Interferiert man in Mäusen mit diesen AREs, kommt es zu einer erhöhten Stabilität und in der Folge zu erhöhten Proteinspiegeln an TNF in den Fibroblasten. Daraus resultiert die Entstehung klinischer Anzeichen von Arthrose und Colitis, die interessanter Weise verschwinden, wenn man diese Mäuse auf einen p75TNFR^{-/-} Hintergrund rückkreuzt (Kontoyiannis, 1999). Dies deutet wiederum auf eine wichtige Rolle des p75TNFR in chronisch entzündlichen Erkrankungen hin.

Die für die TNF-Superfamilie beschriebene Vermittlung unterschiedlicher Effekte wie Überleben, Aktivierung, Differenzierung und programmierter Zelltod, vereinigt sich im Falle des pleiotropen TNF in einem einzigen Molekül. Ein ähnlich funktioneller Antagonismus wie die Induktion von Zelltod und Überleben, wird innerhalb der TNF-Superfamilie nur noch für den eng verwandten Liganden TRAIL beschrieben (Wajant, 2003). TNF bewirkt in den Zielzellen, abhängig vom jeweiligen Rezeptor (p55- oder p75TNFR) und anderen Regulationsmechanismen, wie dem physiologischen Zustand der Zelle, die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden. Zu den wichtigsten zählen dabei die Aktivierung der MAP- (*mitogen-activated protein*) Kinasen p38 und JNK (*cJun N*-

terminal kinase), wodurch entweder proinflammatorische oder Proliferations-assoziierte Gene induziert werden. Des Weiteren die Aktivierung von Caspasen, vor allem Caspase 3 und 8, durch die in den Zellen Apoptose ausgelöst wird und schließlich der NF- κ B Signalweg, über den anti-apoptotische Schutzgene wie c-IAP (*cellular inhibitor of apoptosis protein*) 1 und 2, sowie Mitglieder der Bcl-2 Familie, exprimiert werden, aber auch proinflammatorische Entzündungsgene. Erwähnenswert ist noch die systemische Wirkung von TNF als endogenes Pyrogen, wodurch es unter Entzündungsbedingungen zur Freisetzung von Prostaglandinen und damit zur Entstehung von Fieber kommt.

Alles in allem wird dadurch die zentrale Rolle von TNF als pleiotropes Zytokin im Organismus unterstrichen.

3.2. Die TNF-Rezeptoren

Erst einige Jahre nach TNF sind auch seine beiden Rezeptoren, TNFR1/p55TNFR und TNFR2/p75TNFR, sowohl für den Menschen (Loetscher, 1990, Smith, 1990) als auch für die Maus (Goodwin, 1991, Lewis, 1991) kloniert worden. Sie verfügen über eine Sequenzhomologie von 28 %, die sich vornehmlich auf die Extrazellulärdomäne mit den jeweils 4 konservierten Cystein-reichen Domänen (CRD) erstreckt. Die intrazelluläre Sequenz ist weitgehend unterschiedlich und weist praktisch keine Homologie auf (MacEwan, 2002). Wie bereits erwähnt, besitzen beide Rezeptoren in ihrer Extrazellulärdomäne die sogenannte PLAD und liegen daher schon vor Bindung des Liganden in der Membran als Homomultimere vor (Chan, 2000). Nach Bindung des Liganden kommt es dann zur Clusterbildung und damit zur Initialisierung von entsprechenden Signalkaskaden. Die Affinität von TNF zu seinen Rezeptoren variiert abhängig davon, ob es sich um das lösliche 17 kDa oder das transmembranäre 26 kDa TNF handelt. Experimentell ermittelte Daten zeigen für lösliches TNF eine wesentlich kleinere Dissoziationskonstante und damit stärkere Bindung für den p55TNFR ($K_d \approx 20$ pM) als für den p75TNFR ($K_d \approx 300$ pM) (Grell, 1995a), wohingegen membranständiges TNF affiner für den p75TNFR ist (Grell, 1995b). Zur unterschiedlichen Affinität für sTNF kommt eine deutlich unterschiedliche Kinetik der Bindung, die für den p55TNFR mit einer Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 33 Minuten und für den p75TNFR mit $t_{1/2} < 2$ Minuten angegeben wird (Grell, 1998b, Krippner-Heidenreich, 2002). Dies führte zur Hypothese, dass der p75TNFR durch die schnelle Assoziations-/Dissoziations-Kinetik der TNF-

Bindung den Liganden zunächst festhält, dadurch seine lokale Konzentration erhöht und ihn dann an den p55TNFR weitergibt. Der Prozess wurde als *ligand-passing* bezeichnet (Tartaglia, 1993b) und stützt sich auf die Tatsache, dass über p55TNFR ausgelöste Apoptose in Gegenwart des p75TNFR sehr viel stärker abläuft. Mittlerweile haben sich aber auch zwei andere, eng miteinander verbundene Mechanismen herauskristallisiert, die ebenfalls die p75TNFR-abhängige Verstärkung des p55TNFR-induzierten Zelltodes erklären. Zum einen spielt dabei die Konkurrenz der beiden Rezeptoren um die Bindung von TRAF2 eine Rolle, aus der eine Anlagerung der anti-apoptotischen Proteine cIAP1 und 2 resultiert (Wajant, 2003). Darüberhinaus konnte für cIAP1 die Initiierung der Ubiquitinylierung und folgende proteasomale Degradierung von TRAF2 gezeigt werden (Li, 2002), was wiederum die Konkurrenz um verbleibendes TRAF2 erhöht. Schließlich führt in einigen Zellen die Aktivierung des p75TNFR zur Induktion von endogenem TNF, welches wiederum den p55TNFR aktiviert und daher auch auf die Weise den induzierten Zelltod verstärkt (Grell, 1999, Vercammen, 1995).

Alles in allem spricht vieles für einen starken *crosstalk* der beiden Rezeptoren und die früher verbreitete Meinung, TNF vermittele seine Effekte hauptsächlich über den p55TNFR, beruht eventuell auf der weitgehenden Verwendung von löslichem TNF in *in vitro* Experimenten, wodurch die Relevanz des p75TNFR unter Umständen unterschätzt wird (Wajant, 2003).

Trotz dieses Zusammenspiels beider Rezeptoren, vermitteln aber beide auch unabhängig voneinander distinkte Effekte, auf die im Folgenden jeweils kurz eingegangen werden soll.

3.2.1. Der p55TNF-Rezeptor

Die wohl augenscheinlichsten Unterschiede zwischen beiden TNF-Rezeptoren sind zum einen die konstitutive Expression des p55TNFR auf fast allen Zellen des Organismus und zum anderen die Existenz einer Todesdomäne im carboxyterminalen Abschnitt des Rezeptors, worüber die Rekrutierung von Caspasen ermöglicht wird (Boldin, 1995). Trotzdem kann neben programmiertem Zelltod auch der NF- κ B-Signalweg und damit die Induktion anti-apoptotischer Schutzgene ausgelöst werden. Beide Vorgänge können verschiedenen Kompartimenten der Zelle zugeordnet werden. Während die Aktivierung von NF- κ B ein frühes Ereignis nach Stimulierung des Rezeptors ist und an der Plasma-

membran stattfindet, erfordert die Caspasen-induzierte Vermittlung von Zelltod die Internalisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes (Schneider-Brachert, 2004).

Auch im Falle des p55TNFR verdeutlicht die Phänotypisierung der gendefizienten Maus die Bedeutung des Rezeptors. Mäuse die keinen funktionellen p55TNFR exprimieren können, erweisen sich als resistent gegenüber LPS vermitteltem Schock, sind aber in der Abwehr von Pathogenen beeinträchtigt (Pfeffer, 1993, Rothe, 1993), wie auch in der Entwicklung der B-Zell-Areale in den sekundären lymphatischen Organen (Pasparakis, 1997). Dagegen ist die Anlage der Peyerschen Plaques nicht beeinträchtigt. An Hand von Mutationen in der Extrazellulärdomäne des p55TNFR, wie sie bei einigen Patienten nachgewiesen werden konnten und die dazu führen, dass der Rezeptor nicht mehr proteolytisch gespalten werden kann, lässt sich auch hier die Konsequenz einer funktionellen Überexpression des Rezeptors beobachten. Durch den Verlust eines Regulationsmechanismus der Rezeptor-Ligand-Interaktion kommt es zu Entzündungen und immer wiederkehrenden Fieberschüben, eine Erkrankung, die als *tumor-necrosis-factor receptor-associated periodic syndrome* bezeichnet wurde (Aksentijevich, 2001). Anders als beim TNF, sind messbare Serum-Spiegel an löslichem Rezeptor auch unter physiologischen Bedingungen normal, die Konzentrationen steigen aber im Zuge pathologischer Prozesse wie septischem Schock oder Rheuma stark an (Cope, 1992, Schroder, 1995). In den zahlreichen Signalwegen, die für den p55TNFR beschrieben wurden, spiegelt sich die Vielzahl der bekannten TNF-Effekte wider. Die für TNF beschriebene Aktivierung des MAPK-Weges, die schon erwähnte Aktivierung von Caspasen und damit die Induktion von Zelltod, sowie das Auslösen des klassischen anti-apoptotischen und pro-inflammatorischen NF- κ B-Signalweges, werden über den p55TNFR vermittelt. Dabei hängt die Entscheidung über Leben und Tod von der Balance zwischen den beiden konträren und sich gegenseitig inhibierenden Mechanismen ab. Klar ist jedoch, dass in vivo die Induktion des NF- κ B-Signalweges über die der Apoptose dominiert, anders als bei Fas/CD95, der vor allem Zelltod induziert.

3.2.2. Der p75TNF-Rezeptor

Ein Charakteristikum des p75TNFR ist die starke Reglementierung seiner Expression, die im Allgemeinen auf Zellen des Immunsystems beschränkt bleibt und durch pro-inflammatorische Zytokine, LPS und auch Noxen wie Hypoxie induziert wird (Seitz, 1998). Eine erhöhte Expression des Rezeptors lässt sich beispielsweise bei Patienten mit

chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Holtmann, 2002), sowie im entsprechenden Maus-Modell (Mizoguchi, 2002) und nach Schlaganfall und Herzinfarkt (Semenza, 1998) nachweisen. Die p75TNFR^{-/-} Maus zeigt dagegen keinen so deutlichen Phänotyp wie die TNF- und p55TNFR-gendefizienten Mäuse. Es konnte aber eine verringerte Sensitivität der T-Lymphozyten gegenüber TNF-Toxizität nachgewiesen werden (Erickson, 1994). Weiter wird dem Rezeptor eine entscheidende Rolle in der Thymozytenproliferation (Grell, 1998a), der Differenzierung und Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Mason, 1995), sowie als kostimulatorisches Molekül der T-Zell-Aktivierung zugeschrieben (Aspalter, 2003, Kim, 2004). Obwohl durch das Fehlen einer Todesdomäne die direkte Induktion von Caspasen-vermitteltem Zelltod nicht plausibel erscheint, konnte dies für T-Lymphozyten gezeigt werden, die durch Antigen-Kontakt aktiviert wurden. Durch die Rekrutierung von TRAF2 konnte eine Bindung der DD-haltigen Proteinkinase RIP1 nachgewiesen werden, über die wiederum die Interaktion mit FADD und dadurch die Aktivierung von Caspasen vermittelt wird (Pimentel-Muinos, 1999). Es handelt sich bei diesem Prozeß um ein gerichtetes Ausschalten klonal expandierter Lymphozyten-Populationen und damit einem Mechanismus der adaptiven Immunantwort, wie überhaupt die Rolle des p75TNFR eher diesem Teil des Immunsystems zuzuordnen ist, im Gegensatz zum p55TNFR, der die angeborene Immunität entscheidend beeinflusst. Die direkte Induktion von Apoptose über den p75TNFR wurde ebenfalls mehrfach beschrieben (Declercq, 1995, Depuydt, 2005, Heller, 1992). Die Rolle des p75TNFR auf humanen CD4⁺/CD25⁺ regulatorischen T-Zellen, wo das Protein im Vergleich zu herkömmlichen CD4⁺ T-Zellen deutlich hochreguliert ist, ist bislang völlig unklar (Annunziato, 2002).

Interessanterweise wurde im letzten Jahr zusätzlich zu der von uns entdeckten und in der vorliegenden Arbeit beschriebenen alternativen Spleiss-Varinate des p75TNFR eine zweite beschrieben, die für eine lösliche Form des Rezeptors kodiert (Lainez, 2004). Sie entsteht durch Herausspleissen der Exone 7 und 8, was zum Verlust der Transmembrandomäne führt und in der Folge auch der Intrazellulärdomäne, da durch die resultierende Verschiebung des Leserasters ein vorzeitiger Abbruch der Translation verursacht wird. Diese Variante des löslichen p75TNFR wird sezerniert und hat einen Anteil von ca. 45 % an der Gesamtmenge des detektierbaren löslichen p75TNF-Rezeptors im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis.

4. TNF- und Anti-TNF-Therapie

4.1. TNF-Therapie

Mit der Beschreibung und Erforschung des Tumor Nekrose Faktors ging von Anfang an die Hoffnung auf eine effektive Tumor-Therapie einher. Ohne die aktive Komponente seines Bakterienextraktes zu kennen, setzte Willam Coley, ein New Yorker Chirurg und Pionier der Krebs-Therapie, schon Ende des 19. Jahrhunderts das nach ihm benannte „Coley’s toxin“ bei Patienten ein (Coley, 1893, Coley, 1896). Er löste dadurch hohes Fieber aber in einigen Fällen auch Tumornekrose von Sarkomen, Karzinomen und Lymphomen aus. Der beschriebene Effekt wird heute zumindest teilweise der durch die Bakterien-Mixtur verursachten TNF-Freisetzung aus aktivierten Makrophagen zugeschrieben. Nach der Entdeckung und Klonierung von TNF in den achtziger Jahren begannen klinische Experimente mit einer systemischen TNF-Gabe, die in den meisten Fällen durch eine fehlende Tumor-Reaktion aber häufig durch schwerste Nebenwirkungen charakterisiert waren. Mittlerweile wird die TNF-Therapie erfolgreich in der isolierten Extremitäten-Perfusion (*isolated limb perfusion*, ILP) eingesetzt (Eggermont, 1997, Lejeune, 2001), die 1998 von der EMEA (*European Medicine Evaluation Agency*) für Europa zur Behandlung nicht resezierbarer Weichteilsarkome zugelassen wurde. Durch eine Trennung der Kreisläufe kann in den Extremitäten eine bis zu 200-fach erhöhte TNF-Konzentration im Vergleich zum Körperkreislauf erreicht werden. Der erzielte anti-tumorale Effekt ist dabei hauptsächlich mit der Wirkung des TNF auf die Blutgefäße des Tumors assoziiert und weniger mit einem direkten Einfluß auf die Tumorzellen selbst. Die in Tumor-Endothelzellen induzierte Apoptose zerstört aber nicht nur das Tumor-Gefäßsystem, sondern erzielt auch eine höhere Permeabilität und damit bessere Wirksamkeit für das coapplizierte Chemotherapeutikum. Vom TNF-induzierten Zelltod in Endothelzellen sind vor allem die neugebildeten Tumor-Gefäße betroffen, weniger die normalen Blutgefäße, wodurch entsprechende Nebenwirkungen ausbleiben. Die in der ILP nötige Dosierung an löslichem TNF übersteigt bei weitem die Konzentration, die nötig wäre, um den p55TNFR abzusättigen. Dies könnte darauf hindeuten, dass zur Induktion maximaler Effekte in den Tumor-Endothelzellen (im Speziellen die Induktion von Apoptose) Signaltransduktion über beide TNF-Rezeptoren nötig ist (Wajant, 2005).

Neuere Versuche, TNF in der Tumor-Therapie einzusetzen, basieren auf Fusionsproteinen aus TNF einerseits und einem Antikörper oder natürlichen Liganden andererseits, über den die Tumorzelle selbst oder Marker des Tumor-Stromas erkannt werden. Auf diese Weise soll für die Wirkung des toxischen TNF Tumor-Selektivität erreicht werden. Zwar können die vom Antikörper respektive Liganden erkannten Strukturen auch auf anderen Zellen vorkommen, die Epitopdichte des ausgewählten Markers auf Tumorzellen ist aber um ein Vielfaches größer, was zu einer Anreicherung von TNF am erwünschten Wirkort führt. Tumorantigene, auf die bisher mit Antikörper-basierten TNF-Fusionsproteinen abgezielt wurde (alle Experimente beschränken sich bisher auf *in vitro* Versuche oder Tiermodelle) sind beispielweise EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Christ, 2001), Her2/Neu (Rosenblum, 2000), oder das Melanom-Antigen gp240 (Liu, 2004), in allen Fällen mit gutem Erfolg und hoher Selektivität für die Zellen des Tumors.

4.2. Anti-TNF-Therapie

Wie bereits erwähnt, sind viele pathologische Zustände mit erhöhten Serumspiegeln an TNF verbunden bzw. durch sie verursacht, weshalb grosse Hoffnungen auch in eine Anti-TNF-Therapie gesetzt wurden. Gerade in der Sepsis (Butty, 2003) und bei Multipler Sklerose (Schwid, 1999) konnten diese Hoffnungen aber nicht erfüllt werden. Dagegen wird eine Anti-TNF-Therapie mit grossem Erfolg bei chronischen Entzündungen wie der Rheumatoiden Arthritis und bei Morbus Crohn eingesetzt. Zwar ist auch für Glukokortikoide, die in beiden Krankheitsbildern zur Therapie eingesetzt werden, bekannt, dass sie unter anderem die Transkription von TNF beeinflussen, trotzdem gibt es Patienten, die auf die Standardtherapien nicht mehr ansprechen oder bei denen Glukokortikoide wegen ihrer erheblichen Nebenwirkungen nicht mehr eingesetzt werden können. In vielen Fällen sprechen diese Patienten gut auf eine gezielte Anti-TNF-Therapie an. Drei Arzneistoffe stehen dafür bisher in Europa zur Verfügung: Die beiden gegen TNF gerichteten Antikörper Infliximab (Remicade®), ein chimärer Antikörper mit dem konstanten Teil eines humanen IgG1 κ , und Adalimumab (Humira®), ein vollständig humaner IgG1 Antikörper, der über die *Phage-Display* Technologie hergestellt wurde, sowie Etanercept (Enbrel®), ein Fusionsprotein aus der Extrazellulärdomäne des p75TNFR und dem Fc-Teil eines humanen IgG1.

Beide Antikörper, Infliximab und Adalimumab, zeigen das gleiche Wirkprofil, in dem sie durch potente TNF-Neutralisierung die Freisetzung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 und IL-8 hemmen, sowie die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen und somit das Einwandern von Leukozyten verhindern. Des weiteren wird die direkte Induktion von Apoptose in T-Zellen als wichtiger Parameter für ihre klinische Effizienz beschrieben (Lugering, 2001, ten Hove, 2002).

Ein grosser Nachteil von Infliximab besteht in dem relativ hohen Anteil an Maus-Sequenz (25 %), durch die der chimäre Antikörper ein hohes immunogenes Potential trägt und in der Tat zur Bildung von human anti-chimär Antikörpern (HACA) führt. Klinisch relevant ist dies einerseits wegen der hohen Rate an Infusions-Reaktionen und andererseits wegen des Verlustes der Therapie-Effizienz. Durch einen regelmäßigen Therapie-Plan, Coapplikation von Immunsuppressiva (Azathioprin oder Methotrexat) oder eine Vorbehandlung mit Hydrocortison, kann die Inzidenz der HACA aber deutlich reduziert werden. Für Adalimumab wurde bei Rheuma-Patienten die Bildung von human anti-human Antikörpern (HAHA) beschrieben. Durch die vollständig humane Sequenz sind diese Reaktionen aber deutlich seltener und vor allem klinisch weniger bedeutend als die Bildung der HACA bei Infliximab (Sandborn, 2005).

Im Falle von Etanercept wird die Halbwertszeit des löslichen p75TNF-Rezeptors durch die Bindung an den Fc-Teil eines humanen Antikörpers enorm erhöht und über dessen Dimerisierung darüber hinaus eine deutliche Affinitäts-Steigerung für TNF (bis zu 1000-fach) erzielt. Im Gegensatz zu den beiden spezifischen Antikörpern bindet das Fusionsprotein nicht nur TNF sondern auch das lösliche LT α_3 , wodurch das Wirkprofil aber nicht verändert oder erweitert wird. Bisher ist ein Erfolg von Etanercept nur in der Rheumatoiden Arthritis gesichert, einzelne Studien in Patienten mit aktivem Morbus Crohn zeigten keine Überlegenheit von Etanercept in der bei Rheuma eingesetzten, wirksamen Dosierung gegenüber Plazebo. Als Ursache wird die im Vergleich zu den Antikörpern fehlende Induktion von Apoptose in T-Zellen diskutiert. Da aber abweichend von der etablierten Dosierung in Rheuma-Patienten keine erhöhten Konzentration bei Morbus Crohn eingesetzt wurden, kann das Therapie-Versagen auch durch eine Unterdosierung verursacht sein.

In der klinischen Entwicklung befinden sich neben den drei zugelassenen Arzneimitteln noch weitere Proteine, die auf unterschiedliche Weise eine Hemmung der TNF-Wirkung erzielen sollen. Im Fall von Onercept handelt es sich um ein rekombinantes humanes

p55TNF-Rezeptor-Trimer, dessen Halbwertszeit durch Konjugation mit Polyethylenglykol verlängert wird. Nachdem die Pilotstudie erste positive Effekte von Onercept in Morbus Crohn-Patienten zeigte, konnte in einer darauf folgenden Studie aber keine Überlegenheit gegenüber Placebo mehr erzielt werden (Sandborn, 2005).

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Gabe von dominant-negativem TNF (DN-TNF), das, als Monomer verabreicht, zusammen mit endogenem, löslichen TNF in ein Heterotrimer mit-einbezogen werden kann und durch die enthaltene Mutation sowohl die Bindung als auch eine Aktivierung der Rezeptoren unterbindet (Steed, 2003). Erste Versuche im Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis lieferten positive Ergebnisse (Puppo, 2005).

Bisher basieren alle zugelassenen und die meisten im Test befindlichen Wirkstoffe zur Anti-TNF-Therapie auf Proteinen, was eine parenterale Applikation erforderlich macht. Nach positiven Berichten über den Einsatz von Etanercept und Infliximab beim neuropathischen Schmerz (Karppinen, 2003, Sommer, 2001), entwickelte die Firma Renovis eine oral verfügbare Substanz (REN-1654), die die Freisetzung von TNF aus den Neuroglia und aus Makrophagen hemmt, wodurch die Entzündung und damit der Schmerz an peripheren Nerven und Nervenwurzeln gehemmt werden soll. Die Substanz zeigte aber in klinischen Phase II Studien keine Überlegenheit gegenüber Placebo (http://www.renovis.com/prd_ren1654_overview.shtml), so dass auf lange Sicht wohl keine niedermolekulare Substanz zur Anti-TNF-Therapie verfügbar sein wird.

Trotz grosser Erfolge und einem mittlerweile breiten Einsatz von TNF-Inhibitoren, bis Ende 2002 waren insgesamt bereits 350 000 Patienten weltweit mit überwiegend guter Verträglichkeit mit Infliximab oder Etanercept behandelt worden (Roberts, 2004), dürfen die zwar selten auftretenden, aber schweren Nebenwirkungen der Anti-TNF-Therapie nicht ausser Acht gelassen werden. Hierzu zählen Fälle bakterieller Sepsis, opportunistische Infektionen unter anderem mit *Listeria monocytogenes*, *Histoplasma capsulatum* oder *Aspergillus fumigatus*, sowie die Reaktivierung von Tuberkulose, die alle gut durch den Mechanismus der TNF-Hemmung erklärbar sind. Relativ unerwartet war dagegen die Verschlechterung einiger Autoimmunerkrankungen unter Infliximab oder Etanercept. Bei Patienten mit Multipler Sklerose, bei denen man eigentlich von einer Verbesserung der Erkrankung ausging, wurde praktisch ausschließlich eine Aktivierung oder Verschlimmerung beobachtet (Enayati, 2005,

Sicotte, 2001). In einigen Fällen wird darüber hinaus vom Ausbruch des systemischen Lupus erythematoses (SLE) oder ähnlicher Krankheitsbilder 6 Wochen bis 14 Monate nach Beginn der Anti-TNF-Behandlung berichtet (Cairns, 2002, Shakoor, 2002). Dafür verantwortlich könnte laut neuerer Publikationen die Fähigkeit von TNF sein, in autoreaktiven und damit pathogenen T-Zellen selektiv Apoptose zu induzieren (Kodama, 2005, Kollias, 2002). Dieser Effekt wird durch die Therapie mit TNF-Inhibitoren unterdrückt und es kommt in der Folge zum Ausbruch oder zur Verschlechterung der jeweiligen Autoimmunerkrankung. In verschiedenen Tiermodellen (unter anderem in NOD-Mäusen, einem Modell für Insulin-abhängigen Diabetes mellitus, oder NZB/W-Mäusen, einem Modell für SLE) konnte durch eine TNF-Therapie eine deutliche Verbesserung der Erkrankung erzielt oder sogar der Ausbruch komplett verhindert werden (Kollias, 2002, McDevitt, 2002). George Kollias und seine Gruppe konnte mit Hilfe von p55- und p75TNFR gendefizienten sowie Rezeptor-doppel-*knockout* Mäusen herausfinden, dass beide Rezeptoren gleichermaßen in der Lage sind, diese immunsuppressive Wirkung zu vermitteln. Basierend auf diesen Daten könnte durch eine gezielte Blockade des p55TNFR die durch TNF vermittelten pro-inflammatorischen und gewebeschädigenden Effekte gehemmt werden, aber gleichzeitig über die Wechselwirkung zwischen TNF und dem p75TNFR die positiven immunsuppressiven Funktionen erhalten bleiben.

Erste Schritte in diese Richtung sind vielleicht mit der Entdeckung gemacht, dass lösliche PLAD-Proteine spezifisch die Aktivierung des jeweiligen Rezeptors verhindern, indem durch kompetitive Hemmung eine Multimerisierung der Rezeptoren über ihre endogene PLAD-Sequenz und damit die Bindung des Liganden unterbunden wird (Deng, 2005).

B Material und Methoden

1. Material

1.1. Chemikalien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Deisenhofen
2'-Azino-di (3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure(6)) (ABTS)	Roche Diagnostics, Mannheim
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
ABTS Substrat Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Acrylamid-Bisacrylamid Lösung	Roth, Karlsruhe
Actinomycin D	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Agarose, electrophoresis grade	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
[$\alpha^{32}\text{P}$] dCTPs, 10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol	Amersham, Uppsala, S
[$\alpha^{32}\text{P}$] UTPs, 20 mCi/ml, 800 Ci/mmol	Amersham, Uppsala, S
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Complete EDTA-free tablets	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R 250	Fluka, Buchs, CH
Cytofix/CytoPerm	Becton Dickinson, Heidelberg
Dapi	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Desoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
D-Galactosamin	Roth, Karlsruhe
DMEM-Fertigmedium	Sigma Aldrich, Deisenhofen
ECL Lösungen A+B	Mobitec, Göttingen
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
G420 (Geneticin/Neomycin)	PAN Biotech, Aidenbach

Gentamycin	ICN, Meckenheim
Glycerol, ultra pure	Invitrogen, Karlsruhe
HEPES	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Humanes rekombinantes TNF	BASF, Ludwigshafen
Hygromycin B	Roche Diagnostics, Mannheim
IPTG	Biomol, Hamburg
LB (Lennox Broth Base)	Gibco, Karlsruhe
LPS	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Maus-TNF, rekombinant	Matthias Grell, Stuttgart
MobiGlow Mounting Medium	Mobitec, Göttingen
N,N-Dimethylformamid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
N,N-Dimethylformamid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Nuclease free water	Promega, Madison, USA
Oligo-dT Primer	Promega, Madison, USA
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, Deisenhofen
PCR-Puffer, 10x conc.	Roche Diagnostics, Mannheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
Polybrene	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Protein G-Sepharose	Amersham, Uppsala, S
Puromycin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
rotiphorese	
Sequenziergel Konzentrat	Roth, Karlsruhe
Sequenziergel Verdünner	Roth, Karlsruhe
Sequenziergel Puffer-Konzentrat	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640-Pulvermedium	Sigma Aldrich, Deisenhofen
SIGMA104	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Sucrose	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Superfect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
TEMED	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Trypsin-EDTA-Lösung	Tecnomara, Fernwald

Tween 20	Fluka, Buchs, CH
ULTRAhyb Hybridisation Buffer	Ambion, Austin, USA
X-Gal	Biomol, Hamburg

Alle nicht aufgeführten Lösungsmittel (p.A.) wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen, die nicht aufgeführten Feststoffe (p.A.) von Sigma Aldrich, Deisenhofen.

1.2. Verbrauchsmaterial und Geräte

ABI PRISM 7900	Applied Biosystems, Foster City, USA
Acrodisc Syringe filter (low protein binding)	PALL Corporation, MI, USA
Begasungsbrutschrank – Cell Safe	Integra Biosciences, Baar, CH
BioMax MR Filme	Kodak, Cedex, F
CCD-Kamera, gekühlt	Princeton Instruments, Trenton, USA
ELISA Reader	MWG Biotech, Ebersberg
Eppendorfcups (1,5 ml / 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Plastik-Pistille	Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen	Labor Schubert, Schwandorf
FACScan Flow Cytometer	Becton-Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenz-Mikroskop Zeiss Axiovert S100	Zeiss, Oberkochen
Gelelektrophorese-Apparaturen	BioRad, München
Gewebekulturschalen	Becton Dickinson, Heidelberg
Hyperscassette	Amersham, Little Chalfont, GB
Hyperfilm ECL	Amersham, Uppsala, S
Inkubatoren	Heraeus, Hanau
Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryo-Röhrchen	Nunc, Naperville, USA
Lab-Tek II Chamber Slide	Nunc, Naperville, USA
Laminair Flow HB 2448– Sterilbank	Heraeus, Hanau

MACS Separation Columns 25 LS	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Magna Nylon Transfer Membrane	Osmonics, Minnetonka, USA
Micro Spin S-200 HR Columns	Amersham, Little Chalfont, GB
Mikroskop (Zellkultur)	Olympus, Hamburg
Mikrotiterplatten	Falcon, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	Brand, Gießen
Nitrocellulosemembran	Osmonics, Minnetonka, USA
Nylon Transfer Membrane	Pall GmbH, Dreieich
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Foster City, USA
PCR-Thermocycler	Perkin Elmer, Shelton, USA
Polystyrolröhrchen	Falcon, Heidelberg
PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach
Spannungsgerät:	
Biorad 200/2,0 Constant Voltage	BioRad, München
Spritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Thermo-Fast 384	ABgene, Epsom, GB
UV-Schirm (254 nm und 366 nm)	Bachhofer, Reutlingen
UV Stratalinker 2400	Stratagene, Cedar Creek, USA
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
Zentrifugenröhrchen (15, 50ml)	Falcon, Heidelberg
Zellsiebe (Cellstrainer)	Falcon, Heidelberg

1.3. Kits

ECL-Western Blot Detection Kit	Mobitec, Göttingen
ELISA mTNF	R&D Systems, Wiesbaden
MAXIscript	Ambion, Austin, USA
Mycoplasma detection kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Oligotex Kit	Qiagen, Hilden
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Maxi/Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
Prime-It II Random Primer Labeling Kit	Stratagene, Cedar Creek, USA
Reverse Transcription System	Promega, Madison, USA
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
RPA III	Ambion, Austin, USA
TOPO-Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Wizard Plus Minipreps DNA Purification Kit	Promega, Madison, USA

1.4. Molekulargewichtsstandards

DNA-Längenstandard XIV	Roche Diagnostics, Mannheim
SDS-PAGE Molecular Weight Standard (Broad Range)	BioRad, München

1.5. Antikörper

CD8a Micro Beads mouse (Ly-2)	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Esel anti-human-IgG F(ab') ₂ Fragment PE	Jackson ImmunoResearch, Soham, UK
Hamster (armenischer) anti-Maus p75TNFR	
TR75-8 biotinyliert	Pharmingen, BD, Heidelberg
TR-32.4 biotinyliert	BioLegend, San Diego, USA
TR-54.7 gereinigt	BioLegend, San Diego, USA
Kaninchen anti-human TNFR2 ICD (H202)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Kaninchen anti-Maus TNFR1, agonistisch	HyCult, Caltag, Hamburg

Maus anti-human c-myc (9E10)	eigene Herstellung
Ratte anti-Maus-TNF (MP6-XT22) APC	Becton-Dickinson, Heidelberg
Ratte anti-Maus-CD3 ϵ (2C11)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte anti-Maus-CD28 (35.71)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte anti-Maus Fc γ -Rezeptor II/III (2.4G2)	eigene Herstellung
Ziege anti-Hamster (armenischer) –IgG, biotinyliert	BioLegend, San Diego, USA

1.6. Enzyme

Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, MA, USA
T4-Polynukleotid Kinase	New England Biolabs, MA, USA
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA

1.7. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Alle *sense*-Primer für die PCR tragen den Zusatz 5', alle *antisense*-Primer tragen den Zusatz 3'. Bei einer Länge von über 30 Basen wurden die Oligonukleotide HPLC-gereinigt bestellt, um die Kontamination mit unvollständig synthetisiertem Material auszuschließen. Die Konzentration der bestellten Oligonukleotide betrug immer 100 pmol/ml. In der PCR wurden sie in einer 1:10 Verdünnung, also mit einer Konzentration von 10 pmol/ml, verwendet.

Jeder Primer bzw. jede ausgewählte Sequenz wurde vor Bestellung mit Hilfe des MegaBLAST-Programmes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) mit einer Sequenzdatenbank abgeglichen, um eine möglichst hohe Spezifität zu gewährleisten. Die Schmelztemperatur der Primer wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Oligonukleotid	Sequenz
Nachweis des hicp75TNFR mittels RT-PCR und Southern-Hybridisierung	
5' hicp75TNFR	5' GTCCTATGAGGTCAGTTCAGAGATCCAGACC 3'
3' hicp75TNFR	5' GGCCCGGCGAGCATTTGCTGCAGCACATC 3'
5' hicp75TNFR nested	5' CCAGGTGGTCTGGCTCTAGAGTCTAAACAGG 3'
3' hicp75TNFR nested	5' TCATAGTATTCTCTGAGCCGGCATGTGCTCCC 3'
3' hicp75TNFR-cDNA	5' CTGATGTTTCAGTTCCTGGTCTGGCCACGCCG 3'
5' hicp75TNFR-Southern	5' GTCCTATGAGGTCAGTTCAGAGATCCAGACC 3'
3' hicp75TNFR-Southern	5' GGGCCACCATGCTAGGCTGATTTCTTTATAGAG 3'
Ribonuclease Protection Assay	
5' RPA-Sonden 1/2	5' GTCCTATGAGGTCAGTTCAGAGATCC 3'
3' RPA-Sonde 1	5' TGCACTCGGCCTGTTTAGACTCTAG 3'
3' RPA-Sonde 2	5' GGCCACCATGCTAGGCTGATTTC 3'
RNA-Interferenz mit pSUPER (die 19 bp der Ziel-mRNA sind fett gedruckt)	
5' pSUPER hicp75TNFR-Oligonukleotid	5' GATCCCCAGAAAT CAGCCTAGCATGGTT CAAGA GACCATGCTAGGCTGATTTCTTTTTTGGAAA 3'
3' pSUPER hicp75TNFR-Oligonukleotid	5' AGCTTTTCCAAAAAAGAAAT CAGCCTAGCATGG TCTCTTGAACCATGCTAGGCTGATTTCTGGG 3'
5' pSUPER hp75TNFR-Oligonukleotid	5' GATCCCCAAGTCTTCTGTACCAAGACTTCAAGA GAGTCTTGGTACAGAAGACTTTTTTTGGAAA 3'
3' pSUPER hp75TNFR-Oligonukleotid	5' AGCTTTTCCAAAAAAGTCTTCTGTACCAAGAC TCTCTTGAAGTCTTGGTACAGAAGACTTGGG 3'

Nachweis des micp75TNFR mittels RT-PCR und Southern-Hybridisierung	
5' micp75TNFR	5' GAGAAGATGCAAACATTCATGTGGAG 3'
3' micp75TNFR	5' GATCTGGCACTCGTACCCAGGTTC 3'
5' micp75TNFR-Southern	5' CCTGAGCGGTGCCAACTTTG 3'
3' micp75TNFR-Southern	5' CACTCCTTCCTCTTCGAGAC 3'
Klonierung der micp-/mp75TNFR-myc-EYFP-Fusionsproteine	
5' EcoRI-micp75TNFR	5' GGGGAATTCGGCTCAGATGTGCTGTGCTAAG 3'
5' EcoRI-mp75TNFR	5' GGGGAATTCATGGCGCCCGCCGCCCTC 3'
3' BamHI-myc- micp-/mp75TNFR	5' CGGGATCCCGCAGATCCTCTTCTG 3'
Klonierung der micp-/mp75TNFR-Ig-myc-Fusionsproteine	
5' HindIII-micp75TNFR	5' GCGAAGCTTTGCTGTGCTAAGTGTCTCCTGG 3'
5' HindIII-mp75TNFR	5' GCGAAGCTTGTGCCCCGCCAGGTTGTCTTG 3'
3' BamHI- micp-/mp75TNFR	5' CGCGGATCCATGCCACCCTTGGTACTTTGTTCA 3'
5' EcoRI-CD33 SP	5' GCGGAATTCATGCCGCTGCTGCTACTGCTGC 3'
3' XhoI-myc-Ig-Teil	5' CGCCTCGAGTCACAGACGCCTCGAGTCACAGATC CTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTCTTTACCCGGAG ACAGGGAGAGGC 3'

1.8. Plasmide

BCMGS-Neo
(noncleavable transmembrane mTNF)
pcDNA3

M. Imboden, Bern, CH

Invitrogen, Karlsruhe

pEYFP-N1	Clontech, BD, Heidelberg
PQCXIP	Clontech, BD, Heidelberg
pQCXIP-MCS-pEYFP-N1	W.Schneider, Regensburg
pSUPER	R. Agami, Amsterdam, NL
Signal pIg	R&D Systems, Wiesbaden

1.9. Puffer und Lösungen

ACK-Puffer (6x)	0,155 M NH_4Cl 0,1 M KHCO_3 0,1 mM Na-EDTA x 2 H_2O
Annealing Puffer für pSUPER-Oligonukleotide	100 mM Kaliumacetat 30 mM HEPES-KOH pH 7,4 2 mM Magnesiumacetat
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
Einfriermedium (2x) für Zellen	20 % DMSO 80 % FCS
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H_2O

FACS-Waschpuffer	10 % FCS in PBS
Laemmli-Elektrodenpuffer (5x)	120 mM Tris Base 0,95 M Glycin 0,5 % SDS
LB-Medium (pH 7,3)	10 g Bacto-Trypan 5 g Hefe-Extrakt 100 g NaCl ad 1 l Wasser
MACS-Puffer (entgast)	500 ml PBS 5 ml FCS 2 ml 0,5 M EDTA
PBS (pH 7,3)	137 mM NaCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl
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-deoxycholat Complete™ EDTA-free tablet pH 7,4

Sammelgel-Trispuffer	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
SDS-Probenpuffer (2x)	20 % Glycerin (v/v) 125 mM Tris (pH 6,8) 2 % SDS (w/v) 0,02 % Bromphenolblau (w/v) 2 % β -Mercaptoethanol (v/v)
Southern-Blot Depurinierungs-Puffer	0,2 N HCl
Southern-Blot Denaturierungs-Puffer	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Southern-Blot Neutralisierungs-Puffer (pH 7,0)	0,5 M Tris base 1,5 M NaCl
Southern-Blot Waschpuffer 1	2x SSC 0,1 % SDS
Southern-Blot Waschpuffer 2	0,1x SSC 0,1 % SDS
SSC (20x; pH 7,0)	875 g NaCl 440 g Na_3Citrat Wasser ad 5000 g
Substratlösung für ELISA (AP)	0,06 % (w/v) SIGMA104 in Substratpuffer

Substratpuffer für ELISA (AP)	9,8 % (v/v) Diethanolamin 24 mM MgCl_2 pH 9,8
TAE-Puffer	40 mM Tris-acetat 1 mM EDTA
TBE-Puffer (50x)	109 g Tris-Base 55 g Borsäure 40 ml EDTA-Lsg. 0,5 M (pH 8,0)
TBS-Puffer	8 g NaCl 0,2 g KCl 3 g Tris-Base in 1000 ml 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-Caprinsäure 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 (w/v) 150 mM NaCl

1.10. Zelllinien

Zelllinie		Kulturmedium	Art des Wachstums
bEnd.3	Maus-Endotheliomzelllinie	DMEM; 10 % FCS	adhärent
CaCo	Humane colorektale Adenokarzinom Zelllinie (epithelial)	DMEM; 10 % FCS	adhärent
CHO	Chinesische Hamstero- var-Zelllinie	DMEM; 10 % FCS	adhärent
COS-7	Immortalisierte Nieren- zelllinie vom afrikanischen grünen Affen	DMEM; 10 % FCS	adhärent
HEK 293T	Humane immortalisierte embryonale Nierenzellen	DMEM; 10 % FCS	adhärent
HT29	Humane colorektale Adenokarzinom Zelllinie (epithelial)	DMEM; 10 % FCS	adhärent

HepG 2	Humane Hepatozyten-Zelllinie (epithelial)	DMEM; 10 % FCS	adhärent
Kym-1	Humane Rhabdomyosarkomzelllinie	RPMI; 10 % FCS	adhärent
L929	Maus-Fibrosarkomzelllinie	RPMI; 10 % FCS	adhärent
NIH 3T3	Maus-Fibrosarkomzelllinie	RPMI; 10 % FCS	adhärent
PU5-1.8	Maus-Makrophagen	DMEM; 10 % FCS	in Suspension
P815	Maus-Mastozytomzelllinie	RPMI; 10 % FCS	adhärent/in Suspension
RAW 264.7	Maus-Makrophagen	RPMI; 10 % FCS	adhärent
THP-1	Humane periphere Blut-Monozyten	RPMI; 10 % FCS	in Suspension

1.11. Tiere

C57BL/6

Charles River, Sulzfeld

2. Methoden

2.1. Arbeiten mit Bakterien

2.1.1. Verwendete *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 zugehörigen 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) in LB-Medium für maximal 16 Stunden. Zur Selektion wurde Ampicillin in einer Konzentration von 200 µg/ml zugegeben.

2.1.3. Herstellung von Dauerkulturen

Eine über Nacht frisch angezüchtete *E. coli* Kultur wurde im Verhältnis 1:2 mit Glycerin (60 % v/v) gemischt und in Aliquots von je 500 µl bei –80° C eingefroren.

2.1.4. Herstellung von transformationskompetenten *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 von 200 µl bei –80° C eingefroren.

2.1.5. Transformation von *E. coli*

Die transformationskompetenten Bakterien (200 µl) wurden in der Hand kurz an- und dann auf Eis vollständig aufgetaut, bevor die entsprechende Plasmid-DNA (100-200 ng) zugegeben und vorsichtig durchmischt werden konnte. Nachdem die Bakterien für 45 Minuten auf Eis inkubiert wurden, wurden sie exakt 90 Sekunden bei 42° C (Wasserbad oder Heizblock) einem Hitzeschock unterzogen, wodurch die Aufnahme der angelagerten DNA ins Bakterium ermöglicht wird. Danach wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt, 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. Jeweils 20 µl und 200 µl des Transformationsansatzes wurden dann auf selektiven Agarplatten (LB-Amp) ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert. Am folgenden

Tag wurden einzelne Klone gepickt und in 5 ml selektivem LB-Medium über Nacht geschüttelt (37° C; 220 U/min) und die resultierende Kultur danach analysiert.

2.1.6. Blau-Weiß-Selektion

Eine Blau-Weiß-Selektion auf positive Bakterienkolonien wurde bei Verwendung des TOPO-TA Cloning-Kits durchgeführt. Sie basiert auf dem Prinzip der α -Komplementation und funktioniert nur bei Plasmiden, die die Sequenz für das lac-Z-Gen enthalten, welches für das α -Peptid der β -Galaktosidase kodiert. Organismen, die außer dieser alle anderen Untereinheiten der β -Galaktosidase exprimieren, können nach Aufnahme des Plasmids biologisch aktives Enzym bilden. IPTG (Isopropyl-thiogalaktosid) dient als Induktor für die β -Galaktosidase, wird aber anders als das chromogene Substrat x-Gal nicht durch sie zersetzt. Solange also die β -Galaktosidase aktiv ist und ein entsprechendes Substrat, das nach Umsetzung farbig wird, angeboten bekommt, färben sich die Bakterienkolonien in der entsprechenden Farbe (bei x-Gal blau). Wurde aber ein DNA-Fragment in die MCS insertiert und dadurch der Leserahmen des lac-Z-Gens verschoben, kann kein α -Peptid mehr gebildet werden und die Farbreaktion bleibt aus. Positive Klone erscheinen demzufolge weiß und können von den negativen blauen unterschieden werden.

Zur Blau-Weiß-Selektion wurde auf die Agarplatten vor dem Transformationsansatz 20 μ l x-Gal-Lösung (20 % x-Gal w/v in N,N-Dimethylformamid) und 10 μ l IPTG (0,1 M) ausplattiert. Nach Inkubation der Platten bei 37° C konnten am folgenden Tag die weißen Kolonien analysiert werden.

2.2. Arbeiten mit RNA

Alle Arbeiten mit RNA wurden unter Verwendung gestopfter Pipettenspitzen und mit Latexhandschuhen durchgeführt. Wenn nicht anderes angegeben wurde die RNA während der einzelnen Arbeitsschritte auf Eis aufbewahrt, ansonsten bei -80° C.

2.2.1. Präparation von Gesamt-RNA

Unabhängig von der Art des Ausgangsmaterials (Zellen oder Gewebe), wurde die RNA zunächst immer mit dem RNeasy Kit isoliert und erst dann eine eventuelle mRNA-Aufreinigung vorgenommen.

Bei RNA-Isolierung aus Gewebe, wurde das Material zuerst mechanisch im Eppendorf-Cup mit einem Eppendorf-Pistill zerkleinert und dann über QIAshredder-Säulchen noch weiter homogenisiert. Zellen wurden ohne vorherige Maßnahme nur über die QIAshredder-Säulchen zentrifugiert. Die Isolierung selbst erfolgte exakt nach dem im RNeasy Handbuch aufgeführten Spin-Column-Protokoll. Bei cDNA-spezifischen Primern oder TaqMan-Assays wurde auf einen DNase-Verdau verzichtet.

2.2.2. Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Photometer durch Messung der Absorption bei 260 nm. Die Konzentration berechnet sich wie folgt:

$$\text{Konzentration} = 40 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die absoluten Werte für die Absorption lagen durch geeignete Verdünnung der RNA immer zwischen 0,15 und 1,0 und somit im linearen Messbereich des Gerätes.

2.2.3. Präparation von mRNA

Die spezielle Aufreinigung der mRNA erfolgte aus Gesamt-RNA, deren Konzentration zuvor bestimmt wurde, durch Verwendung des Oligotex-Kits.

Auch hier wurde exakt nach dem zum Kit gehörenden Oligotex mRNA Spin-Column-Protokoll gearbeitet.

2.3. cDNA-Synthese

2.3.1. cDNA-Synthese zum Nachweis des humanen icp75TNFR mittels RT-PCR

Das Umschreiben der Gesamt- bzw. mRNA erfolgte mit Superscript II einer Reversen Transkriptase des *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV-RT), entweder mit spezifischen oder oligo-dT-Primern nach folgendem Protokoll:

RNA (oder ein entsprechendes Volumen aus der mRNA-Präparation)	5,0 µg	
oligo-dT oder 5 pmol spezifischer Primer	2,0 µl	
Nuklease freies Wasser	ad 23,5 µl	→ 10 Minuten 70° C

RNase-Inhibitor	1,0 µl		
DNTP (10 mM)	2,0 µl		
DTT	4,0 µl		
5x RT-Puffer	8,0 µl		
Superscript II	1,5 µl	→	90 Minuten 42° C
		→	15 Minuten 70° C
RNase H	1,0 µl	→	20 Minuten 37° C

Das resultierende Reaktionsprodukt wurde mit Nuklease freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt, mit weiteren 100 µl einer 4 M NH₄OAc-Lösung und 600 µl Ethanol 100 % versetzt, 20 Minuten bei RT inkubiert und anschließend für 30 Minuten bei 16 000 g zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit Ethanol 70 % wurde die cDNA in 20 µl Nuklease freiem Wasser aufgenommen.

2.3.2. cDNA-Synthese für die quantitative *Real Time* RT-PCR und den Nachweis des Maus-icp75TNFR

Da in der quantitativen *Real Time* RT-PCR ribosomale 18S RNA als Referenzgen verwendet wurde, musste die cDNA unter Verwendung von *random*-Hexameren umgeschrieben werden. Dazu wurde das Reverse Transcription System von Promega verwendet, das mit einer Reversen Transkriptase des *Avian Myoblastosis Virus* (AMV-RT) arbeitet. Die cDNA-Synthese erfolgte genau nach Protokoll und unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien. Die Denaturierung der RNA bei 70° C vor dem Umschreibeschritt erfolgte in einem Eppendorf Thermomixer, das Temperaturprogramm der eigentlichen cDNA-Synthese wurde im PCR-Cycler durchgeführt.

2.4. Ribonuclease Protection Assay (RPA)

2.4.1. Generierung der radioaktiv markierten RNA-Sonden

Die in-vitro-Transkription der Sonden, die eine doppelsträngige DNA-Vorlage in RNA umschreibt und dabei radioaktiv-markierte Nukleotide einbaut, wurde mit Hilfe des MAXIscript Kits von Ambion durchgeführt. Als *template* für die zunächst per PCR zu synthetisierende DNA-Vorlage, diente ein pcDNA3 Vektor (laborinterne Nr. 432), der den humanen icp75TNFR in voller Länge enthielt. Dabei war der 5' Primer für beide

Sonden identisch, über den 3' Primer wurde sowohl ihre Länge festgelegt, als auch der Promotor für die T7 Phagen-RNA-Polymerase an die DNA-Matrize angehängt.

Die PCR zur Gewinnung der DNA-Vorlage für die späteren Sonden wurde nach folgendem PCR-Protokoll durchgeführt:

Plasmid	1 µl		
10x Puffer	5 µl	2 min.	94° C
5' Primer (10 pM/ml)	5 µl	30 Sek.	94° C
3' Primer (10 pM/ml)	5 µl	30 Sek.	62° C
dNTPs (10 mM)	1 µl	1 min.	68° C
Taq-Polymerase	1,25 µl	20 min.	68° C → 4° C ∞
Wasser	ad 50 µl		

35x

Die PCR-Produkte wurden über ein Polyacrylamid-Gel (8 % w/v PAA) aufgetrennt, die entsprechenden Banden ausgeschnitten, die DNA durch passive Diffusion aus dem Gel in Elutionspuffer (Bestandteil des RPA III Kits) überführt und durch Zugabe von 3 Volumeneinheiten 100 % Ethanol gefällt. Nach einem Waschschrift mit Ethanol 70 % wurde die DNA in 50 µl Nuklease freiem Wasser aufgenommen.

Die so gewonnenen Matrizen für die beiden hicp75TNFR-spezifischen Sonden konnten dann in die eigentliche in-vitro-Transkription eingesetzt werden. Als Positivkontrolle für den RPA wurde auch für das *housekeeping*-Gen β -Actin eine Sonde generiert. Die passende DNA-Matrize ist in Form eines Plasmides (pTRI-Actin-Mouse), welches ebenfalls den T7 RNA-Polymerase Promotor enthält, im MAXIscrip Kit enthalten und kann direkt in die in-vitro-Transkription eingesetzt werden.

In-vitro-Transkription:

DNA-Matrize / pTRI-Actin-Mouse	2 µl / 1 µl
10x Transkriptions-Puffer	2 µl
10 mM ATP/CTP/GTP	3 µl
[α^{32} P] UTP (20 mCi/ml)	5 µl
T7-RNA-Polymerase	2 µl
Nuklease freies Wasser	ad 20 µl → 1 h bei 37° C

2.4.2. Reinigung der radioaktiven Sonden

Um zu garantieren, dass die Sonden im RPA in voller Länge eingesetzt werden, müssen sie über ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel gereinigt werden. Dazu wurde ein Gel mit einem PAA-Anteil von 10 % (w/v) und einem Harnstoff-Gehalt von 50 % (w/v) hergestellt:

Sequenziergel Konzentrat (25 % PAA)	18 ml
Sequenziergel Verdünnungs-Lsg.	27 ml
Sequenziergel Puffer-Konzentrat (10x)	4,5 ml
APS	360 µl
TEMED	54 µl

Die elektrophoretische Auftrennung in 1x TBE-Puffer wurde gestoppt, als das Bromphenolblau des Laufpuffers das Ende des Gels erreicht hatte. Eine der beiden Glasplatten wurde entfernt und das Gel mit der verbleibenden Glasplatte in Frischhaltefolie verpackt. Durch Auflegen eines Röntgenfilmes auf die nur mit Folie bedeckte Seite des Gels für 1-2 Minuten und Entwicklung des Films, wurden die Sonden sichtbar gemacht und konnten aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Da die Wiedergewinnung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamid-Gelen effektiver wird, je größer die Oberfläche des Gelstückes ist, wurden die ausgeschnittenen Fragmente zunächst durch die Kanüle einer 10 ml Spritze gepresst, bevor sie über Nacht in 350 µl Elutionspuffer (im Kit enthalten) auf einem Thermomixer bei RT inkubiert wurden. Durch Zugabe von 1050 µl Ethanol 100 % konnten die Sonden ausgefällt und aufkonzentriert werden. Das Endvolumen nach einem zusätzlichen Waschschrift mit Ethanol 70 % betrug 50 µl (in Nuklease freiem Wasser).

2.4.3. Hybridisierung von RNA und Sonde

Von den aufgereinigten Sonden wurden je 5 µl mit mRNA aus stimulierten THP-1 Zellen gemischt. Die RNA wurde zunächst als Gesamt-RNA isoliert und anschließend daraus über den Oligotex Kit mRNA gereinigt. Je Hybridisierung wurde auf diese Weise mRNA entsprechend 50 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Für jede Sonde wurden zusätzlich zwei minus-mRNA Kontrollen angesetzt, denen anstelle der RNA aus THP-1 Zellen RNA aus Hefe in gleicher Konzentration zugesetzt wurde. Eine der beiden Kontrollen erhielt wie die eigentliche Probe RNasen, somit sollte auf dem späteren Gel in dieser Spur nichts

mehr zu detektieren sein, die einzelsträngige Sonde sollte komplett durch die Enzyme verdaut werden. Der zweiten minus-mRNA Kontrolle wurde kein Enzym zugefügt. Im Gel bildet diese Probe die Länge der reinen Sonde ab.

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurde die mRNA mit der jeweiligen Sonde zunächst copräzipitiert. Zu diesem Zweck wurden die Proben auf eine Konzentration von 0,5 M Ammoniumacetat eingestellt und mit 2,5 Volumeneinheiten Ethanol 100 % versetzt. Die Präzipitation erfolgte bei -20°C für 15 Minuten und anschließende Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C auf höchster Geschwindigkeit (16 000 g). Die luftgetrockneten Pellets wurden in 10 μl Hybridisierungspuffer aufgenommen, bei 95°C für 4 Minuten denaturiert und über Nacht bei 42°C inkubiert. In dieser Zeit sollten die Sonden an die jeweils komplementäre mRNA binden und dadurch doppelsträngige Sequenzbereiche entstehen.

2.4.4. Verdau und Aufarbeitung der Proben

Zu jeder der hybridisierten Proben, außer zu jeweils einer der beiden minus-mRNA Kontrollen, wurden 150 μl einer 1:100 Verdünnung von Digestion III Puffer und einer Mischung aus RNase A und RNase T1 gegeben, um einzelsträngige RNA abzubauen. Die minus-mRNA Kontrollen, die nicht mit Enzym versetzt wurden, erhielten statt dessen reinen Digestion III Puffer. Der RNase-Verdau wurde bei 37°C für 30 Minuten durchgeführt. Durch Zugabe von 225 μl RNase Inactivation/Precipitation III Lösung und 75 μl Ethanol 100 % wurde die Reaktion abgestoppt und die verbleibenden RNA-Fragmente durch eine Inkubation von 15 Minuten bei -20°C präzipitiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation auf voller Geschwindigkeit (16 000 g) wurde der Überstand abgenommen und die Pellets in 10 μl Gel Loading Puffer II resuspendiert. Bevor die Proben vollständig auf ein denaturierendes PAA-Gel aufgetragen werden konnten, wurden sie für 3 Minuten bei 95°C denaturiert. Von der minus-mRNA Kontrolle ohne RNase-Verdau wurde nur 1 μl , aufgefüllt auf 10 μl mit Gel Loading Puffer II, für das Gel verwendet, da diese Probe die reine Sonde enthält und die Gefahr besteht, dass bei zu großer Menge im Gel die anderen Banden überstrahlt werden.

2.4.5. Auftrennung der Proben über ein Polyacrylamid-Gel

Für das Analysen-Gel wurde wieder ein PAA-Gehalt von 10 % gewählt. Das Gel wurde nach dem Protokoll von Kapitel B 2.4.2. zubereitet. Unmittelbar vor Auftragung der Proben wurden die Taschen durch Spülen mit 1x TBE Puffer gereinigt. Die

elektrophoretische Auftrennung wurde gestoppt, als das Bromphenolblau des Laufpuffers das Ende des Gels erreicht hatte. Nachdem wieder eine der beiden Glasplatten entfernt und das Gel zusammen mit der zweiten Glasplatte in Frischhaltefolie verpackt worden war, wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und die Filmkassette für eine Stunde bei -80°C gelagert. Nach Entwicklung des Films konnten die einzelnen Banden analysiert werden.

2.5. RNA-Interferenz

2.5.1. Theoretische Grundlagen

Nachdem bekannt wurde, dass doppelsträngige RNAs in Zellen unter bestimmten Umständen eine Sequenz-spezifische Degradierung komplementärer mRNA auslösen können, wurden verschiedenste Ansätze entwickelt, dieses Phänomen molekularbiologisch nutzbar zu machen. Neben der Transfektion von *in vitro* synthetisierten, doppelsträngigen *short interfering* RNAs (siRNAs) hat sich die Vektor-basierte endogene Synthese sogenannter *short hairpin* RNAs (kurze Haarnadelschleife; shRNAs) durchgesetzt.

In der vorliegenden Arbeit sollte die RNA-Interferenz mit Hilfe dieser shRNAs vermittelt werden, die ausgehend von einem entsprechenden Vektor direkt in Vektor-transfizierten Zellen synthetisiert werden. Dazu wurde der von Brummelkamp et al. (Brummelkamp, 2002) publizierte pSUPER-Vektor (**SUP**pression of **E**ndogenous **R**NA) verwendet. Ausgehend vom Plasmid wird dabei unter Verwendung des H1 RNA-Polymerase Promotors ein spezifisches, in pSUPER kloniertes Oligonukleotid in der Zelle als RNA synthetisiert. Dieses Oligonukleotid ist so konstruiert, dass es 19 spezifische Basen der zu degradierenden mRNA in *sense* Orientierung enthält, die sich, durch 9 Basen getrennt, in *antisense* Orientierung wiederholen. Die 9 Basen, die als Abstandshalter fungieren, bilden auf RNA-Ebene die Schleife, nachdem sich die *sense* und *antisense* orientierten RNA-Abschnitte gepaart haben.

Da der Original-pSUPER-Vektor nur eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion transformierter *E.coli* Bakterien beinhaltet, wurden die entscheidenden Teile von pSUPER (H1 RNA-Poymerase Promotor und *Multiple Cloning Site*) in einen pcDNA3 Vektor kloniert, der durch die enthaltene Neomycin-Resistenz zusätzlich eine Selektion transfizierter Zellen erlaubt.

2.5.2. Auswahl der Sequenz

Für die Konstruktion der shRNAs gelten prinzipiell dieselben Regeln wie für siRNAs. Da diese aber schon als fertige Konstrukte in die Zellen transfiziert werden, müssen bei shRNAs darüber hinaus noch weitere Einschränkungen beachtet werden. Die Erfinder des pSUPER-Vektors haben für die Sequenzauswahl des 19 Basen umfassenden Oligonukleotides folgende Richtlinien vorgegeben:

- Die 19 Basen sollen auf mRNA-Ebene 5' von zwei Adeninen flankiert sein.
- 3' wäre eine Flankierung von zwei Thyminiden wünschenswert, aber nicht erforderlich.
- Die ausgewählten 19 Basen sollten in der kodierenden Region der mRNA liegen und zwar mehr als 100 Basen vom Start- bzw. Endpunkt der Translation entfernt.
- Der GC-Gehalt der 19 Basen sollte über 30 % betragen.
- Speziell für Vektor-basierte RNAi-Systeme: die 19 Basen dürfen keine vier oder mehr aufeinander folgende Thyminide oder Adenine aufweisen, weil dies für die RNA-Polymerase als Endpunkt der Transkription gesehen wird und zu einem vorzeitigen Abbruch der shRNA-Synthese führen würde.
- Speziell für den humanen icp75TNFR: es muss eine Unterscheidung vom p75TNFR gewährleistet sein, sowie eine Diskriminierung von der Alu-Sequenz.

2.5.3. Klonierung der Konstrukte

Ebenfalls von den Erfindern des pSUPER-Vektors vorgegeben ist die Sequenz, die in den Vektor zu klonieren ist und in die lediglich die 19 spezifischen Basen in *sense* und *antisense* Orientierung einzusetzen sind. Für das resultierende Oligonukleotid muss des weiteren ein Gegenstrang konstruiert werden, durch den nach Paarung der komplementären Abschnitte am 5' Ende ein Überhang entsteht, der zu einer BglIII-Schnittstelle passt und am 3' Ende ein Überhang, der zu einer HindIII-Schnittstelle passt. Somit können die *annealten* Oligonukleotide direkt in den entsprechend verdauten pSUPER-Vektor eingesetzt werden.

Daraus ergibt sich folgendes Protokoll:

- Annealing der Oligonukleotide:

5' Oligonukleotid (3 µg/µl)	1 µl
3' Oligonukleotid (3 µg/µl)	1 µl
Annealing-Puffer	48 µl

- 4 min 95° C
- 10 min 70° C
- langsam auf 4° C abkühlen

- Phosphorylierung der annealten Oligonukleotide:

- | | |
|--------------------------|------|
| annealte Oligonukleotide | 2 µl |
| T4-Ligase Puffer | 1 µl |
| T4-Polynukleotid Kinase | 1 µl |
| Nuklease freies Wasser | 6 µl |
- 30 min 37° C
 - 10 min 70° C

- Ligation in pSUPER:

- | | |
|---------------------------|------------|
| annealte, phosphorylierte | |
| Oligonukleotide | 2 µl |
| T4 DNA-Ligase Puffer | 1 µl |
| verdauter pSUPER-Vektor | ca. 400 ng |
| T4 DNA-Ligase | 1 µl |
| Nuklease freies Wasser | ad 10 µl |
- 1 Stunde RT

Vom Ligationsansatz wurden 5 µl in *E. coli* transformiert, die Bakterien auf LB-Amp-Platten ausplattiert, Kolonien gepickt und mit den resultierenden Kulturen eine Plasmid-Präparation durchgeführt. Zur Kontrolle der Plasmide wurde ein EcoRI/HindIII-Verdau durchgeführt und die entstandenen Fragmente auf einem Agarosegel analysiert. Positive Klone sollten ein Fragment von 300 bp, negative eines von 240 bp ergeben.

2.6. Arbeiten mit DNA

2.6.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

- | | | |
|------------|----------------------|---|
| Mini Prep: | Kulturvolumen 2-5 ml | Wizard Plus Minipreps DNA Purification Kit, Promega |
| Midi Prep: | Kulturvolumen 100 ml | Plasmid Purification Kit Midi, Qiagen |
| Maxi Prep: | Kulturvolumen 200 ml | Plasmid Purification Kit Maxi, Qiagen |

Die Isolierung erfolgte nach der jeweiligen Arbeitsanweisung.

2.6.2. Analytische und präparative Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge erfolgte in Agarose-Gelen der Konzentration 1-1,5 % (w/v). Dazu wurde Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht, in den Gelschlitten gegossen und ein passender Kamm zur Ausbildung der Probenaschen an der Gelapparatur befestigt. Um eine vollständige Auspolymerisierung der Agarose zu gewährleisten, wurden die Gele für mind. 30 Minuten bei RT inkubiert, nach dem Auskühlen mit 1x TAE-Puffer überschichtet und die mit Laufpuffer im Verhältnis 1:5 vermischten Proben in die entstandenen Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei einer elektrischen Spannung von 5-10 V/cm. Zur Analyse der DNA-Fragmente wurde das Gel nach ca. 15-minütiger Inkubation in einem Ethidiumbromid-Bad auf einem UV-Schirm der Anregungswellenlänge 254 nm betrachtet und fotografiert. Die Auftragung eines entsprechenden DNA-Standards (DNA-Molekulargewichtsstandard XIV) ermöglichte die Bestimmung der Fragment-Längen. Um bei einer präparativen Elektrophorese Strangbrüche der DNA zu vermeiden, wurde längerwelliges UV-Licht (366 nm) zur Detektion verwendet. Die gewünschten Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des Qiagen Gelextraktionskits wieder aus dem Gel isoliert.

2.6.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Klonierung

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden unter Verwendung spezifischer Primer DNA-Fragmente von Plasmiden amplifiziert und gegebenenfalls gleichzeitig mit Schnittstellen für Restriktions-Endonukleasen versehen. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl mit folgender Zusammensetzung und unter Verwendung des folgenden Temperatur-Programms durchgeführt:

Plasmid	ca. 10 ng
10x Puffer	5 µl
5' Primer (10 pmol/ml)	5 µl
3' Primer (10 pmol/ml)	5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Taq-DNA-Polymerase	1,25 µl
Nuklease freies Wasser	ad 50 µl

5 min.	94° C	
30 Sek.	94° C	} 35x
30 Sek.	T_m der Primer – 3 bis 4° C	
je nach Fragment-Länge	72° C	
7 min.	72° C	→ 4° C ∞

Die jeweilige PCR-Reaktion wurde über ein Agarose-Gel aufgetrennt und analysiert bzw. entsprechende Banden aus dem Gel ausgeschnitten und über einen Geextraktions-Kit aufgereinigt.

2.6.4. Southern Blot

Agarose-Gele die geblottet werden sollten, wurden zunächst mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einem nebenliegenden Lineal photographiert. So kann über die Skala des Lineals der Abstand zwischen den Geltaschen und den Banden des DNA-Standards festgehalten werden, um später Banden auf dem Autoradiogramm einer bestimmten Fragmentlänge zuordnen zu können. Anschließend wurde das Gel mit Depurinierungs-Puffer bedeckt und 20 Minuten bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Es folgte eine 20-minütige Inkubation auf dem Schüttler in Denaturierungs-Puffer und schließlich in Neutralisierungs-Puffer. Das so behandelte Agarose-Gel wurde dann auf drei mit 20x SSC-Puffer getränkte Whatman-Papiere gelegt, die auf einer Glasplatte liegend am oberen und unteren Enden in ein 20x SSC-Puffer-Reservoir eintauchen. Auf das Gel wurde eine zurecht geschnittene Nylon-Transfermembran gelegt und die Ränder mit Klarsichtfolie abgedeckt, um zu verhindern, dass SSC-Puffer aus dem Reservoir an der Membran vorbei gesaugt werden kann. Auf die abgedeckte Membran wurden drei weitere, in SSC-Puffer getränkte Whatman-Papiere gelegt und die Transfer-Vorrichtung schließlich mit einem Stapel Zellstoff-Tücher abgeschlossen, die durch ihre Saugkraft den Puffer-Strom aus dem Reservoir am Gel und der Membran vorbei verursachen. Dabei wird die im Gel enthaltene DNA auf die Membran transferiert, wo sie reversibel gebunden wird. Um einen möglichst effektiven Pufferfluss zu gewährleisten, wurde der Zellstoff-Papierstapel beschwert und die Apparatur über Nacht bei RT inkubiert. Anderentags wurden die Geltaschen mit Bleistift auf der Membran eingezeichnet und die DNA mittels UV-Licht auf der Membran fixiert (*UV-crosslinking*).

Zur Hybridisierung wurde die Membran mit der DNA-Seite nach innen in eine Hybridisierungsflasche gegeben und je nach Größe der Membran mit 6-10 ml ULTRAhyb-Lösung eine Stunde bei 55° C im Hybridisierungssofen prähybridisiert. In der Zwischenzeit konnte die Sonde radioaktiv markiert werden (s. Kapitel B 2.6.5.). Nach Abschluss der Prähybridisierung wurde die radioaktive Sonde zur Prähybridisierungs-Lösung in die Flasche pipettiert und die Hybridisierung über Nacht bei 55° C durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die Sonde abgegossen und die Flasche zunächst zweimal mit wenig Southern-Blot Waschpuffer 1 gespült. Es folgte ein Waschschrift in ca. 200 ml Waschpuffer 1 für 30 Minuten bei 55° C , sowie ein weiterer in Waschpuffer 2 unter den selben Bedingungen. Danach wurde die Temperatur im Hybridisierungssofen auf 65° C erhöht und ein letzter Waschschrift in wieder 200 ml Waschpuffer 2 durchgeführt. Die gewaschene Membran wurde in Klarsichtfolie verpackt, in eine Filmkassette gelegt, ein Röntgenfilm aufgelegt (Kodak BioMax MR) und die Kassette bis zur Entwicklung des Films bei -80° C gelagert.

2.6.5. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA erfolgte mit dem Prime-It® II Random Primer Labeling Kit von Stratagene.

Dazu wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

unmarkierte DNA-Sonde	ca. 25 ng	
Random Primer	10 µl	
Nuklease freies Wasser	ad 34 µl	→ 5 min 95° C
dCTP Puffer	10 µl	
[α^{32} P] dCTPs	5 µl	
Exo(-) Klenow	1 µl	→ 1 Stunde 37° C

Die radioaktiv-markierte DNA wurde dann über Micro Spin S-200 HR Säulchen zentrifugiert, um nicht eingebaute radioaktive Nukleotide zu entfernen. Bevor die gereinigte Sonde zur Hybridisierung verwendet werden konnte, wurde sie für 5 Minuten bei 95° C denaturiert.

2.6.6. Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen der Firmen Roche konnten DNA-Fragmente, die entsprechende Schnittstellen enthielten, verdaut werden. Die Reaktion wurde in

Volumina von 20 bis 50 µl mit ca. 1 µg Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkt angesetzt. Nach Zugabe des vom Enzym vorgegebenen Puffers und 10 Einheiten der jeweiligen Restriktionsendonuklease, wurde der Ansatz zwischen einer Stunde und über Nacht bei der optimalen Reaktionstemperatur (meist 37° C) inkubiert. Die verdauten Fragmente wurden anschließend in einem Agarose-Gel analysiert und gereinigt (Gelextraktion oder PCR-Purification-Kit).

2.6.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt, wobei das DNA-*insert* im Verhältnis zum linearisierten Plasmid im Überschuss vorhanden war (ca. 5:1). Der Ansatz enthielt neben dem Ligationspuffer eine Einheit einer T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) und wurde entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16° C inkubiert und anschließend in *E. coli* transformiert.

2.6.8. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur DNA-Sequenzierungen wurde der ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit verwendet, sowie entweder der ABI310 Genetic Analyzer oder der ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer des Instituts für Pathologie der Universität Regensburg. Abhängig vom jeweiligen Plasmid wurden unterschiedliche Primer für die Sequenzreaktion verwendet, von deren Schmelztemperatur die Wahl des Temperatur-Programms abhing. Bei einem hohen GC-Gehalt der Primer oder einer problematischen Sekundärstruktur des Templates wurden der Reaktion 5 % (v/v) DMSO beigelegt, sowie die Elongations-Temperatur und damit die Geschwindigkeit der DNA-Polymerase erniedrigt, um ein Abfallen des Enzyms an eventuell gebildeten Schlaufen des *templates* zu verhindern.

Für die Zusammensetzung der Sequenzreaktion ergibt sich demnach:

DNA	700 ng
Primer (30 pmol/ml)	2 µl
BigDye™ Terminator Sequencing Kit	8 µl
[DMSO	1 µl]
Nuklease freies Wasser	ad 20 µl

Die Sequenzreaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 3 M Natrium-Acetat-Lösung pH 4,6 und 44 µl Ethanol 100 % 15 Minuten bei RT im Dunkeln gefällt und anschließend für 30

Minuten bei 16 000 g abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde mit 500 µl Ethanol 70 % (v/v) gewaschen, in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und in 12 µl High Dye Formamid aufgenommen. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 95° C und 10 Minuten auf Eis konnten die Proben im Sequenzer analysiert werden.

2.6.9. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

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

$$\text{Konzentration} = 50 \mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.7. PCR zum Nachweis des humanen und des Maus-icp75TNFR

2.7.1. Nachweis des humanen icp75TNFR mittels RT-PCR

Für den Nachweis des humanen icp75TNFR wurde neben einer ersten PCR-Runde zusätzlich eine zweite, mit weiter innenliegenden Primern (*nested*) durchgeführte PCR etabliert. Nach Präparation der RNA, entweder als Gesamt-RNA oder als mRNA (s. Kapitel B 2.2.) und Synthese der cDNA (s. Kapitel B 2.3.1.) wurde zunächst die erste RT-PCR mit folgender Zusammensetzung und folgendem PCR-Programm durchgeführt:

cDNA	5,0 µl			
10x Puffer	2,0 µl	5 min	96° C	
5' Primer (10 pM/ml)	2,0 µl	30 Sek.	96° C	} 45x
3' Primer (10 pM/ml)	2,0 µl	30 Sek.	66° C	
dNTPs (10 mM)	0,4 µl	3 min	68° C	
Taq-Polymerase	0,5 µl	30 min	68° C → 4° C ∞	
DMSO	1,0 µl			
Wasser	ad 20 µl			

Nach erfolgter Polymerase-Kettenreaktion wurde je Reaktionsansatz 1 µl Produkt entnommen und in die *nested* PCR eingesetzt, die nach folgendem Protokoll und Temperatur-Programm durchgeführt wurde:

PCR-Produkt	1,0 µl			
10x Puffer	2,0 µl	5 min	96° C	
5' Primer (10 pM/ml)	2,0 µl	30 Sek.	96° C	} 45x
3' Primer (10 pM/ml)	2,0 µl	30 Sek.	66° C	
dNTPs (10 mM)	0,4 µl	3 min	68° C	
Taq-Polymerase	0,5 µl	30 min	68° C → 4° C ∞	
DMSO	1,0 µl			
Wasser	ad 20 µl			

Beide PCR-Reaktionen wurden auf einem 1,5 %-igen (w/v) Agarose-Gel aufgetrennt, das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt, photographiert und danach auf eine Membran transferiert, um eine Hybridisierung mit einer spezifischen, radioaktiven Sonde durchzuführen (Southern Blot, s. Kapitel B 2.6.4.).

Für alle eingesetzten cDNAs die nicht spezifisch umgeschrieben wurden, wurde zusätzlich eine RT-PCR für das *housekeeping*-Gen β -Actin durchgeführt, um Qualität und Quantität der jeweiligen cDNA-Präparation zu überprüfen.

2.7.2. Nachweis des Maus-icp75TNFR mittels RT-PCR

Die RT-PCR für den Nachweis des micp75TNFR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

cDNA	5 bis 20 µl			
10x Puffer	5 µl	5 min	94° C	
5' Primer (10 pM/ml)	5 µl	30 Sek.	94° C	} 45x
3' Primer (10 pM/ml)	5 µl	30 Sek.	65° C	
dNTPs (10 mM)	1 µl	45 Sek.	72° C	
Taq-Polymerase	1,25 µl	7 min	72° C → 4° C ∞	
Wasser	ad 50 µl			

Nachdem sich auch der Nachweis in der Maus als schwierig erwies, wurden verschiedene cDNA-Mengen in die RT-PCR eingesetzt, mit einer Höchstmenge von 20 µl cDNA/50 µl Gesamtvolumen. Analog zum Humansystem wurde nach der RT-PCR ein Southern Blot durchgeführt.

Für alle eingesetzten cDNAs wurde zusätzlich eine RT-PCR für das *housekeeping*-Gen β -Actin durchgeführt, um Qualität und Quantität der jeweiligen cDNA zu überprüfen.

2.7.3. Quantitative *Real Time* RT-PCR

Neben dem Einbau von SYBR-Green in doppelsträngige DNA während einer PCR-Reaktion kann die quantitative *Real Time* RT-PCR auch mit sogenannten TaqMan-Sonden durchgeführt werden, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff, dem Reporterfarbstoff und 3' mit einem Quencher gekoppelt sind. Sowohl beide Primer als auch die Sonde binden an die cDNA, somit wird eine nachträgliche Hybridisierung, wie sie beim Southern Blot durchgeführt wird, überflüssig und die PCR im Vergleich zur Verwendung von SYBR-Green deutlich spezifischer. Solange sich der Fluoreszenzfarbstoff der Sonde in räumlicher Nähe zum Quencher befindet (dies ist der Fall, wenn die Sonde entweder frei oder gebunden als intaktes Molekül vorliegt), kann das *Real Time* PCR-Gerät keine Fluoreszenzsignale detektieren. Die Fluoreszenz Emission des Reporterfarbstoffes wird durch FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) auf den Quencher übertragen. Wenn aber die Taq-Polymerase beginnt, den 5' Primer zu verlängern, wird im Zuge dieses Prozesses die Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität des Enzyms abgebaut und dadurch der fluoreszierende Farbstoff abgespalten. Folglich ist kein effektives Quenchen mehr möglich und die Optik des PCR-Gerätes kann ein Ansteigen des Fluoreszenzsignals detektieren, das direkt proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produktes ist.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Primer und Sonden wurden als „Assay by Design“ von Applied Biosystems bezogen. Die TaqMan-Sonden waren dabei 5' FAM-markiert (6-Carboxyfluorescein) und 3' mit einem nicht fluoreszierenden Quencher versehen. Die emittierte Fluoreszenz von FAM wird bei 518 nm gemessen. Alle PCR-Reaktionen wurden unabhängig vom verwendeten Assay in der gleichen Zusammensetzung pipettiert und laufen mit dem selben Temperaturprogramm:

cDNA (1:5 verdünnt)	5 μ l			
“Assay by Design”	1 μ l	2 min	50° C	
(Primer und Sonde)		10 min	95° C	
TaqMan Universal PCR	10 μ l	15 Sek.	95° C	} 45x
Mastermix		1 min	60° C	
Nuklease freies Wasser	ad 20 μ l			

Nach Abschluss der PCR wurde für jeden Assay der Schwellenwert (*threshold*) so gelegt, dass er die PCR-Kurven, die sich aus der Auftragung der Anzahl an Zyklen gegen die Fluoreszenz ergeben, in der logarithmischen Phase der Amplifikation schneidet. Dadurch wird am Schnittpunkt der resultierenden Kurve mit dem Schwellenwert der sogenannte *threshold Cycle* (C_t -Wert) festgelegt, also der Zyklus der PCR, in dem die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes den festgelegten *threshold* überschritten hat. Durch Vergleich der C_t -Werte innerhalb eines Laufes, kann eine relative Quantifizierung vorgenommen werden, da ein höherer C_t -Wert im Vergleich zu einem niedrigeren bedeutet, dass eine stärkere Amplifikation der cDNA nötig war, um das selbe Fluoreszenz-Niveau zu erreichen und damit weniger cDNA in der Ausgangspräparation vorhanden gewesen sein muss. Dies bedeutet letztendlich, dass die mRNA in der entsprechenden Probe weniger stark exprimiert wurde. Legt man beim Vergleich der Expression eines bestimmten Gens in unterschiedlichen cDNAs eine Kalibrator-Probe fest, so wird deren enthaltene cDNA-Menge als 1 festgelegt und die der anderen Proben relativ dazu >1 , wenn eine stärkere Expression vorliegt und <1 , wenn sie geringer ist. Da alle PCR-Reaktionen als Triplikate pipettiert werden, ergibt sich aus der Standardabweichung der berechneten relativen Mengen vom Mittelwert, ein Maß für die Pipettiergenauigkeit. Die Methode der Normalisierung jeder Probe zunächst auf das mitgeführte Referenzgen (in der vorliegenden Arbeit ribosomale 18S RNA), wodurch Unterschiede in der eingesetzten Gesamt-RNA-Menge kompensiert werden, und anschließend auf eine festgelegte Kalibrator-Probe, wird als $\Delta\Delta C_t$ -Methode bezeichnet und konnte direkt am *Real Time* PCR-Gerät mit der entsprechenden Software (SDS 2.1 von Applied Biosystems) durchgeführt werden.

2.8. Proteinchemische Methoden

2.8.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, erfolgte auf SDS-Polyacrylamid-Gelen, bestehend aus Sammel- und Trenngel, (Lämmli, 1970). Zwischen zwei Glasplatten wurde in den durch einen *Spacer* entstehenden Raum zuerst das Trenngel gegossen und mit Butanol überschichtet, um eine möglichst glatte Grenzfläche zum Sammelgel zu erreichen. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde die Butanol-Phase entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und je nach

Probenanzahl und -volumen ein passender Kamm eingefügt. Nachdem auch das Trenngel vollständig auspolymerisiert war, wurden die Proben in die Taschen geladen und die elektrophoretische Auftrennung gestartet. Sobald der mitgeführte Blaumarker das Ende des Gels erreicht hatte, wurden die aufgetrennten Protein-Fractionen aus dem Gel auf eine PVDF-Membran transferiert (s. Kapitel B 2.8.3. Western Blot).

Die verwendeten Gele setzten sich im Einzelnen aus folgenden Komponenten zusammen:

	Sammelgel 3%	Trenngel 8%	Trenngel 12%
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (30 %)	0,5 ml	4,0 ml	6,0 ml
1,5M Tris (pH 6,8)	0,38 ml	-----	-----
1,5M Tris (pH 8,8)	-----	3,8 ml	3,8 ml
10 % SDS-Lösung	30 µl	150 µl	150 µl
10 % APS-Lösung	30 µl	150 µl	150 µl
TEMED	3 µl	9 µl	6 µl
Demin. Wasser	2,1 ml	7,0 ml	5,0 ml

2.8.2. Coomassie-Färbung

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

2.8.3. Western Blot

Zur Detektion der im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine, wurden diese auf eine PVDF-Membran transferiert (Western Blot; Towbin, 1979). Dazu wurden jeweils drei Whatman-Papierstücke in Gelgröße mit den Transferpuffern A, B und C getränkt (Zusammensetzung s. Kapitel B 1.9. Puffer und Lösungen). Dann wurde ein Sandwich aus je drei Whatman-Papieren mit Puffer A und B auf die Anodenplatte der Blot-Apparatur gelegt. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol befeuchtet, in Puffer B gespült und als nächste Schicht auf die Whatman-Papiere gelegt. Anschließend wurde das Gel, welches zuvor 15 Minuten in Transferpuffer B inkubiert wurde, aufgelegt und mit drei Lagen Whatman-Papier Puffer C bedeckt. Die Apparatur wurde mit der Kathodenplatte geschlossen. Der

Proteintransfer erfolgte durch Anlegen einer elektrischen Spannung für 1 h bei einer Stromdichte von 0,8 mA/cm².

2.8.4. Detektion membrangebundener Proteine durch Antikörper

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran in TBS-T mit 1 % (w/v) Magermilchpulver, oder bei Verwendung biotinylierter Antikörper mit 1 % (w/v) BSA, über Nacht blockiert. Am nächsten Tag wurden die auf die PVDF-Membran geblotteten Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Dies geschah unter Verwendung eines mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) markierten Sekundär-Antikörpers.

Die Inkubationszeit betrug für jeden Antikörper jeweils 1 Stunde, gefolgt von drei 5-minütigen Waschschritten in TBS-Tween. Einzig vor der Detektion wurde die Membran in Tensid-freiem TBS gewaschen. Der eigentliche Nachweis beruht auf einer Chemolumineszenz-Reaktion (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 10 min.

2.8.5. RIPA-Lyse

Am Vortag der Lyse wurden 4×10^6 Zellen in eine 10 cm Schale ausgesät, am folgenden Tag nach zweimaligem Waschen mit PBS mit 1 ml kaltem RIPA-Lyse-Puffer versetzt und mit Hilfe eines Zellschabers in den Puffer überführt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis und mehrmaligem *vortexen*, wurden alle nicht löslichen Bestandteile (z.B. DNA) 5 Minuten bei 16 000 g abzentrifugiert. Der Überstand (Total-Lysat) kann bei -20° C über einige Monate hin aufbewahrt oder sofort analysiert werden.

2.8.6. Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation ermöglicht das Isolieren von Proteinen und assoziierter Proteinkomplexe aus Total-Lysat durch spezifische Antikörper, dient aber auch der Konzentrierung einer bestimmten Protein-Fraktion, wodurch auf diese Weise das Äquivalent eines kompletten Total-Lysats im SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert werden kann. Der für die Präzipitation verwendete Antikörper spielt hier eine zentrale Rolle, da er sowohl das Antigen als auch Protein A oder G zu binden vermag. Im

preclearing wurden zunächst 20 µl Protein G-Sepharose zu 1 ml Total-Lysat gegeben und für mind. 3 Stunden bei 4° C auf einem Rotor inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (16 000 g; 5 min) waren somit alle an die G-Sepharose unspezifisch bindenden Komponenten aus dem Lysat entfernt und der Überstand wurde bei 4° C über Nacht mit 2 bis 10 µg antigenspezifischem IgG-Antikörper inkubiert. Die gebildeten Immunkomplexe wurden über eine 1-stündige Rotation bei 4° C an 20 µl Protein G-Sepharose gebunden und durch Zentrifugation abgetrennt. Das Pellet wurde nach dreimaligem Waschen mit PBS im 4-fach reduzierenden Lämmli-Puffer aufgenommen, 5 Minuten bei 95° C aufgeköcht, erneut zentrifugiert, um die Protein G-Sepharose von der Protein-Fraktion abzutrennen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.9. Zellbiologische Methoden

2.9.1. Zellkulturbedingungen

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter Verwendung steriler Reagenzien in einer Sterilbank (Laminair Flow) durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien bzw. Primärkulturen wurden in Zellkulturflaschen mit dem in Kapitel 1.10. angegebenen Medium bei 37° C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank (Cell Safe) kultiviert. Abhängig von der jeweiligen Linie wurden die Zellkulturen dreimal wöchentlich im Verhältnis 1:5 oder zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 geteilt. Musste ein Medienwechsel oder Waschschrift vorgenommen werden, wurden die Zellen in sterile Falcon-Röhrchen überführt, 5 Minuten bei ca. 300 g zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in der entsprechenden Lösung resuspendiert.

2.9.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen, die langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert werden sollten, wurden zunächst bei 300 g pelletiert und in einer Konzentration von ca. 1×10^6 Zellen/ml in kaltem Einfriermedium (50 % RPMI 1640; 40 % FCS; 10 % Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Anschließend wurden Aliquots von 1,8 ml 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, möglichst rasch in 10 ml kaltem Medium gewaschen, zentrifugiert und in frisches Kulturmedium überführt.

2.9.3. 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 geeignete Verdünnung (meist 1:10) aus Zellsuspension und Trypanblaulösung hergestellt und in einer Neubauer-Zählkammer die Zahl an lebenden, also nicht durch Trypanblaulösung angefärbten Zellen mikroskopisch ermittelt. Dabei wurden alle 4 großen Quadrate à 16 Kleinquadrate ausgezählt und daraus ein Mittelwert für 16 Kleinquadrate gebildet.

Die Zellkonzentration wurde wie folgt berechnet:

$$\text{MW der Zellzahl in 16 Kleinquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl} \times 10^4 / \text{ml}$$

2.9.4. Mycoplasmentest

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

2.9.5. TNF-induzierter Zytotoxizitäts-Test

Der TNF-induzierte Zytotoxizitäts-Test wurde in einer 96-Loch-Platte durchgeführt. Um einen konfluenten Zellrasen zu erhalten, wurden 2×10^4 L929-Zellen oder die gleiche Anzahl an entsprechend gentechnisch veränderten L929-Zellen pro Loch in einem Volumen von 100 µl ausgesät und über Nacht unter den üblichen Bedingungen für L929-Zellen inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und rekombinantes humanes oder Maus-TNF in einer log₂-Verdünnung über die lange Reihe der 96-Loch-Platte titriert, wobei das erste Loch eine empirisch ermittelte, absolut toxische Menge und das letzte überhaupt kein TNF enthielt (100 %- und 0 %-Wert). Die Randlöcher der Platte enthielten keine Zellen, wurden ansonsten jedoch genau wie der Rest der Platte behandelt (Mediumkontrolle). Zu den 100 µl TNF-enthaltenden Mediums wurden anschließend 100 µl Actinomycin D-haltiges Medium der Konzentration 4 µg/ml gegeben, um die Proteinbiosynthese zu blockieren und die Platte dann für weitere 24 Stunden inkubiert. Zur Bestimmung des Anteils an lebenden Zellen wurden dem Kulturmedium 10 µl einer MTT-Stammlösung zugesetzt und die Platte für 4 Stunden in den Inkubator gegeben. MTT wird ausschließlich von stoffwechselaktiven Zellen aufgenommen und in deren Mitochondrien oxidativ umgesetzt, was zur Bildung eines blauen Farbstoffes führt. Die

Entstehung dieser blauen Formazan-Kristalle verhält sich demnach direkt proportional zur Viabilität der in der Kultur enthaltenen Zellen. Die Farbstoff-Kristalle wurden durch Zugabe von 70 µl einer 20 %-igen (w/v) SDS-Lösung aufgelöst und gleichzeitig die Reaktion durch eine SDS-vermittelte, komplette Lyse der Zellen abgestoppt. Die optische Dichte des Reaktionsprodukts wurde bei 540 nm vermessen. Die Viabilität wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Viabilität im Loch } y [\%] = 100 \% \times (A_y - A_{\text{Mediumkontrolle}}) / (A_{100 \% \text{-Wert}} - A_{\text{Mediumkontrolle}})$$

Der Zytotoxizitäts-Test mit dem agonistischen Antikörper gegen mp55TNFR erfolgte analog. In allen Fällen wurden jeweils Duplikate pipettiert.

2.9.6. TNF-Zytotoxizitäts-Hemmtest mit löslichem humanen oder Maus-TNF

4 x 10⁶ Zellen, deren Überstand auf hemmende Aktivität untersucht werden sollte, wurden über Nacht in eine 10 cm Schale (Volumen 10 ml) ausgesät, am nächsten Tag der Überstand gesammelt und eventuell vorhandene Zellen bzw. Zellbestandteile abzentrifugiert. Der TNF-Zytotoxizitäts-Hemmassay wurde an L929-Zellen analog dem TNF-induzierten Zytotoxizitäts-Test durchgeführt, allerdings wurde sowohl die TNF- als auch die Actinomycin D-Lösung im konditionierten Medium hergestellt, um eine zu starke Verdünnung des im Überstand gesammelten Proteins zu verhindern.

2.9.7. TNF-Zytotoxizitäts-Hemmtest mit transmembranärem TNF

Auch für diese Art des TNF-Zytotoxizitäts-Hemmtests wurden 4 x 10⁶ Zellen, deren Überstand auf hemmende Aktivität untersucht werden sollte, über Nacht in eine 10 cm Schale (Volumen 10 ml) ausgesät und am nächsten Tag der Überstand gesammelt. Zur Induktion des Zelltodes mussten L929-Zellen, die mit einer nicht proteolytisch spaltbaren Mutante von Maus-TNF transduziert worden waren, mit Paraformaldehyd fixiert werden, da der Einsatz lebender Zellen zum einen eine Kontamination des Tests mit löslichem TNF der transduzierten Zellen verursachen würde und zum anderen die Detektion der Viabilität mittels MTT stark beeinträchtigen würde. Zur Fixierung wurden 8 x 10⁶ transduzierte L929-Zellen zunächst mit PBS gewaschen, auf dem Vortexer mit 1,5 ml Cytofix/Cytoperm Reagenz versetzt und 20 Minuten bei 4° C inkubiert. Anschließend erfolgten 5 Waschschrte mit jeweils 15 ml PBS/10 % FCS, um eine vollständige Elimination des Fixatives aus der Präparation zu gewährleisten. Die fixierten Zellen wurden schließlich in 400 µl des gesammelten Zellkultur-Überstandes aufgenommen und je 200 µl davon zur Doppelbestimmung in die ersten *wells* einer 96-Loch-Platte, die

bereits eine konfluente Schicht an Wildtyp-L929-Zellen enthielt, pipettiert. Analog dem löslichen TNF wurden auch die fixierten Zellen in log₂-Schritten über die lange Seite einer 96-Loch-Platte verdünnt. Abschließend wurde dem Test in Zellkultur-Überstand gelöstes Actinomycin D in einer Konzentration von 4 µg/ml zugefügt und anderentags die Viabilität der Zellen mittels MTT und SDS detektiert

2.9.8. Transfektion mit Hilfe kathionischer Liposomen

Um Zellen transient mit Plasmid-DNA zu transfizieren, wurden 2×10^5 Zellen pro Kultur in eine 6-Loch-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. 2 µg DNA wurden in 100 µl serumfreiem Medium verdünnt, mit 10 µl Superfect-Reagenz (Qiagen) versetzt, gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit konnten sich Aggregate aus DNA und den in Superfect enthaltenen kathionischen Liposomen bilden. Anschließend wurden die DNA-Superfect-Aggregate mit 600 µl Serum- und Antibiotikum-haltigen Medium vermischt und auf die vorher mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Nach 2 bis 3-stündiger Inkubation wurde das Superfect-Reagenz wieder von den Zellen abgenommen, diese dreimal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium aufgefüllt. 24 bis 48 Stunden nach der Transfektion konnte mit transienter Proteinexpression gerechnet werden. Sollte die Transfektion stabil erfolgen, so wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion im Verhältnis 1:2 in eine kleine Zellkulturflasche gesplittet und mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum versehen. Als Kontrolle für die Selektion wurden auch nicht transfizierte Zellen mit Antibiotikum versehen und der Selektionsdruck solange aufrecht erhalten, bis alle Zellen der Kontrolle abgestorben waren.

2.9.9. Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation

Diese Methode wurde zur Gewinnung der micp-/p75TNFR-Ig-Fusionsproteine angewandt. Dazu wurden 4×10^6 HEK-Zellen in eine 10 cm Schale ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Stunde vor Transfektion das Medium gewechselt, um optimale pH-Bedingungen zu gewährleisten. Für die Transfektion selbst wurden 10 µg des entsprechenden Vektors mit sterilem, Nuklease-freiem Wasser auf 450 µl aufgefüllt, die DNA-Lösung dann mit 50 µl einer 2,5 M Ca₃(PO₄)₂-Lösung versetzt und diese Mischung auf dem Vortexer in der Sterilbank in 500 µl 2x HEPES-Puffer langsam eingetropft. Dieser Mix wurde dann zügig auf die 10 ml Zellkulturmedium der HEK-Zellen verteilt, für 5 Stunden unter den üblichen Bedingungen für HEK-Zellen inkubiert und anschließend das Medium gegen frisches ausgetauscht.

48 Stunden nach Transfektion konnte mit einer ausreichenden Protein-Menge im Überstand der Zellen gerechnet werden.

2.9.10. Retrovirale Transduktion

Auch diese Methode wurde verwendet, um Zelllinien zu generieren, die ein gewünschtes Protein stabil exprimieren. Gerade bei L929-Zellen hatte sich gezeigt, dass über eine längere Passage, negative Klone, die dennoch resistent gegen das Selektionsantibiotikum sind, in der Kultur hochwachsen, wenn die Transfektion mittels kationischer Liposomen durchgeführt wurde. Deshalb wurden speziell L929-Zellen bevorzugt mittels retroviralem Gentransfer transduziert. Hierfür wurden 4×10^6 HEK-Zellen (Produzenten-Zelllinie) in eine 10 cm Schale ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen unter Verwendung der Calcium-Phosphat-Präzipitation (s. Kapitel B 2.7.9.) mit 30 µg des proviralen Vektors, der das Zielgen enthält, und 30 µg des Vektors für die Adenovirusproteine transient transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion der Produzenten-Zelllinie konnte mit einer ausreichenden Anzahl an Viren im Überstand der HEK-Zellen gerechnet werden. Die so entstehenden Viren sind nicht mehr replikationsfähig, tragen aber die Information des Zielgens als RNA sowie eine Antibiotika-Resistenz (im Falle des verwendeten pQCXIP-Vektors eine Puromycin-Resistenz). Der Virus-haltige Überstand wurde abgenommen, mit Polybrene (Endkonzentration 8 µg/ml) versetzt und durch eine *low-protein-binding*-Membran (PALL) filtriert. Der nun von Schwebstoffen und Zellfragmenten befreite Überstand wurde 1:2 mit frischem Polybrene-haltigem Medium verdünnt, um die Nährstoffdichte des über 48 h auf den HEK-Zellen verbliebenen Mediums wieder zu erhöhen. Der infektiöse HEK-Überstand wurde auf Eis gelagert und über den Tag verteilt in 2-3 Portionen auf die Zielzellen gegeben. Die Viren erkennen bestimmte Oberflächenmoleküle der Zielzellen, fusionieren in Anwesenheit des Tensids Polybrene leicht mit diesen, schreiben die RNA, die für die Produktion von Virus-Partikeln wichtig ist zusammen mit der RNA des Zielgens mittels viruseigener reverser Transkriptase in DNA um und integrieren diese dann stabil ins Wirtsgenom. Das Ernten von Virus-haltigem Überstand und Infizieren der Zielzellen kann nach 24 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.

Da in der vorliegenden Arbeit nur Maus-Zelllinien transduziert wurden, konnte mit einem ecotrophen Plasmid unter S1-Bedingungen gearbeitet werden.

2.9.11. Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden auf einem FACScan Flow Cytometer der Firma Becton Dickinson durchgeführt, als Listmode-Dateien gespeichert und die Auswertung in WinMDI 2.8 vorgenommen. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienten FITC-, PE- und APC-Farbstoffe sowie EYFP. Außerdem wurden die Zellen kurz vor der Messung mit Propidium-Iodid (PI), einem DNA-Farbstoff versetzt, um PI-positive und damit tote Zellen ausschließen zu können.

Für die Belegung der verschiedenen Kanäle des FACScan Durchflusszytometers ergibt sich demnach:

1. <i>Forward Scatter</i> (FSC)	Zellform/Zellgröße
2. <i>Sideward Scatter</i> (SSC)	Granularität
3. Fluoreszenzkanal 1 (Fl1-H)	FITC- und EYFP-Fluoreszenzintensität
4. Fluoreszenzkanal 2 (Fl2-H)	PE-Fluoreszenzintensität
5. Fluoreszenzkanal 3 (Fl3-H)	PI- Fluoreszenzintensität
6. Fluoreszenzkanal 4 (Fl4-H)	APC-Fluoreszenzintensität

Alle Parameter wurden bei der Auswertung logarithmisch aufgetragen.

Zur durchflusszytometrischen Untersuchung wurden die Zellen mit PBS/FCS (2 % v/v) gewaschen, auf FACS-Röhrchen verteilt (ca. 1 bis $0,5 \times 10^6$ Zellen), bei 300 g pelletiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Anschließend erfolgte ein Blockierungsschritt, durch den unspezifische Bindungen der Antikörper verringert werden sollten. Im Falle der primären CD8⁺ T-Zellen erfolgte der Block für 20 Minuten und in 50 µl Volumen mit einem spezifischen Antikörper gegen die Fcγ-Rezeptoren II und III in PBS/10 % FCS, im Falle der L929-Zellen nur in PBS/10 % FCS. Die Antikörper wurden dann in weiteren 50 µl PBS/10 % FCS zugegeben, womit das Reaktionsvolumen für die Färbung 100 µl betrug. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Zellen pelletiert, der Antikörper-haltige Überstand abgenommen, die Zellen in 4 ml PBS/2 % FCS resuspendiert und bei 300 g wiederum pelletiert. Bei nicht direkt Fluoreszenz-markierten Antikörpern erfolgte eine 30-minütige zweite Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der ebenfalls durch einen Waschschrift wieder entfernt wurde. Im Falle des Hamster anti-Maus p75TNFR Klon TR-54.7, der nur gereinigt aber nicht biotinyliert ist, wurde eine Dreifachfärbung durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die Zellen dabei mit dem

genannten Antikörper inkubiert, im zweiten Schritt mit einem biotinylierten Ziege anti-Hamster Antikörper und schließlich mit Streptavidin-APC gefärbt.

Alle Inkubationen wurden auf Eis und soweit farbstoffmarkierte Antikörper beteiligt waren, unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung durchgeführt. Kurz vor der Messung wurden die Proben mit PI-Lösung versehen, um eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen zu ermöglichen. Die Zellen, die EYFP positiv waren, konnten ohne weitere Behandlung direkt im FI-1 detektiert werden.

Da für die durchflusszytometrische Analyse der icp-/p75TNFR-Ig-Fusionsproteine nur Zellkulturüberstand für die Bindung an TNF-exprimierende Zellen zur Verfügung stand, wurden die Zellen für mind. 1 Stunde bei 4° C in 1 ml Fusionsprotein-haltigem Medium auf einem Rotor inkubiert, um eine möglichst effektive und vollständige Bindung zwischen der micp-/p75TNFR-Extrazellulärdomäne und dem transmembranären TNF der L929-Zellen zu gewährleisten.

2.9.12. MACS-Reinigung

Zur Anreicherung von primären CD8⁺ T-Zellen aus 3 Maus-Milzen wurde zunächst anhaftendes Bindegewebe entfernt, das Organ dann auf einer Seite aufgeschnitten und die Zellen anschließend vorsichtig mit einer Pinzette aus der Organhülle ausgestrichen. Die Gewebestücke wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren möglichst in eine Einzelzellsuspension überführt und diese durch Filtration über ein Zellsieb (Maschenweite 40 µm) von übrig gebliebenen, größeren Aggregaten befreit. Nach einem Waschschrift in RPMI-Medium/10 % FCS (v/v) wurden die Zellen in 1 ml Medium aufgenommen und die enthaltenen Erythrozyten durch hypotone Lyse mittels ACK-Puffer (5 ml; 4 min) entfernt. Nach Abstoppen der Lyse mit 45 ml RPMI-Medium/10 % FCS und einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen erneut über ein Zellsieb filtriert, um bei der Lyse entstandene Präzipitate zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen gezählt, pelletiert und pro 1 x 10⁸ Zellen 900 µl PBS/10 % FCS und 100 µl CD8a MicroBeads zugegeben. Die Inkubation mit den Magnet-gekoppelten Beads erfolgte für 20 Minuten auf Eis. Die Zellen wurden dann in 50 ml MACS-Puffer gewaschen, erneut filtriert, pelletiert und möglichst Luftblasen-frei in 3 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Aufreinigung der CD8⁺ und daher mit magnetischen *beads* versehenen T-Zellen erfolgte durch Bindung an eine im magnetischen Feld befindliche MACS Separations-Säule, die vorher mit MACS-Puffer equilibriert wurde. In drei Waschschriften à 3 ml MACS-Puffer wurden so viele CD8⁻, unspezifisch haftende Zellen wie möglich von der Säule gespült.

Nachdem die MACS-Säule aus dem Magnetfeld entfernt worden war, konnte die CD8⁺-Fraktion eluiert, mit PBS/10 % FCS rekonstituiert und gezählt werden. Die Reanalyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Zur in vitro Stimulierung der CD8⁺ T-Zellen wurde eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml und eine Antikörper-Konzentration von 10 µg/ml löslichem anti-CD28 eingestellt. Die Zellen wurden auf einer 24-Loch-Platte, die über Nacht bei 4° C mit 10 µg/ml anti-CD3 Antikörper beschichtet worden war, mit je 1 ml pro Kultur ausgesät und für 48 Stunden inkubiert, bevor erneut eine durchflusszytometrische Analyse vorgenommen und die RNA isoliert werden konnte (Kim, 2001).

2.10. ELISA

2.10.1. ELISA zum Nachweis der micp-/p75TNFR-Ig-Fusionsproteine

Zum Nachweis der Fusionsproteine im Überstand transduzierter HEK-Zellen, wurde ein sogenannter Sandwich-ELISA etabliert, bei dem eine Mikrotiterplatte mit einem *Capture*-Antikörper beschichtet wird, an den das nachzuweisende Protein spezifisch binden kann. Der Nachweis erfolgt über einen zweiten, spezifischen Antikörper, der als Detektions-Antikörper bezeichnet wird. Da es für die Extrazellulärdomäne des micp75TNFR nur einen spezifischen Antikörper gibt, wurde die 3' gelegene c-myc-Markierung des Fusionsproteins zur Bindung an die Platte verwendet.

Im Einzelnen wurde zunächst der Maus anti-human c-myc Antikörper (9E10) in PBS auf eine Konzentration von 5 µg/ml verdünnt, eine ELISA-Platte mit dieser Antikörper-Verdünnung (100 µl/well) über Nacht bei 4° C beschichtet und, nachdem die Platte mit TBS-T gewaschen worden war, diese für zwei Stunden mit TBS/1 % (w/v) BSA blockiert. Nach erneutem Waschen wurden die Fusionsprotein-haltigen Überstände auf die Platte pipettiert und über Nacht bei 4° C inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit TBS-T und eine 2-stündige Inkubation mit dem biotinylierten Hamster anti-Maus p75TNFR Antikörper, Klon TR-32.4, in einer Konzentration von 5 µg/ml. Nicht gebundener Antikörper wurde wieder in drei Waschschriffen mit TBS-T entfernt und die Platte mit einer 1:200 Verdünnung des Streptavidin-HRP aus den R&D-Systems ELISA-Kits für 20 Minuten inkubiert. Auch überschüssiges bzw. nur unspezifisch gebundenes Streptavidin-HRP wurde in drei Waschschriffen wieder von der Platte entfernt. Die Detektion erfolgte schließlich durch Zugabe von ABTS in ABTS-Puffer, welches durch die Peroxidase in ein grünes Produkt umgesetzt wird. Die Konzentration des entstandenen

Produktes und damit auch die Konzentration an nachzuweisendem Protein konnte durch Messung der Absorption bei 405 nm bestimmt werden. Da es für die Fusionsproteine keinen Standard bekannter Proteinmenge gibt, konnte die Auswertung nur in relativen Mengen erfolgen.

2.10.2. ELISA für den Nachweis von mTNF

Um zu überprüfen, ob die mit einer nicht proteolytisch spaltbaren Mutante von mTNF transduzierten L929-Zellen tatsächlich kein lösliches TNF in den Überstand abgeben, wurde ein ELISA auf mTNF durchgeführt. Dies geschah mit Hilfe eines ELISA-Kits von R&D-Systems unter Einhaltung des zum Kit gehörenden Protokolls. Für die Gewinnung des Zellkultur-Überstandes wurden 5×10^6 Zellen in einer 10 cm Schale ausgesät (Volumen 10 ml) und für 24 Stunden inkubiert. Um Zellen bzw. Zellbestandteile zu entfernen, wurde der Überstand zuerst zentrifugiert bevor er auf die ELISA-Platte aufgetragen wurde.

Das Ausmaß der Umsetzung von ABTS wurde durch Messung der Absorption bei 405 nm bestimmt und mit Hilfe des mitgeführten Standards bzw. der Standardgerade in Proteinmenge umgerechnet.

2.11. Fluoreszenzmikroskopie

2.11.1. Verwendete Filtersätze

Einstellung	Anregung	Emission	Detektion von
FITC	480 +/- 15 nm BP	535 +/- 20 nm BP	EYFP
DAPI	360 +/- 20 nm BP	460 +/- 25 nm BP	Dapi

2.11.2. Herstellung der Fixierlösung (Paraformaldehyd 4 %)

Da eine Alkoholfixierung für GFP-Analoga nicht geeignet ist, wurden die zu untersuchenden Zellen mit einer 4 %-igen Paraformaldehydlösung fixiert.

Dazu wurden 30 ml demineralisiertes Wasser auf 65° C erhitzt und nach Zugabe von 2 g Paraformaldehyd tropfenweise mit 10 N NaOH versetzt, bis eine sichtbare Klärung eingetreten war. Nach Zugabe von 16,6 ml 3x PBS wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Dann wurde mit demineralisiertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt, die Lösung aliquotiert und bei -20° C eingefroren.

2.11.3. Immunhistochemische Färbungen

Die Methode verwendet eigentlich Fluorophor-gekoppelte Antikörper, mit deren Hilfe Proteine oder Zellbestandteile durch Immunmarkierung unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können. Da im Falle des micp75TNFR das Protein an EYFP fusioniert exprimiert wurde, war eine Färbung mit spezifischen Antikörpern nicht nötig. Die Zellen konnten theoretisch ohne weitere Färbung direkt unter dem Mikroskop betrachtet werden. Zur besseren Bestimmung lebender Zellen und um eine genauere Lokalisierung der Rezeptoren vornehmen zu können, wurde der Zellkern aber mit Dapi angefärbt.

Im Einzelnen wurden dazu 5 bis 8×10^5 adhärenente Zellen pro Kammer auf einen Four-Chamber-Cover-Slide ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer 4 %-igen Paraformaldehydlösung (250 µl pro Kammer) für 15 Minuten fixiert. Um eine intrazelluläre Färbung zu erzielen, mussten die Zellen anschließend durch eine fünfminütige Inkubation mit einer 0,1 %-igen Triton-X-100-Lösung permeabilisiert werden. Nachdem die Zellen sorgfältig mit PBS gewaschen worden waren, wurden sie für eine Stunde mit PBS/1 % BSA blockiert. Anschließend erfolgte die Kernfärbung durch Inkubation mit einer Dapi-Lösung (Verdünnung der Stammlösung in PBS 1:100) für 15 Minuten. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Kammern vom Objektträger abgehebelt und das Präparat wurde unter Verwendung des MobiGlow-Mounting-Mediums mit einem Deckglas versehen. Der Objektträger wurde im Dunkeln bei 4° C aufbewahrt.

2.12. Tierexperimente

2.12.1. 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.

2.12.2. D-Galactosamin-/LPS-induzierter Hepatotoxizitäts-Test

Der D-Galactosamin-/LPS-induzierte Hepatotoxizitäts-Test ist ein *in vivo* TNF-Test, bei dem durch exogene Gabe eigentlich subletaler Dosen von LPS endogenes TNF freigesetzt wird. Durch die gleichzeitige Applikation des Transkriptions-Hemmers D-Galactosamin (DGalN) wird eine Aktivierung von NF-κB und damit die Expression anti-apoptotischer

Schutzgene unterbunden. Besonders die stoffwechselaktiven Hepatozyten sind von der TNF-Toxizität betroffen und so sterben die Mäuse ungefähr 5 Stunden nach der kombinierten Gabe von LPS und DGalN, während die Verabreichung der Einzelsubstanzen nicht zum Tod der Tiere führt. Die Applikation erfolgte sowohl für DGalN/LPS als auch für die Einzelsubstanzen durch intra peritoneale Injektion.

Im Einzelnen wurden den Mäusen folgende Mengen injiziert:

100 µl PBS pro 20 g Maus

1 µg LPS in 200 µl PBS pro 20 g Maus

14 mg DGalN in 200 µl PBS pro 20 g Maus

100 ng LPS / 14 mg DGalN in 200 µl PBS pro 20 g Maus

Nach Applikation der Reagenzien wurden die Mäuse über ca. 5 Stunden beobachtet und die Lebern entnommen, sobald es der DGalN/LPS-behandelten Maus sichtbar schlechter ging. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Kit von Qiagen.

C Ergebnisse

Bei Untersuchungen zur Regulation des Typ II TNF-Rezeptors (p75TNFR) wurde sowohl im Maus-, als auch im Human-System eine neue Isoform dieses Rezeptors nachgewiesen, welche durch Benutzen eines weiter 5' liegenden Transkriptionsstartpunktes und anschließendes alternatives Spleissen entsteht (Seitz, 2001). Erste Sequenzanalysen und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die neue Isoform im Gegensatz zum p75TNFR nicht über ein Signalpeptid direkt auf die Zellmembran gebracht werden kann, sondern intrazellulär verbleibt, weshalb sie als intracellular (ic)p75TNFR bezeichnet wurde. Nähere Untersuchungen zum humanen icp75TNFR (hicp75TNFR) haben weiter gezeigt, dass Zellen, welche diese TNF-Rezeptor-Isoform exprimieren, vor TNF-induzierter Zytotoxizität geschützt sind (Seitz, 2001). Dies legt den Schluss nahe, dass Zellen, die sowohl TNF produzieren, als auch den icp75TNFR tragen, zum einen von einer Aktivierung durch exogenes TNF unabhängig werden und sich zum anderen über diese Isoform eventuell vor dem von ihr selbst produzierten toxischen TNF schützen können. Durch diesen autarken Überlebensmechanismus könnte somit auf zellulärer Ebene eine Entzündung chronifizieren, ohne von therapeutischen Maßnahmen die ausserhalb der Zelle ablaufen, beeinflussbar zu sein.

Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit die genaue Regulation des humanen icp75TNFR mittels Quantifizierung auf RNA-Ebene untersucht werden, um dadurch Rückschlüsse auf die genaue Funktion und Bedeutung des hicp75TNFR ziehen zu können und so Hinweise auf mögliche therapeutisch sinnvolle Interventionsstrategien zu erhalten.

1. Nachweis, Quantifizierung und funktioneller *knock down* des humanen icp75TNFR

1.1. Nachweis mittels RT-PCR und Southern-Hybridisierung

Nachdem der humane icp75TNFR entdeckt und aus der mRNA von THP-1 Zellen, einer monozytären Tumorzelllinie, kloniert worden war, wurde der Nachweis für die neue Isoform auch in verschiedenen anderen Tumorzelllinien geführt (Seitz, 2001). Allerdings war schon zum damaligen Zeitpunkt auffällig, dass in allen untersuchten Präparationen, die positiv für das entsprechende Transkript waren, selbst nach Stimulierung, nur sehr

wenig mRNA exprimiert wird, denn ein positiver Nachweis gelang ausschließlich durch auf die RT-PCR folgende spezifische Southern-Hybridisierung. Deshalb sollte zunächst versucht werden, die Sensitivität der RT-PCR Methodik dahingehend zu verbessern, dass ein Nachweis bereits ohne Hybridisierung geführt werden kann. Von entscheidender Bedeutung ist hierbei die richtige Auswahl von Primern und Sonden, da die Homologie zum hp75TNFR sehr groß ist und die für den hicp75TNFR spezifische Sequenz auf das alternative Exon 1a beschränkt bleibt (Abb. 2). Die hohe Sequenzübereinstimmung zwischen den beiden Isoformen macht auf der anderen Seite auch deutlich, warum die Untersuchungen zur Regulation auf RNA-Ebene erfolgen müssen, denn spezifische Antikörper für die neue Isoform sind nicht verfügbar.

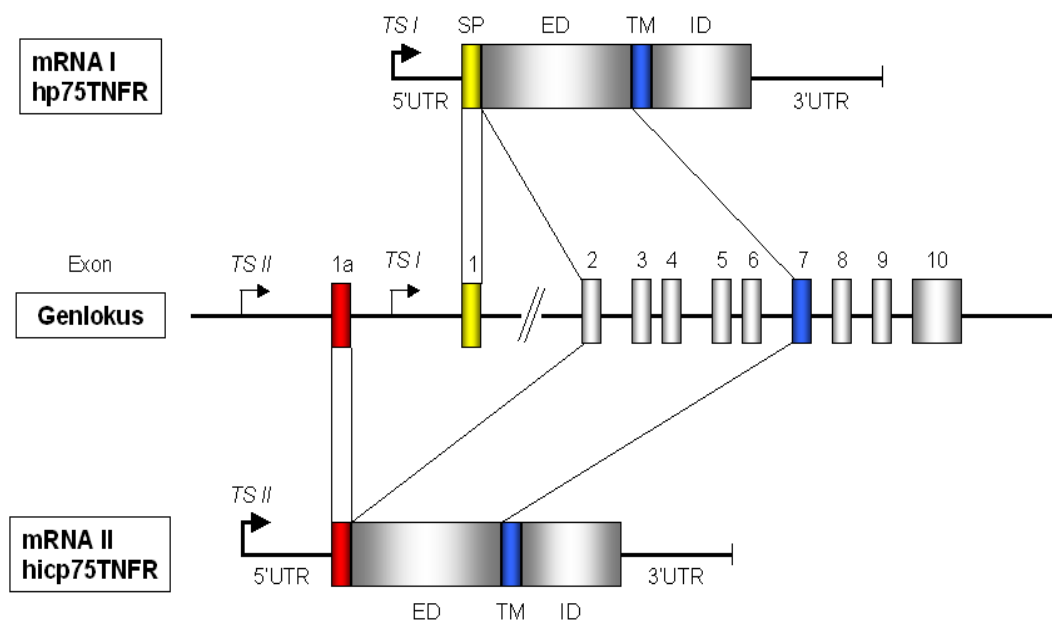


Abb. 2: Genloкус und Entstehung der mRNA beider p75TNFR-Isoformen. Im Falle der hicp75TNFR-mRNA wird an Stelle des Exon 1 (gelb), welches beim hp75TNFR für ein Signalpeptid kodiert, das alternative Exon 1a (rot) an die Exone 2-10 gespleisst. Damit wird deutlich, dass sich die für den hicp75TNFR spezifische Sequenz auf das alternative Exon 1a inklusive der 5' untranslatierten Region (5'UTR) beschränkt. TS: Transkriptionsstart; SP: Signalpeptid; ED: Extrazellulärdomäne; TM: Transmembran-domäne; ID: Intrazellulärdomäne; UTR: Untranslatierte Region

Zur Verbesserung des bisherigen Protokolls wurden verschiedene Vorgehensweisen, die RNA-Aufarbeitung und den Schritt des Umschreibens von RNA in cDNA betreffend, getestet. Ausserdem wurde zusätzlich zur ersten, eine zweite RT-PCR mit weiter innen liegenden Primern (*nested* PCR) etabliert, mit deren Hilfe sich die Sensitivität des Nachweises noch einmal deutlich verbessern lassen sollte (Abb. 3).

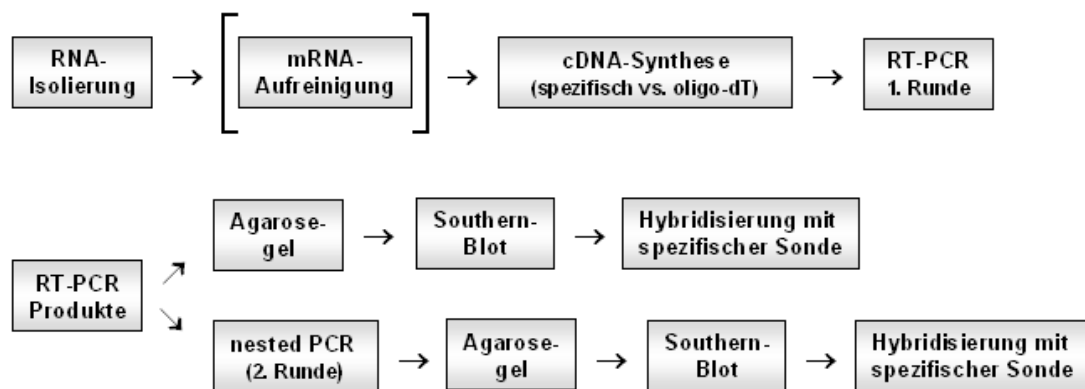


Abb. 3: Vorgehensweise beim Nachweis des humanen icp75TNFR. Optional zum Umschreiben der kompletten RNA, wurde eine zusätzliche mRNA-Reinigung getestet. Die cDNA-Synthese erfolgte entweder durch oligo-dT- oder einen für hp75-/hicp75TNFR spezifischen Primer. Beide RT-PCR-Reaktionen (sowohl die erste RT-PCR als auch die *nested* PCR) wurden über ein Agarose-Gel aufgetrennt, geblottet und die Membran mit einer radioaktiv markierten, spezifischen Sonde für hicp75TNFR hybridisiert.

Auch durch die zusätzliche mRNA-Reinigung und Einführen eines spezifischen Umschreibeschrittes in cDNA, gelang es nicht, das Transkript für hicp75TNFR bereits nach der ersten RT-PCR auf dem Agarose-Gel zu detektieren. Der Nachweis nur geringer Transkript-Mengen scheint also nicht protokollbedingt zu sein (Abb. 4). Nach Transfer des Gels auf eine Membran und anschließender Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde, konnte das Transkript für den hicp75TNFR aber in stimulierten THP-1 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4A). Folgerichtig zeigte sich eine Bande für hicp75TNFR nach der *nested* PCR dann bereits auf dem Agarose-Gel (Abb. 4B).

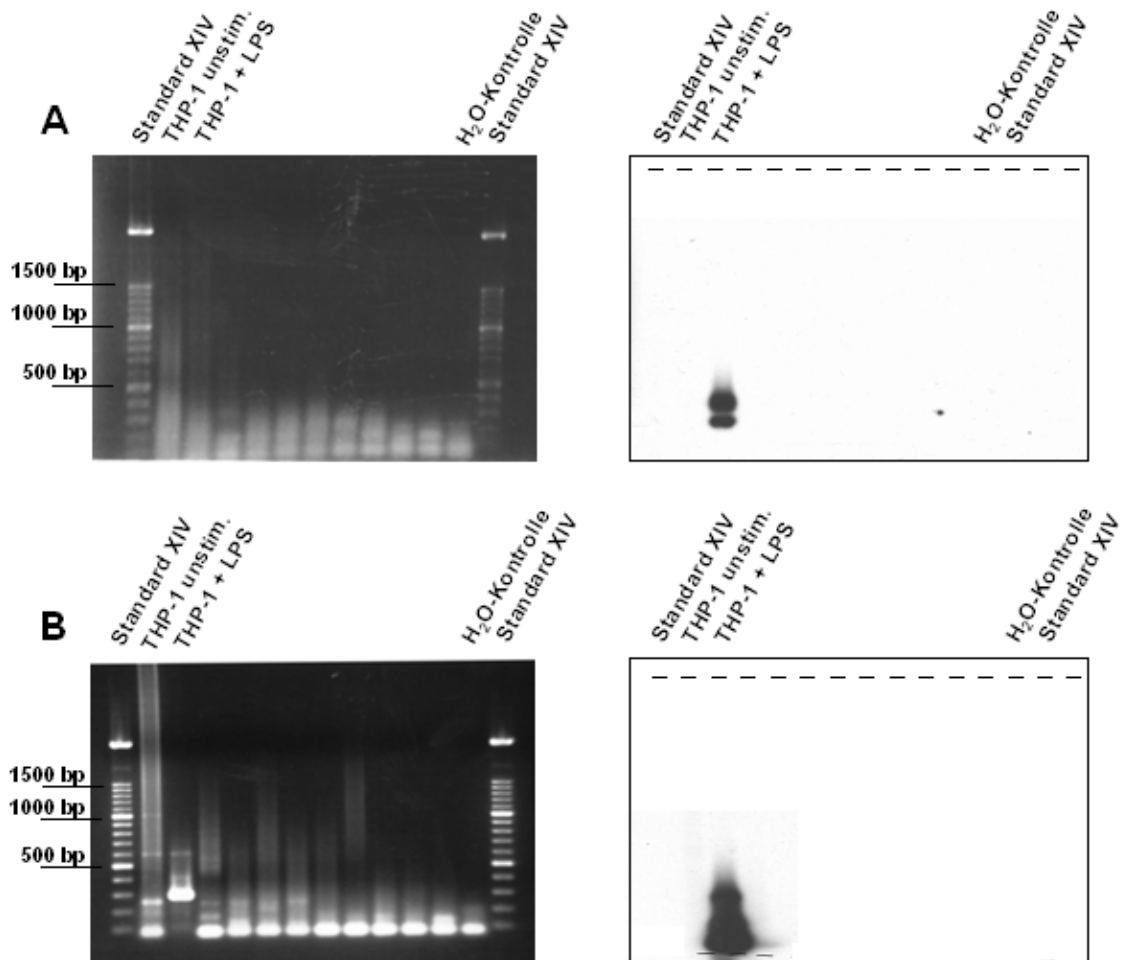


Abb. 4: Nachweis des hicp75TNFR in THP-1 Zellen. Agarose-Gel und Southern-Blot aus der ersten RT-PCR-Runde (A) und aus der *nested* PCR (B). Obwohl das Umschreiben in cDNA mit spezifischen Primern erfolgte und aus der Gesamt-RNA noch speziell die mRNA aufgereinigt wurde, zeigt sich im Agarose-Gel keine Bande für hicp75TNFR nach der ersten RT-PCR (erwartete Fragmentgröße: 361 bp). Der Nachweis ist aber nach spezifischer Hybridisierung positiv. Das Fragment der *nested* PCR ist auf Grund der weiter innen liegenden Primer etwas kleiner (300 bp) und bereits im Gel deutlich erkennbar.

Die Stimulation der THP-1 Zellen erfolgte mit einer LPS-Konzentration von 10 µg/ml für 12 Stunden unter den für diese Zelllinie üblichen Zellkultur-Bedingungen.

Nach diesem Protokoll gelang es weiterhin hicp75TNFR in Kym1-Zellen, einer Rhabdomyosarkom-Zelllinie, die für ihre hohe Expression von mp75TNFR bekannt ist, nachzuweisen. Durch die geringe Expression der hicp75TNFR-mRNA, die sich an der Nachweisgrenze der PCR-/Southern-Methodik bewegt, war es aber sehr schwer, stabil reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

1.2. Nachweis des hicp75TNFR mittels *Ribonuclease Protection Assay* (RPA)

Um auszuschließen, dass der Nachweis sehr geringer Transkriptmengen nicht durch die PCR-Methodik (Lage der Primer, PCR-Programm) bzw. den damit verbundenen Schritten bei der Aufarbeitung der RNA verursacht ist, sollte versucht werden, den hicp75TNFR noch zusätzlich durch ein anderes Nachweisverfahren zu detektieren. Nachdem das Umschreiben in cDNA durch in der RNA enthaltene Sekundärstrukturen immer ein kritischer Schritt ist, schien der Ansatz eines *Ribonuclease Protection Assays* (RPA), bei dem die entsprechende RNA direkt nachgewiesen wird, als weitere Vorgehensweise geeignet, auch wenn die Sensitivität einer PCR mit den darin enthaltenen Amplifikationsschritten, normalerweise von einem RPA nicht erreicht werden kann (Wang, 1999). Zudem beinhaltet der RPA nicht nur die Möglichkeit eines mRNA-Nachweises; über einen Intensitätsvergleich der entsprechenden Banden auf dem resultierenden Autoradiogramm kann zusätzlich eine Quantifizierung vorgenommen werden, solange die verwendete Sonde in molarem Überschuss zur Ziel-RNA eingesetzt wird.

Wie schon bei den Primern in der PCR, ist auch beim RPA die Lage der Sonde, welche radioaktiv markiert und komplementär zur Ziel-RNA ist, entscheidend, um spezifisch den hicp75TNFR nachweisen zu können und eine Kreuzreaktivität des Assays mit dem hp75TNFR auszuschließen. Darüber hinaus ist beim Design der Sonden zu beachten, dass sie nicht zu lange gewählt werden sollten, da sonst eine Auftrennung der Fragmente im Polyacrylamid-Gel nicht mehr gewährleistet werden kann. Des weiteren gilt, dass längere Sonden mehr radioaktiv markierte Nukleotide inkorporieren und den *Ribonuclease Protection Assay* deshalb sensitiver machen. Aus diesem Grund wurden für den Nachweis des hicp75TNFR parallel zwei Sonden entworfen, aus denen ein geschütztes Fragment von 70 bp respektive 224 bp resultiert (Abb. 5).

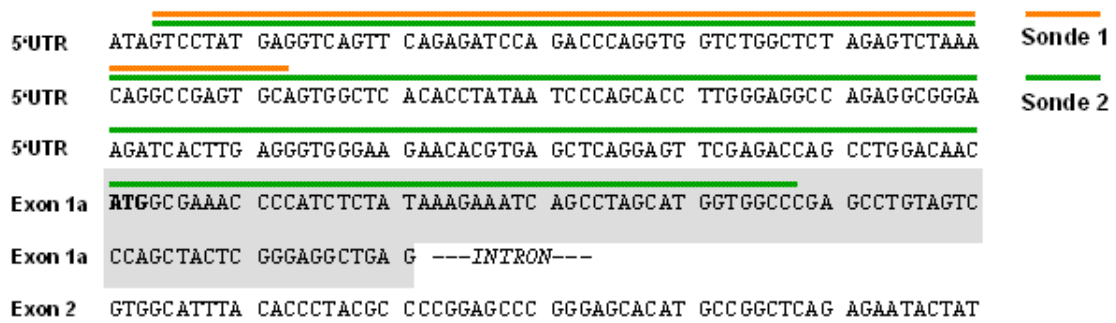


Abb. 5: Lage der beiden Sonden für den *Ribonuclease Protection Assay*. Die kürzere Sonde 1 schützt ein Fragment von 70 bp, die längere Sonde 2 ein Fragment von 224 bp. In beiden Fällen hybridisieren die Sonden ausschließlich mit der mRNA-Sequenz des alternativen Exon 1a bzw. der 5'UTR, und sind damit spezifisch für den humanen icp75TNFR.

Entscheidend beim RPA ist die Verwendung der radioaktiv markierten Sonde in voller Länge, da sonst über die Bestimmung der Fragmentgröße keine Aussage über die Identität des geschützten Fragmentes getroffen werden kann. Deshalb müssen die Sonden vor Hybridisierung mit der RNA zunächst über ein Polyacrylamid-Gel gereinigt werden (Abb. 6A). Nach Hybridisieren von RNA und Sonde, Verdau der nicht doppelsträngigen RNA mit einzelstrangspezifischen RNasen, Auftrennung der Fragmente über ein weiteres Polyacrylamid-Gel und Auflegen eines Röntgenfilms, sollte man die entsprechenden Banden im Autoradiogramm detektieren können. Um einen Anhaltspunkt für die Größe der Fragmente zu erhalten, wurde neben den aus Ziel-RNA und Sonde hybridisierten Fragmenten auch die reinen Sonden auf dem Gel mitgeführt.

Da im Falle des Nachweises für den hicp75TNFR das geschützte Fragment nur um einige wenige Basenpaare im Vergleich zur reinen Sonde verkürzt ist, müssten beide Banden im Gel auf gleicher Höhe laufen. Anders bei der Positivkontrolle β -Actin: hier weist die Sonde eine Länge von 304 bp auf, das resultierende Fragment besitzt aber nur noch eine Länge von 245 bp. Diese Diskrepanz muss im Gel deutlich erkennbar sein.

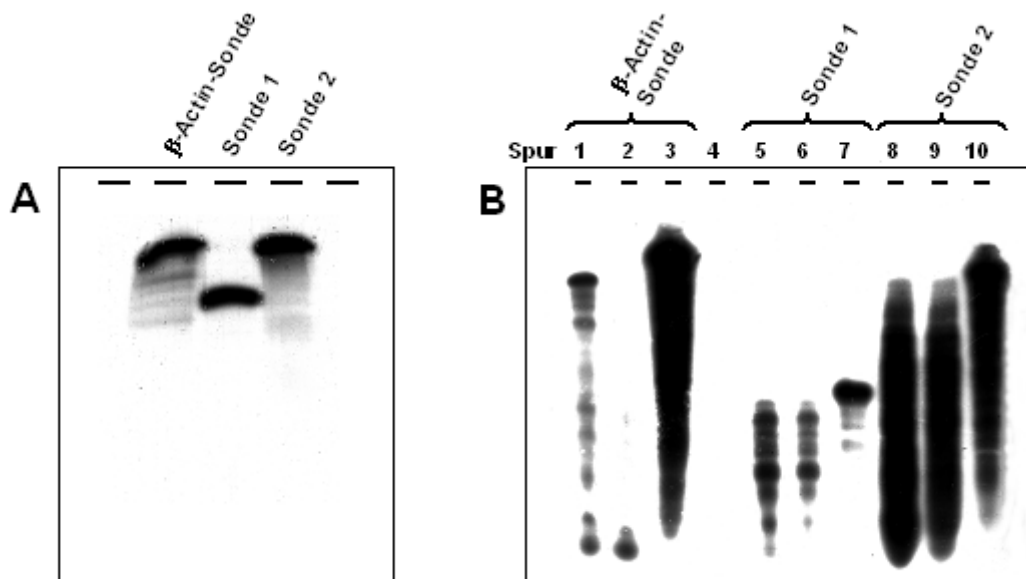


Abb. 6: RPA mit RNA aus stimulierten THP-1 Zellen. Die Sonden wurden vor Einsatz in den RPA über ein denaturierendes PAA-Gel aufgetrennt und aufgereinigt (A). Das Autoradiogramm der hybridisierten Fragmente (B) zeigt für β -Actin ein geschütztes Fragment (Spur 1), das deutlich kleiner ist als die reine Sonde (Spur 3). In der Spur der minus-mRNA-Kontrolle dagegen (Spur 2) ist praktisch kein Signal erkennbar, die einzelsträngige Sonde wurde komplett durch die RNasen verdaut. Im Falle des hicp75TNFR müsste aus der Hybridisierung von mRNA und Sonde jeweils ein Fragment resultieren (Spur 5 und 8), das im Gel genau auf gleicher Höhe zur reinen Sonde (Spur 7 und 10) läuft. Dies ist aber für beide Sonden deutlich nicht der Fall. In Spur 6 und 9 ist wieder die minus-RNA-Kontrolle aufgetragen. Dass hier, anders als bei der minus-RNA-Kontrolle in Spur 2, ein Signal erkennbar ist, liegt vermutlich an der Verwendung zu geringer Mengen an RNasen.

Mit Hilfe der Positivkontrolle β -Actin wird deutlich, dass der RPA methodisch erfolgreich durchgeführt werden konnte, zu erkennen an der Bande für die reine Sonde (Abb. 6, Spur 3) und dem resultierenden, um 59 bp verkürzten geschützten Fragment (Abb. 6, Spur 1). Im Falle des hicp75TNFR ist aber bei keiner der beiden Sonden die entsprechende Bande, die hier auf gleicher Höhe zur Sonde laufen müsste, zu erkennen (Abb. 6, Spur 5 und 8). Der RPA scheint also für den Nachweis des hicp75TNFR zu wenig sensitiv zu sein. Demnach ist eine Amplifikation der mRNA, wie sie durch eine Polymerase-Kettenreaktion erfolgt, wohl unabdingbar.

1.3. Nachweis und Quantifizierung des hicp75TNFR mittels *Real Time* RT-PCR

Nachdem mit der herkömmlichen RT-PCR/Southern-Methodik der humane icp75TNFR in THP-1 Zellen erst nach vorheriger Stimulierung der Zellen mit LPS nachgewiesen werden konnte (Abb. 4), ein Hinweis auf die Regulation des Gens, und die Assays für eine quantitative *Real Time* RT-PCR unabhängig von der bisher verwendeten RT-PCR neu etabliert werden können und müssen, sollte schließlich versucht werden, eine Quantifizierung des humanen icp75TNFR auf mRNA-Ebene vorzunehmen. Um eine möglichst hohe Spezifität der Methode zu gewährleisten, sollte der Nachweis nicht über den Einbau von SYBR-Green, sondern über die Verwendung sogenannter TaqMan-Sonden erfolgen, welche zusätzlich zu den in der PCR verwendeten Primern spezifisch an die Sequenz des nachzuweisenden Transkriptes hybridisieren müssen.

1.3.1. Auswahl von Primern und Sonde für die quantitative *Real Time* PCR

Wie schon bei den beiden vorherigen Nachweisverfahren, so entscheidet auch in diesem Fall die Lage von Primern und Sonde entscheidend über den Erfolg der Methodik mit. Nähere Sequenzanalysen zum alternativen Exon 1a des humanen icp75TNFR hatten in der Zwischenzeit gezeigt, dass dieses Exon aus einem sogenannten Alu-Element hervorgegangen ist, welches im Laufe der Evolution über schrittweise Mutationen exonisiert wurde (Singer, 2004). Da Alu-Sequenzen als die am häufigst vorkommenden repetitiven DNA-Einheiten gelten und mit bis zu einer Million Kopien wenigstens 20 % des menschlichen Genoms ausmachen (Mighell, 1997), war es für die Etablierung der quantitativen *Real Time* PCR nicht nur wichtig, eine Diskriminierung der beiden p75TNFR-Isoformen zu erreichen, sondern durch eine ausreichende Spezifität des Assays auch eine Unterscheidung von Alu-Element und Exon 1a Sequenz zu gewährleisten.

Durch einen Vergleich der beiden Sequenzen ((Singer, 2004) und (Abb. 7)) wird zum einen deutlich, wie über die Jahrmillionen die Exonisierung dieses zur AluJo-Familie gehörenden Elementes vor sich ging, zum anderen werden so mögliche Sequenzunterschiede deutlich, die für das Design eines spezifischen Assays genutzt werden können. Im Falle des hicp75TNFR sollte nun möglichst sowohl ein Exongrenzen-überspannender und damit cDNA spezifischer, als auch ein vom Alu-Element diskriminierender Assay gewählt werden. Da aber bei der Verwendung einer TaqMan-

Exon 1a
Alu Jo

5' Primer

Sonde

Exon 1a

Alu Jo

Sonde

3' Primer

Exon 2

Alu Jo

Exon 1a
Alu Jo

5'-ATGGCGAAA CCCCATCTCT ATAAAGAA-----ATCAG CCTAGCATGG TGGCC**CGAGC**

-ATAGCGAGA CCCCGTCTCT ACAAAAAATA CAAAAATTAG CCGGGCGTGG TGGCGCGCGC

Primer **Sonde**

Exon 1a
Alu Jo

CTGTAGTCCC AGCTACTCGG GAGG**CTGAG**---**GTGGGAGG**-----

CTGTAGTCCC AGCTACTCGG GAGGCTGAG---**GCAGGAGG**-----

Sonde **3' Primer**

Exon 2
Alu Jo

GTGGCATTTACAACCCTACGC CCCGGAGCCC GGGAGC**ACAT GCCGGCTCAG**AGAATACTAT

70

1.3.2. Nachweis des humanen icp75TNFR mit den spezifischen TaqMan-Assays

Anhand der RNA einer mit hicp75TNFR-cDNA transfizierten Zelllinie konnte gezeigt werden, dass beide Assays zuverlässig das entsprechende Transkript detektieren, ohne dabei gleichzeitig hp75TNFR nachzuweisen. Allerdings wurde sehr schnell deutlich, dass gerade beim Nachweis so gering exprimierter mRNAs wie der des hicp75TNFR, nicht-cDNA-spezifische Assays, wie der hier als Assay 1 bezeichnete, die Gefahr bergen, einen positiven Nachweis auf RNA zurückzuführen, obwohl er von genomischer DNA verursacht ist. Da die DNase Behandlung während der RNA-Isolierung oft nicht vollständig abläuft bzw. RNAs aus Primärzellen, welche nicht unbegrenzt zur Verfügung stehen, oft nicht zusätzlichen Verdauungsschritten ausgesetzt werden können, bewegt man sich bei der (noch) enthaltenen genomischen DNA genau an der Nachweisgrenze der *Real Time* PCR Methodik, wo aber auch die mRNA für hicp75TNFR zu erwarten ist. Daher wurden die Untersuchungen verschiedener Zelllinien und Primärzellen in der Folge dieser Erkenntnis praktisch ausschließlich mit dem cDNA-spezifischen Assay 2 durchgeführt.

Zelllinie / Primärzellen	Behandlung	Nachweis
THP-1	+/- LPS-Stimulierung (3h, 6h, 9h, 12h)	negativ
Primäre Monozyten	+/- LPS (12h) und +/- TNF (12h)	negativ
Primäre Makrophagen		negativ
Thymus		negativ
Milz		negativ
Darmbiopsien (von gesunden und Morbus Crohn Patienten)		negativ
HT29	+/- LPS (4h und 10h)	negativ
CaCo2		negativ
HepG2		negativ

Tab. 1: Nachweis des hicp75TNFR in verschiedenen Zelllinien und Primärzellen. In keiner der untersuchten Proben konnte die entsprechende mRNA nachgewiesen werden. Der Nachweis für das mituntersuchte Referenzgen 18S rRNA war jeweils positiv und damit die Qualität der RNA-Präparation in Ordnung. Die Stimulierung mit LPS erfolgte jeweils mit einer Konzentration von 10 µg/ml für den angegebenen Zeitraum. Für die Stimulierung mit rekombinantem humanen TNF wurde eine Konzentration von 10 ng/ml verwendet.

Trotz eines spezifischen Assays, der weder hp75TNFR noch Alu-Sequenzen detektiert, gelang es nicht, den humanen icp75TNFR in den unterschiedlichsten Präparationen nachzuweisen (Tab. 1). Auch ein Erhöhen der cDNA-Menge von den üblichen 50 ng pro PCR-Reaktion auf 250 ng führte zu keinem positiven Nachweis.

1.4. Funktioneller *knock down* des humanen icp75TNFR durch RNA-Interferenz

Zusätzlich zur Quantifizierung sollte parallel versucht werden, über ein spezifisches Ausschalten des hicp75TNFR weitere Einsicht in die Bedeutung dieser neuen p75TNFR-Isoform zu erlangen. Zu diesem Zweck wurde die Methode der RNA-Interferenz gewählt, mit deren Hilfe man ohne Verwendung der recht aufwändigen *knock-out*-Technologie, die eine homologe Rekombination erfordert, relativ schnell eine Reduktion der Ziel-mRNA um circa 90-95 % erreichen kann. Da durch direkte Transfektion der so genannten *short interfering* RNAs (siRNAs), welche *antisense* zur Ziel-mRNA sind und damit die Degradierung des entsprechenden Transkriptes verursachen, immer nur transiente Effekte erzielt werden können, wurde für den *knock down* des humanen icp75TNFR die 2002 publizierte (Brummelkamp, 2002), Vektor-gestützte RNAi-Methode gewählt. Hier werden über ein spezielles, von den Erfindern als pSUPER (SUPpression of Endogenous RNA) bezeichnetes Plasmid, welches stabil in die gewünschten Zielzellen transfiziert werden kann, direkt in der jeweiligen Zelle die entsprechenden siRNAs generiert. Da sich diese durch die spezielle Anordnung aus *sense*-Sequenz, Platzhalter-Sequenz und *antisense*-Sequenz in Form einer Schlaufe (*loop*) falten, werden sie auch als *short hairpin* RNA (shRNA) bezeichnet.

1.4.1. Auswahl der für hicp75TNFR spezifischen shRNA und Klonierung des RNAi-vermittelnden Vektors

Bereits Studien mit direkt transfizierten siRNAs hatten gezeigt, dass nicht jede ausgewählte Sequenz in der Lage ist, eine Degradierung der Ziel-mRNA herbeizuführen. Da im Falle der Vektor-basierten RNA-Interferenz ausgehend vom transfizierten Vektor-Konstrukt die entsprechenden siRNAs erst direkt in der Zelle durch eine RNA-Polymerase synthetisiert werden müssen, kommen weitere Einschränkungen bei der Auswahl der 19 Basen umfassenden, geeigneten Sequenz hinzu. Zu guter Letzt muss auch

hier wieder die deutliche Unterscheidung zwischen Alu-Sequenz und Exon 1a des *hicp75TNFR* erzielt werden. Unter Berücksichtigung dieser Vorgaben, wurde ein geeigneter Sequenz-Abschnitt gewählt, welcher ausschließlich *hicp75TNFR*-mRNA degradieren sollte (Abb. 8) und als Kontrolle ein weiterer, in Exon 3 gelegener, welcher für beide Isoformen gleichermaßen passend ist.

		icp75TNFR spez. shRNA					
Exon 1a	-ATGGCGAAA	CCCCATCTCT	ATAA	AGAA--	-----ATCAG	CCTAGCATGG	TGGCCCGAGC
Alu Jo	-ATAGCGAGA	CCCCGTCTCT	ACAAAAATA	CAAAAATTAG	CCGGGCGTGG	TGGCGCGCGC	
Exon 1a	CTGTAGTCCC	AGCTACTCGG	GAGGCTGAG-	--GTGGGAGG	-----		
Alu Jo	CTGTAGTCCC	AGCTACTCGG	GAGGCTGAG-	--GCAGGAGG	-----		
Exon 2	GTGGCATTTA	CACCCTACGC	CCCGGAGCCC	GGGAGCACAT	GCCGGCTCAG	AGAATACTAT	
Alu Jo	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

Abb. 8: Lage der für *hicp75TNFR* spezifischen shRNA. Da die aus der 19 bp umfassenden Sequenz entstehenden shRNAs unter Umständen ein oder zwei nicht passende Basen tolerieren, musste für ausreichende Spezifität eine Sequenz gewählt werden, die einen deutlichen Unterschied zum Alu-Element gewährleistet. Daher wurde die Region um die 7 bp-Deletion gewählt.

Die ausgewählte 19 bp-Sequenz in *sense* Orientierung wird dann zusammen mit der Sequenz, welche später die Schlaufe bildet und der 19 bp-Sequenz in *antisense* Orientierung als Oligonukleotid synthetisiert und mit dem passenden Gegenstrang hybridisiert. Dadurch entstehen an beiden Enden des resultierenden Doppelstranges Überhänge, die 5' eine Bgl II und 3' eine Hind III Schnittstelle bilden und so eine Klonierung in den entsprechend verdauten pSUPER-Vektor ermöglichen. Nachteil des Original-Plasmides von Brummelkamp et al. ist aber eine fehlende Antibiotika-Resistenz zur Selektion transfizierter Zellen. Deshalb wurde die *Multiple Cloning Site* (MCS) des Vektors und die Region, die den H1-RNA Promotor enthält, über Restriktionsenzym-Schnittstellen in einen pcDNA3 Vektor umklontiert (Abb. 9). Somit konnte nach Transfektion dieses neuen Plasmides mit Neomycin auf positive Klone selektioniert werden.

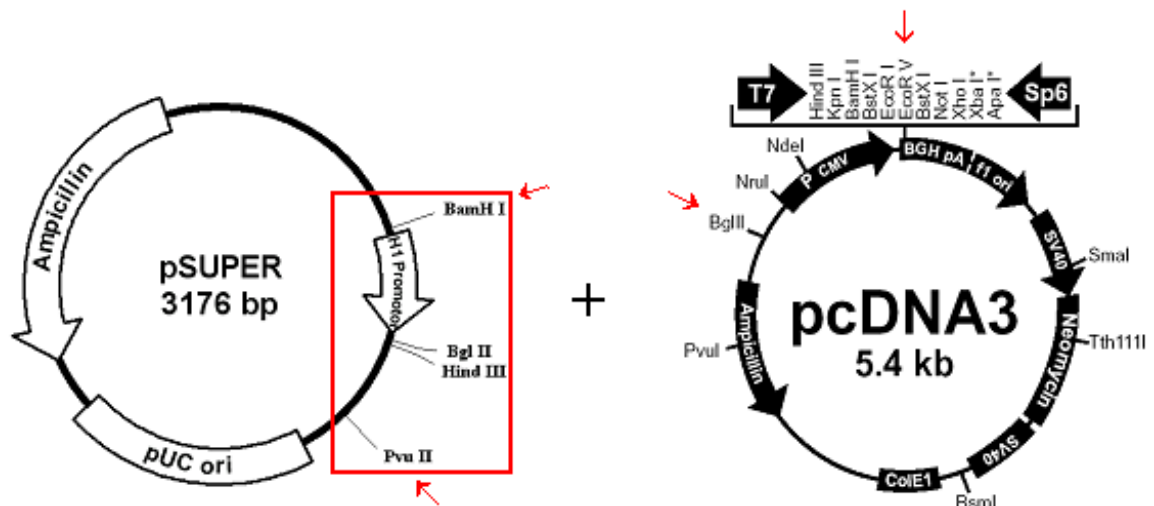


Abb. 9: Klonierung des neuen pSUPER-Vektors. Über Pvu II und EcoR V (beides *blunt* Schnittstellen) sowie BamH I und dazu passend Bgl II konnte der Teil des pSUPER-Vektors, der die *Multiple Cloning Site* (MCS) und den H1-RNA-Promotor enthält, in pcDNA3 eingesetzt werden. Durch diese Umklonierung wurde die ursprüngliche Bgl II Schnittstelle in pcDNA3 zerstört und die Hind III Schnittstelle entfernt. Somit kann Bgl II und Hind III aus der MCS des pSUPER-Vektors nach wie vor zur Klonierung der shRNA-generierenden Oligonukleotide verwendet werden.

Auf diese Weise entstanden die folgenden drei Vektorkonstrukte: pSUPERneu_{hicp75TNFR}, spezifisch für den hicp75TNFR, pSUPERneu_{hp75TNFR}, der beide Isoformen gleichermaßen degradieren können sollte und pSUPERneu_{Kontrolle}, mit einem irrelevanten Oligonukleotid.

1.4.2. Einsatz der hicp- und p75TNFR spezifischen shRNAs in der Quantitativen *Real Time* RT-PCR

Um zu testen, ob die ausgewählten Oligonukleotide in der Lage sind, die Ziel-mRNA zu degradieren, wurden Zellen, die für hicp75TNFR-cDNA positiv sind, zusätzlich mit jeweils einem der drei klonierten Vektoren stabil transfiziert. Nach Isolierung der RNA aus der jeweils entstandenen Zelllinie und Umschreiben in cDNA, wurde eine Quantitative *Real Time* PCR mit dem in Abb. 6 gezeigten Assay 2 durchgeführt. Die beiden Vektoren pSUPERneu_{hicp75TNFR} und pSUPERneu_{hp75TNFR} sollten nach Transfektion in der Lage sein, die mRNA für hicp75TNFR zu degradieren oder zumindest das Niveau an mRNA gegenüber dem der pSUPERneu_{Kontrolle}-transfizierten Zellen abzusenken.

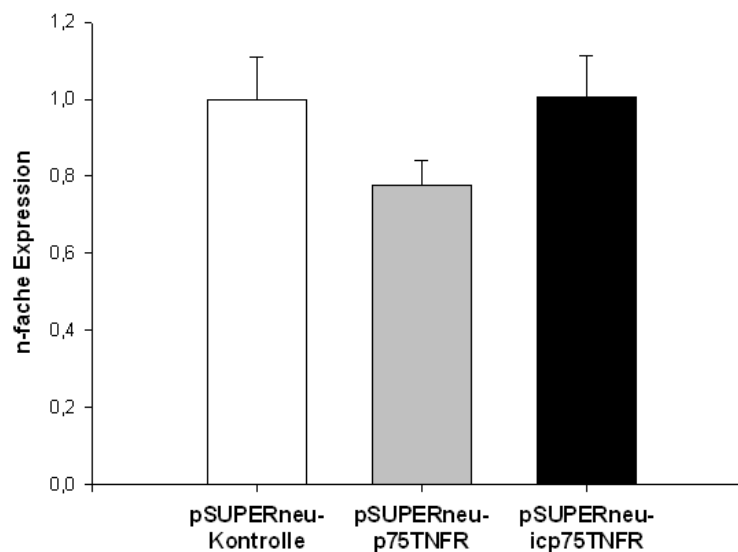


Abb. 10: Quantitative Real Time PCR mit den pSUPERneu-Vektor-transfizierten Zellen. Der pSUPERneu_{hicp75TNFR} bzw. die daraus entstehende shRNA ist offenbar nicht in der Lage, die mRNA für hicp75TNFR zu degradieren. Der pSUPERneu_{hp75TNFR} scheint zumindest zu einer geringfügigen Reduktion des RNA-Niveaus zu führen. Alle PCR-Reaktionen wurden in Triplikaten pipettiert und daraus die Standardabweichung berechnet. Die relative Expression der hicp75TNFR mRNA wurde über die $\Delta\Delta C_t$ -Methode ermittelt.

Mit beiden Vektor-Konstrukten konnte keine eindeutige Degradierung der hicp75TNFR-mRNA erzielt werden (Abb. 10). Allerdings scheint zumindest die nicht für den hicp75TNFR spezifische shRNA (pSUPERneu_{hp75TNFR}) eine gewisse Reduktion der Transkriptmenge zu verursachen.

1.4.3. Einsatz der hicp- und p75TNFR-spezifischen shRNAs in der Durchflusszytometrie

Nachdem es Berichte gibt, denen zu Folge zwar die mRNA Menge nach erfolgter RNA-Interferenz unbeeinflusst bleibt, es aber trotzdem zu einer Herunterregulierung des Proteinniveaus kommt (Hannon, 2004), wurde zusätzlich zur RT-PCR eine durchflusszytometrische Analyse der mit den Vektorkonstrukten transfizierten Zellen durchgeführt. Da gezeigt werden konnte, dass der hicp75TNFR in transduzierten Zellen zu einem nicht unerheblichen Teil auch auf die Zellmembran gebracht wird (Scherübl, 2005), sollte es möglich sein, durch eine Oberflächenfärbung des hicp75TNFR, eine Abnahme in der Proteinmenge zu detektieren.

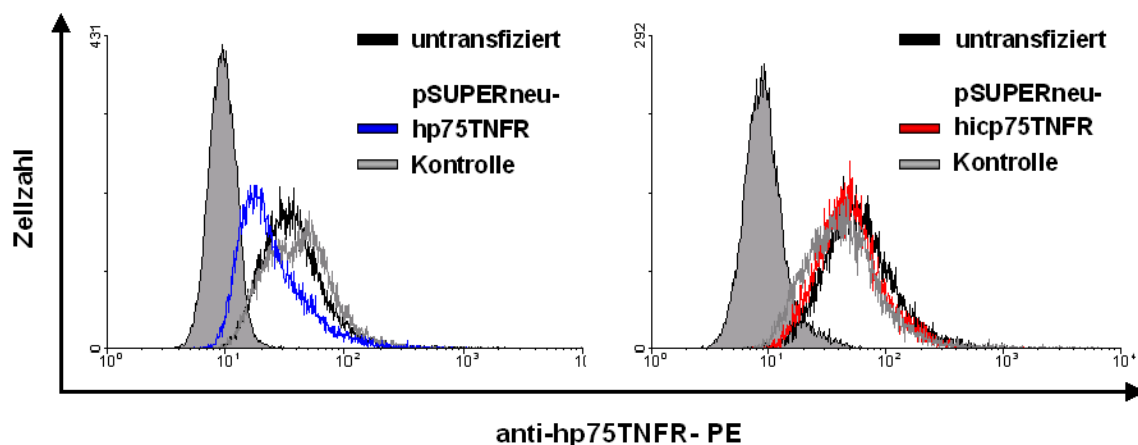


Abb. 11: Durchflusszytometrische Untersuchung der mit den pSUPERneu-Vektoren transfizierten Zellen. L929-Zellen, die zunächst stabil mit hicp75TNFR-cDNA transfiziert wurden, erhielten in einem zweiten Schritt die entsprechenden pSUPERneu-Konstrukte. Um sicher zu stellen, dass nicht die Transfektion der Vektoren alleine schon zu einer Abnahme der Proteinmenge führt, wurden untransfizierte Zellen mit untersucht. Der graue, gefüllte Peak links im Histogramm stellt jeweils die Autofluoreszenz von L929-Zellen dar.

Allein der pSUPERneu-Vektor mit dem in Exon 3 gelegenen und damit für hicp75TNFR nicht spezifischen Oligonukleotid, reduziert die Proteinmenge an hicpTNFR zu einem gewissen Grad (Abb. 11, blaue Kurve). Das spezifische Oligonukleotid (Abb. 11, rote Kurve) vermag dagegen keine Reduktion herbei zu führen. Damit bestätigten sich die Ergebnisse aus der *Real Time* RT-PCR.

Da ohnehin eine Quantifizierung der nativen hicp75TNFR-mRNA nicht gelungen war und für die Auswahl eines neuen spezifischen Oligonukleotides kaum Alternativen bleiben, wurde der Ansatz des funktionellen *knock downs* von hicp75TNFR nicht weiter verfolgt.

Parallel zur Isoform des p75TNFR im humanen System war damals auch in der Maus eine ähnliche Variante entdeckt und kloniert worden. Gerade das Vorkommen einer solchen Isoform in zwei verschiedenen Spezies schien ein Hinweis auf ihre biologische Relevanz zu sein. Da sich die Untersuchungen im Humansystem nicht zuletzt wegen der Alu-Problematik sehr schwierig gestalteten, sollte versucht werden, mit dem vermeintlichen Schritt zurück in die Maus, Näheres über die neue Isoform heraus zu finden.

2. Nachweis, Quantifizierung und Charakterisierung des icp75TNFR in der Maus

Anders als im humanen System, ist die Isoform des p75TNFR in der Maus nicht über Insertion eines repetitiven DNA-Elementes in den Genloкус entstanden. Im Falle des Maus-icp75TNFR (micp75TNFR) wird, wieder ausgehend vom weiter 5' gelegenen, alternativen Transkriptionsstart II, eine untranslatierte Sequenz direkt an Exon 2 des p75TNFR gespleisst. Zum Start der Proteinbiosynthese kann ein ATG in Exon 2 genutzt werden, welches sich im richtigen Leseraster befindet. Damit ist das resultierende Protein gegenüber dem des mp75TNFR um 26 Aminosäuren verkürzt (Abb. 12).

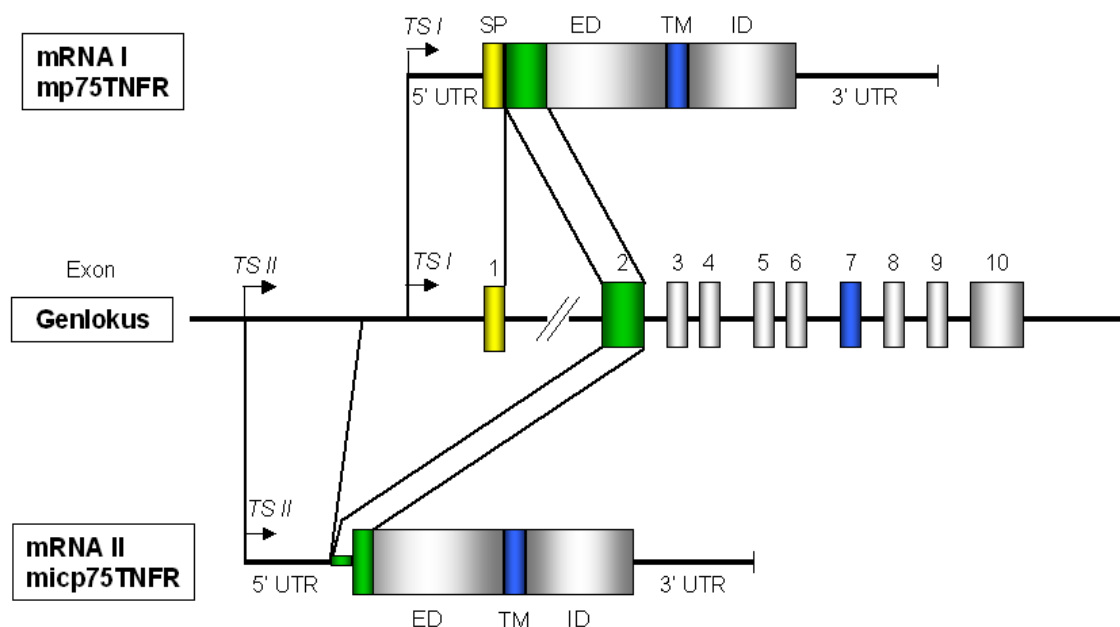


Abb. 12: Genloкус und Entstehung der mRNA beider p75TNFR-Isoformen. Anstelle von Exon 1 des mp75TNFR (gelb), welches auch im Maus-System für ein Signalpeptid kodiert, wird im Falle des micp75TNFR ausgehend von Transkriptionsstart II eine Sequenz an Exon 2 gespleisst, die zu keinem Teil in Protein translatiert wird. Der Start der Proteinbiosynthese geht von einem ATG aus, welches innerhalb des Exon 2 liegt. Damit kann der micp75TNFR auf Proteinebene nicht vom mp75TNFR unterschieden werden.

TS: Transkriptionsstart; SP: Signalpeptid; ED: Extrazellulärdomäne; TM: Transmembran-domäne; ID: Intrazellulärdomäne; UTR: Untranslatierte Region

2.1. Nachweis des micp75TNFR mittels RT-PCR und anschließender Southern Hybridisierung

Um einen spezifischen RT-PCR-Nachweis für den icp75TNFR in der Maus zu etablieren, muss auch hier wieder auf die Lage von Primern und Sonde für die Southern Hybridisierung geachtet werden. Zumindest der 5' Primer muss in die 5' untranslatierte Region gelegt werden, da der übrige Teil der mRNA mit der des mp75TNFR identisch ist (Abb. 13).

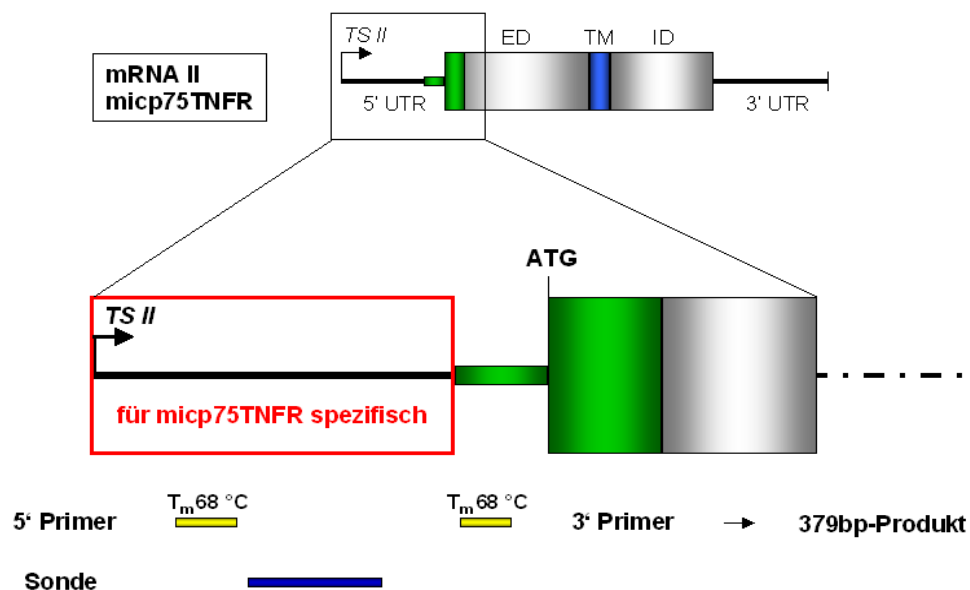


Abb. 13: Lage von Primern und Sonde für die micp75TNFR-RT-PCR. T_m bezeichnet die Schmelztemperatur der Primer.

Mit Hilfe der gezeigten Primer und der Sonde wurden verschiedene Tumorzelllinien und Primärzellen unter unterschiedlichen Stimulierungsbedingungen auf Expression des micp75TNFR untersucht.

2.1.1. Nachweis des micp75TNFR in Tumorzelllinien

Wie schon im Humansystem, galt das Interesse auch beim micp75TNFR zunächst monozytären Zelllinien (RAW 264.7 und PU5-1.8), da sie sowohl Träger des mp75TNFR als auch Produzenten des Liganden TNF (Maus-TNF; mTNF) sind. Darüber hinaus wurden L929-Zellen, eine Fibrosarkom-Zelllinie, und bEND3, eine Endothel-Zelllinie, in die Untersuchungen mit einbezogen. Auf diese Weise gelang ein Nachweis sowohl in

RAW 264.7- sowie in PU5-1.8-Zellen, in letzteren aber wieder nur im *Southern Blot* und nach längerem Auflegen des Röntgenfilms auf die Membran (Abb. 14).

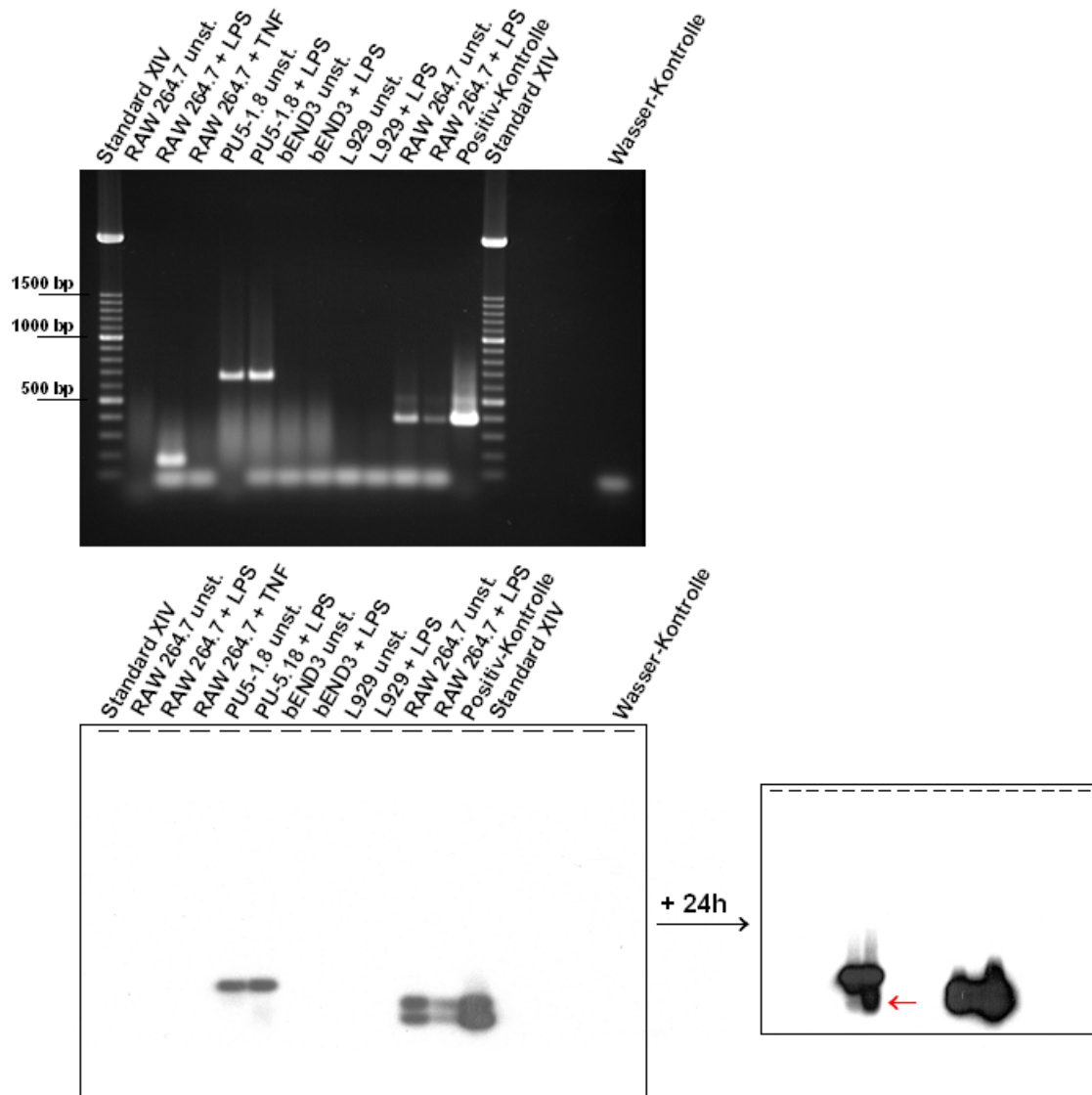


Abb. 14: Nachweis des micp75TNFR in Tumorzelllinien mittels RT-PCR und Southern Hybridisierung. Das Gel enthält zwei unabhängig voneinander generierte RNA-Präparationen von RAW-Zellen. Dabei ist zu erkennen, dass eine der beiden (rechts) deutlich positiv für micp75TNFR-mRNA ist, während in der zweiten weder im Gel noch im Southern-Blot das entsprechende Transkript nachgewiesen werden konnte. In PU5-1.8 konnte zunächst nur eine wesentlich zu große Bande detektiert werden (ca. 700 bp), nach längerem Auflegen des Röntgenfilms auf die *Southern-Blot*-Membran konnte dann aber zusätzlich auch die Bande auf richtiger Höhe detektiert werden, die mit einem roten Pfeil gekennzeichnet wurde.

Bei weiteren Untersuchungen bestätigte sich der Nachweis in RAW 264.7-Zellen, allerdings meist in wesentlich geringerer Menge als im gezeigten Agarose-Gel und damit

ebenfalls ausschließlich durch Southern-Hybridisierung detektierbar. Der Nachweis in PU5-1.8-Zellen gelang abhängig von der jeweiligen RNA-Präparation nur unzuverlässig. Durch Ausschneiden und Klonieren der im Agarose-Gel sichtbaren und mit der Southern-Sonde spezifisch hybridisierenden Bande von ca. 700 bp, konnte die Sequenz dieses PCR-Produktes ermittelt werden. Es handelt sich um eine noch nicht vollständig prozessierte mRNA und damit wohl um eine Kernverunreinigung, bei der ausgehend von TS II ein Transkript entstanden ist, bei dem Exon 1 des mp75TNFR noch nicht herausgespleisst worden ist, das ansonsten aber dem Transkript des hicp75TNFR entspricht. Daher auch die spezifische Hybridisierung im Southern-Blot. Diese prä-mRNA kann theoretisch als Vorstufe des micp75TNFR gesehen werden, da durch entsprechendes Spleissen die richtige mRNA noch generiert werden kann. Dies ist aber genauso für den mp75TNFR möglich.

RNA-Präparationen aus L929-Zellen, sowie bEND3-Zellen blieben negativ für den micp75TNFR. Zusätzlich zu den gezeigten Zelllinien wurde des Weiteren P815, eine Mastozytom-Zelllinie, untersucht, in der die mRNA für den micp75TNFR aber ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnte.

2.1.2. Nachweis des micp75TNFR nach Induktion D-Galaktosamin-/LPS-vermittelter Hepatotoxizität

Neben Tumorzelllinien sollte auch ein Nachweis des micp75TNFR für Primärzellen geführt werden. Aufbauend auf der Hypothese, dass der micp75TNFR eventuell mit dem Schutz vor TNF-vermittelter Zytotoxizität in Zusammenhang steht, schien ein *in vivo* TNF-Test als Verfahren geeignet, die Expression des Rezeptors zu stimulieren. Da eine intraperitoneale Gabe von LPS bei Mäusen auch im D-Galactosamin (DGalN)/LPS induzierten Lebertoxizitäts-Test zu überschießenden TNF-, IL-6 und IL-12-Spiegeln führt (Zhou, 2005) und durch die transkriptionshemmende Wirkung des DGalN vor allem stoffwechselintensive Organe wie die Leber von der toxischen TNF-Wirkung betroffen sind, wurden Mäuse mit einer Kombination aus LPS und DGalN behandelt, die Lebern entnommen und daraus RNA isoliert. Als Kontrollen für die RT-PCR dienten nur mit PBS-, LPS-, oder DGalN/PBS behandelte Mäuse. Bei einer biologischen Relevanz des icp75TNFR im Rahmen eines intrazellulären Schutzmechanismus, sollte eine verstärkte Expression dieser mp75TNFR-Isoform unter den gegebenen Bedingungen zu beobachten sein.

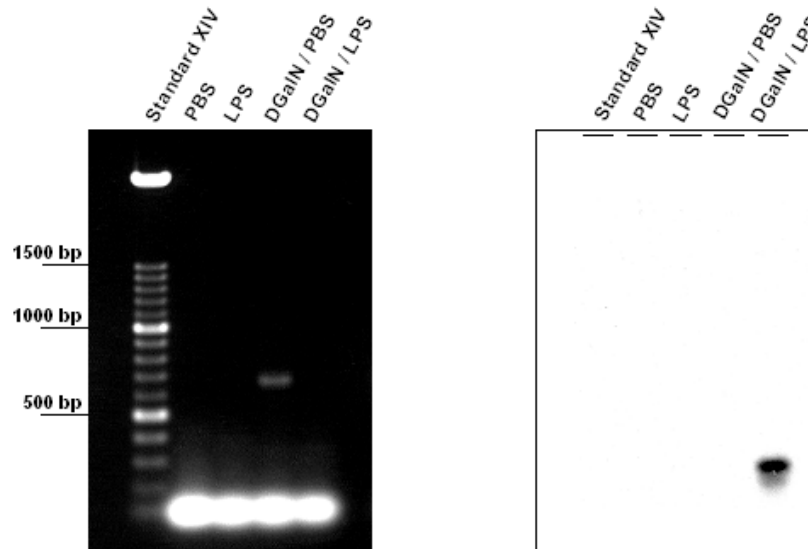


Abb. 15: Nachweis des micp75TNFR nach DGalN-/LPS-vermittelter Hepato-toxizität. C57/Bl6-Mäuse wurden entweder mit den Einzelsubstanzen oder einer Kombination daraus behandelt (i.p.-Applikation), die Mäuse über einen Zeitraum von fünf Stunden beobachtet und die Lebern entnommen, als bei der LPS-/DGalN-behandelten Maus sichtbare Zeichen der Leberschädigung zu beobachten waren. Da in diesem Fall keine Positivkontrolle in der RT-PCR mit eingeschlossen war, wurde die Größe der im Southern Blot sichtbaren Bande über ein neben das Agarosegel gelegtes Lineal bestimmt.

Nach kombinierter Gabe von LPS und D-Galaktosamin kann der micp75TNFR in der Leber so behandelter Mäuse im Southern Blot nachgewiesen werden, während die Kontroll-Behandlungen zu keinem positiven Ergebnis führen (Abb. 15). Direkt auf dem Agarose-Gel war das Transkript aber nicht nachweisbar.

2.1.3. Nachweis des micp75TNFR in primären CD8⁺ T-Zellen

In der Literatur wird dem p75TNFR in den letzten Jahren vermehrt eine Rolle in der T-Zell-Kostimulation zugewiesen (Aspalter, 2003, Kim, 2001, Kim, 2004). Um eine potentielle Bedeutung des micp75TNFR in dieser Funktion zu untersuchen, wurden aus Milzen von C57BL/6 Mäusen mittels magnetvermittelter Zellsortierung (MACS) zunächst CD8⁺ T-Zellen gewonnen, für die eine kostimulatorische Rolle des p75TNFR beschrieben wurde (Kim, 2004). Durch Reanalyse der sortierten Zellen in der Durchflusszytometrie konnte eine Anreicherung der CD8⁺ T-Zell-Population auf ca. 80 % detektiert werden (Abb. 16A). Die durchflusszytometrische Analyse nach 48 stündiger Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mittels anti-CD3-/anti-CD28-Antikörpern zeigt die gesteigerte Expression des mp75TNFR auf Protein-Ebene (Abb. 16B).

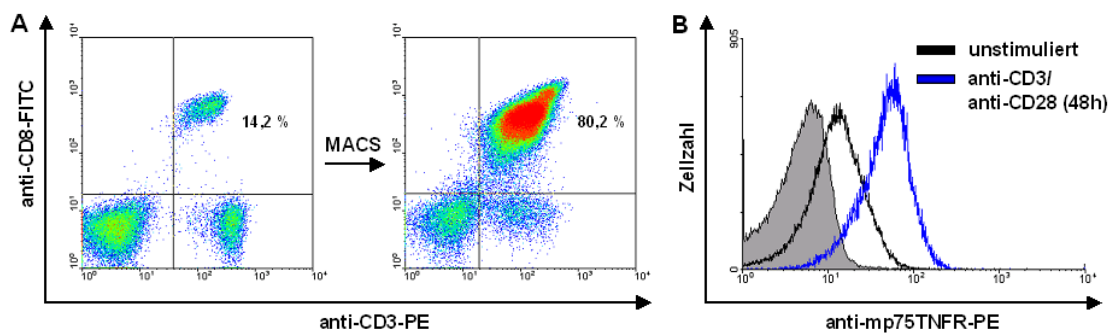


Abb. 16: Reanalyse der sortierten CD8⁺ T-Zellen und Oberflächenexpression des mp75TNFR nach Stimulation. (A) zeigt die Reanalyse der sortierten Zellen in der Durchflusszytometrie im Vergleich zur unsortierten Milz-Präparation. Zusätzlich wurde durchflusszytometrisch die Regulation des mp75TNFR auf Proteinebene untersucht (B), um den Erfolg der durchgeführten Stimulation zu kontrollieren. Diese erfolgte mit 10 µg/ml eines anti-CD3 Ak (*plate bound*) und 10 µg/ml eines löslichen anti-CD28 Ak. Der graue, gefüllte Peak links im Histogramm stammt von CD8⁺ T-Zellen aus einer p75TNFR^{-/-} Maus, die genau wie die Zellen der Wildtyp-Maus behandelt wurden.

Aus einem Teil der so erhaltenen Population wurde dann sofort RNA isoliert, der andere Teil wurde zuvor noch für 48 h mit anti-CD3-/anti-CD28-Antikörpern stimuliert. Da die p75TNFR^{-/-} Maus durch Insertion einer Neomycin-Kassette in Exon 1 generiert worden ist (Erickson, 1994), sollte sie theoretisch in der Lage sein, das Transkript für micp75TNFR zu exprimieren. Deshalb wurden auch Zellen der p75TNFR gendefizienten Mäuse mit untersucht.

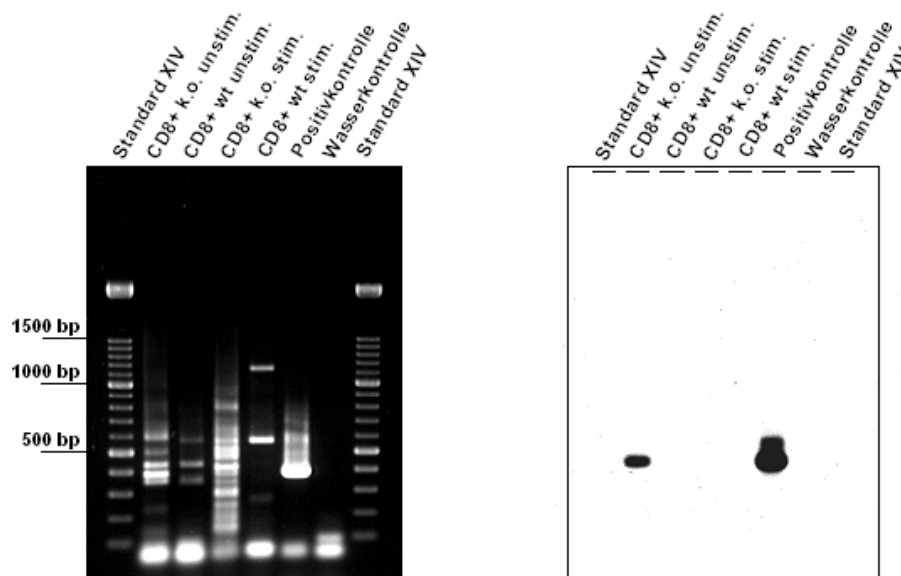


Abb. 17: Nachweis des micp75TNF in primären CD8⁺ T-Zellen. Außer bei den unstimulierten Zellen aus der p75TNFR^{-/-} Maus hybridisiert keine der vielen Banden aus dem Agarose-Gel mit der spezifischen Sonde. Gendefiziente Maus: p75TNFR^{-/-}; Wildtyp-Maus: C57BL/6

CD8⁺ T-Zellen aus nicht gentechnisch veränderten Mäusen (C57BL/6) exprimieren den micp75TNFR auch auf Stimulierung hin nicht (Abb. 17). Ein Nachweis gelang nur in den nicht stimulierten Zellen der p75TNFR *knock out* Maus.

2.2. Nachweis und Quantifizierung des micp75TNFR mittels *Real Time* RT-PCR

Nachdem der micp75TNFR mit normaler RT-PCR und Southern Hybridisierung nachgewiesen werden konnte, sollte auch im Maus-System versucht werden, über eine Quantifizierung der Transkriptmenge näheren Einblick in die Bedeutung der neu entdeckten Isoform zu erlangen.

2.2.1. Auswahl von Primern und Sonde für die Quantitative *Real Time* RT-PCR

Um einen Vergleich mit der Regulation des mp75TNFR anstellen zu können, wurde für beide Isoformen ein Assay für die Quantitative *Real Time* RT-PCR entwickelt. Auch hier wurde wieder mit TaqMan-Sonden an Stelle von SYBR-Green-Einbau gearbeitet, so sollte eine möglichst hohe Spezifität der Assays (Abb. 18) gewährleistet werden.

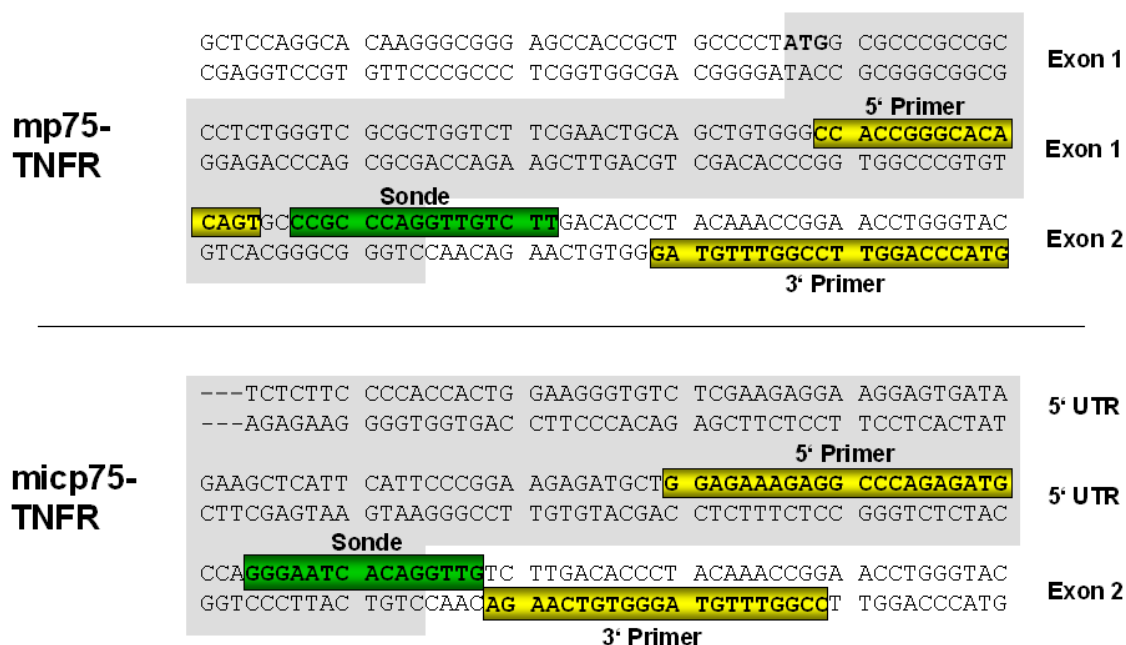


Abb. 18: Lage von Primern und Sonde für die Quantitative *Real Time* RT-PCR. Für beide Isoformen befindet sich der 3' Primer in Exon 2. Wichtig für die Spezifität des micp75TNFR-Assays ist der 5' Primer, der in die 5' untranslatierte Region gelegt werden muss, sowie die Exon-übergreifende Sonde.

2.2.2. Nachweis in Tumorzelllinien

Da der Nachweis von micp75TNFR am stabilsten in RAW 264.7-Zellen gelang, war ein positiver Nachweis mittels *Real Time* RT-PCR hier am vielversprechendsten. Aber auch die anderen, bereits in der herkömmlichen RT-PCR eingesetzten Zelllinien, wurden mit den entwickelten Assays getestet.

Anhand des Nachweises und der Quantifizierung des mp75TNFR (Abb. 19) konnte verfolgt werden, ob eventuell die Expression der beiden mp75TNFR-Isoformen parallel reguliert wird.

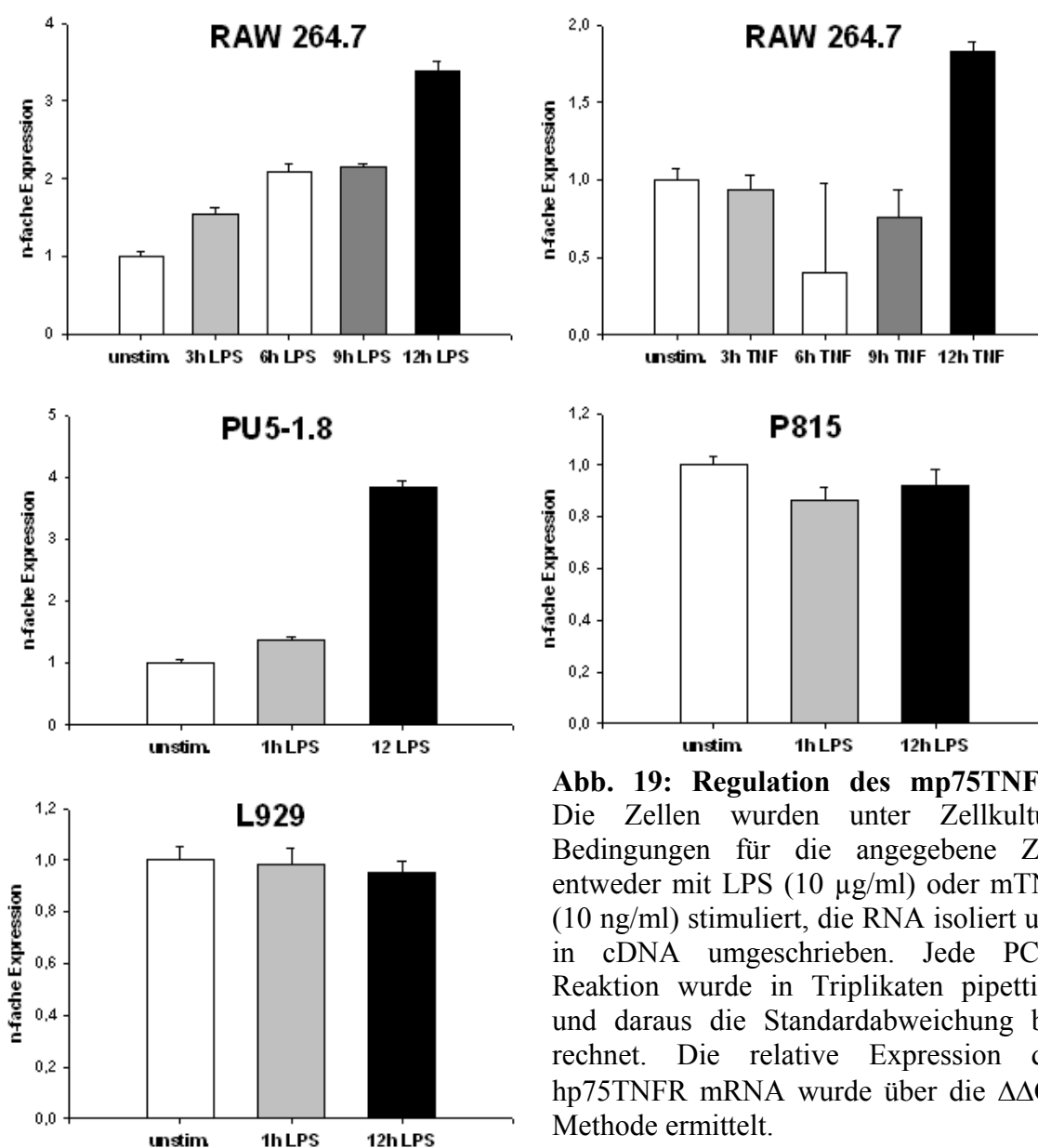


Abb. 19: Regulation des mp75TNFR. Die Zellen wurden unter Zellkultur-Bedingungen für die angegebene Zeit entweder mit LPS (10 µg/ml) oder mTNF (10 ng/ml) stimuliert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Jede PCR-Reaktion wurde in Triplikaten pipettiert und daraus die Standardabweichung berechnet. Die relative Expression der hp75TNFR mRNA wurde über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode ermittelt.

Leider gestaltete sich auch in der Maus die Detektion des icp75TNFR in der *Real Time* RT-PCR schwierig. Es gelang zwar ein Nachweis für RAW 264.7- und PU5-1.8-Zellen, in denen auch der p75TNFR durch Stimulierung hochreguliert wird (Abb. 19), aber die Transkript-Mengen befanden sich am Rande der Nachweisgrenze, weshalb die Einzelwerte der in Triplikaten pipettierten PCR-Reaktionen so stark streuten, dass eine richtige Quantifizierung nicht möglich war. Wie schon in der normalen RT-PCR, so war auch hier ein positiver Nachweis stark von der jeweiligen RNA-Präparation abhängig.

2.2.3. Nachweis nach Induktion D-Galaktosamin-/LPS-vermittelter Hepatotoxizität

Auch die bereits in der herkömmlichen RT-PCR eingesetzten cDNAs, die nach Induktion der DGalN-/LPS-vermittelten Hepatotoxizität gewonnen wurden, sollten in der Real Time RT-PCR eingesetzt und untersucht werden, wieder parallel zur Expression des mp75TNFR (Abb. 20).

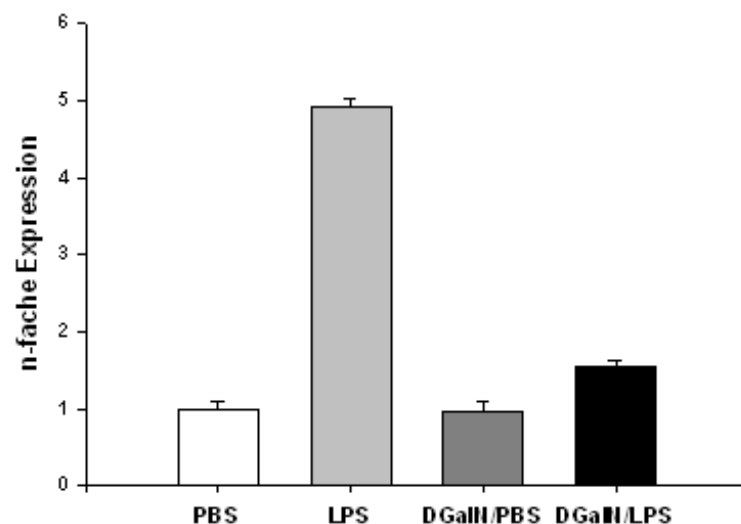


Abb. 20: Regulation des mp75TNFR nach Induktion DGalN-/LPS-vermittelter Hepatotoxizität. C57BL/6 Mäusen wurden entweder die Einzelsubstanzen oder Kombinationen daraus i.p. appliziert, die Tiere über fünf Stunden beobachtet und die Lebern entnommen, als bei der LPS-/DGalN-behandelten Maus sichtbare Zeichen der Leberschädigung zu beobachten waren. Die PCR-Reaktionen wurden in Triplikaten pipettiert und daraus die Standardabweichung berechnet. Die relative Expression der hp75TNFR mRNA wurde über die $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet.

Zwar ließ sich in der herkömmlichen RT-PCR das Transkript für den micp75TNFR nach Gabe von DGalN und LPS stabil und reproduzierbar nachweisen, allerdings war die mRNA nur nach Southern Hybridisierung detektierbar (Abb. 15). Für die Real Time RT-PCR war dies wiederum zu wenig für einen Nachweis. Offenbar geht die Regulation des

micp75TNFR hier nicht mit der des mp75TNFR einher, da im Falle der alleinigen LPS-Gabe letztere Isoform bis fast zum 5-fachen hochreguliert wird (Abb. 20), ohne dass in der RT-PCR, egal ob herkömmlich oder quantitativ, der micp75TNFR nachgewiesen werden konnte.

2.2.4. Nachweis in primären CD8⁺ T-Zellen

Zu guter Letzt sollte auch die Expression des micp75TNFR in den bereits untersuchten CD8⁺ T-Zellen untersucht werden, erneut parallel zur Expression des mp75TNFR. Die mRNA für micp75TNFR konnte zwar in der aus den Wildtyp-Mäusen stammenden RNA-Präparation nachgewiesen werden, aber wiederum an der Nachweisgrenze der Methodik, was sich in stark streuenden Triplikaten der PCR-Reaktion äußerte und damit nicht auswertbar war. Die Expression des mp75TNFR war auf RNA-Ebene nach 48-stündiger Stimulierung gegenüber den unstimulierten Zellen nicht erhöht, obwohl auf Proteinebene zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Zunahme des Rezeptors zu beobachten war (Abb. 16).

2.3. Charakterisierung des micp75TNFR

Nachdem sich eine Quantifizierung des icp75TNFR auch im Maus-System als schwierig erwies, das Transkript aber, wenn auch meist in äußerst geringer Menge, nachweisbar war, sollte versucht werden, über eine nähere Charakterisierung der neuen Isoform weiteren Einblick in ihre Bedeutung und Funktion zu erlangen.

2.3.1. Klonierung von Fusionsproteinen aus EYFP und den mp75TNFR-Isoformen mit humaner c-myc-Markierung

Für eine nähere Charakterisierung des micp75TNFR war es nötig, Zelllinien zu generieren, die die neue Isoform exprimieren. Um die Detektion des Rezeptors in verschiedenen Analysenmethoden zu vereinfachen, wurde das 3' Ende der cDNA mit einer humanen c-myc-Markierung versehen. Dieser aus 10 Aminosäuren bestehende Teil des Proto-Onkogens befindet sich nach Translation am C-Terminus des Proteins und kann mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Auch die C-terminale Fusion von EYFP an den Rezeptor dient der erleichterten Detektion, vor allem in fluoreszenzbasierten Verfahren. Um eine möglichst stabile Expression des micp75TNFR zu gewährleisten, sollten die entsprechenden Zelllinien durch retroviralen Gentransfer

generiert werden. Demnach erfolgte die Klonierung in den proviralen Vektor pQCXIP, der von der Arbeitsgruppe Schneider / Institut für Mikrobiologie dahingehend modifiziert wurde, dass die enthaltene *Multiple Cloning Site* (MCS) gegen die von pEYFP-N1, inklusive der Sequenz für EYFP, ausgetauscht wurde. Kloniert man nun eine cDNA im richtigen Leseraster in diesen Vektor, so entsteht ein Fusionsprotein, welches C-terminal aus EYFP besteht. Da die cDNAs für beide Rezeptor-Isoformen bereits in pcDNA3 enthalten vorhanden waren, konnten über geeignete Primer die jeweiligen Restriktionsenzym-Schnittstellen, sowie zusätzlich über den 3' Primer die humane c-myc-Markierung eingefügt und das resultierende PCR-Produkt dann in den proviralen Vektor kloniert werden (Abb. 21).

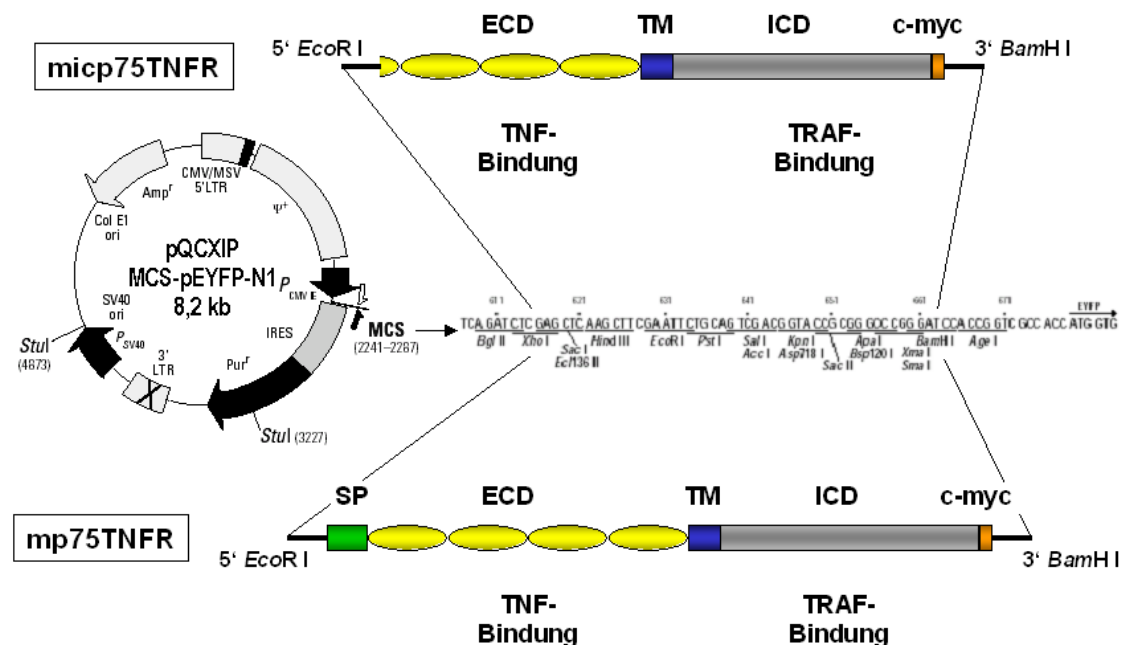


Abb. 21: Klonierung beider mp75TNFR-Isoformen als EYFP-Fusionsproteine mit humaner c-myc-Markierung. Nachdem die jeweiligen Restriktions-Schnittstellen, sowie 3' die humane c-myc-Markierung, über entsprechende Primer angefügt wurden, erfolgt die Klonierung in den proviralen Vektor. Dabei wird im richtigen Leseraster EYFP an den C-Terminus angehängt.

SP: Signalpeptid; ECD: Extrazellulärdomäne; TM: Transmembrandomäne; ICD: Intrazellulärdomäne;

Nach viralem Gentransfer der klonierten Vektoren in Tumor-Zellen und anschließender Selektion mit Puromycin, für das der provirale Vektor eine Resistenz beinhaltet, erhält man Zelllinien, die stabil die jeweilige mp75TNFR-Isoform als Fusionsprotein mit EYFP exprimieren, was in der Durchflusszytometrie direkt als positives Signal im Fluoreszenzkanal 1 detektierbar war (Abb. 22). Als Kontrolle dienten für alle durchgeführten

Experimente mit leerem Vektor transduzierte Zellen, die einzig EYFP als zusätzlich transduziertes Protein produzieren.

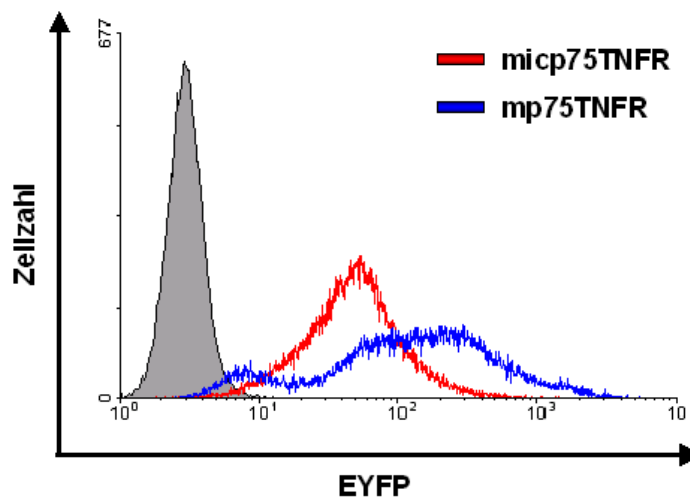


Abb. 22: Durchflusszytometrische Untersuchung von mit mp75-/micp75TNFR-myc-EYFP transduzierten L929-Zellen. Beide Zelllinien sind jeweils für die transduzierte Isoform positiv. Der graue Peak links stellt die Autofluoreszenz von nicht transduzierten L929-Zellen dar.

2.3.2. Biochemische Charakterisierung des micp75TNFR

Die Proteingröße des mp75TNFR ist hinlänglich bekannt, sie führte ja zur Namensgebung des auch als Typ II TNFR bekannten Proteins. Da aber dem icp75TNFR in der Maus die ersten 26 Aminosäuren von Exon 2 fehlen, sollte diese Diskrepanz im Vergleich zum mp75TNFR mittels Immunpräzipitation bestätigt werden, auch um eine eventuell veränderte Glykosylierung der neuen Isoform aufzuzeigen. Das Proto-Onkogen c-myc mit seinen 10 Aminosäuren ist in Bezug auf die resultierende Proteingröße nicht weiter zu beachten. Allerdings fügt EYFP den beiden p75TNFR-Isoformen jeweils rund 30 zusätzliche kDa bei, was bei der Größenbestimmung berücksichtigt werden muss.

Für die Immunpräzipitation wurde aus L929-Zellen, die jeweils mit einer der beiden Isoformen transduziert worden sind, zunächst ein Totallysat zubereitet. Zu diesem Lysat wurde ein gegen die c-myc-Markierung gerichteter Antikörper gegeben und dieser dann nach ausreichender Inkubationszeit mitsamt der jeweils daran gebundenen mp75TNFR-Isoform durch Zugabe von Protein G-Sepharose präzipitiert. Nach Auftrennung der so gewonnenen Fraktionen im SDS-PAGE und Transfer auf eine Membran, konnten die beiden Isoformen mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden. Da die Intrazellulär-Domänen beider Rezeptoren jeweils identisch ist, bot sich die Verwendung

eines Antikörpers gegen intrazelluläre Epitope an. Zudem kann durch die Verwendung von gegen den C-Terminus gerichteten Antikörpern sicher gestellt werden, dass die Rezeptoren in voller Länge und nicht im *geshreddeten* Zustand dargestellt werden.

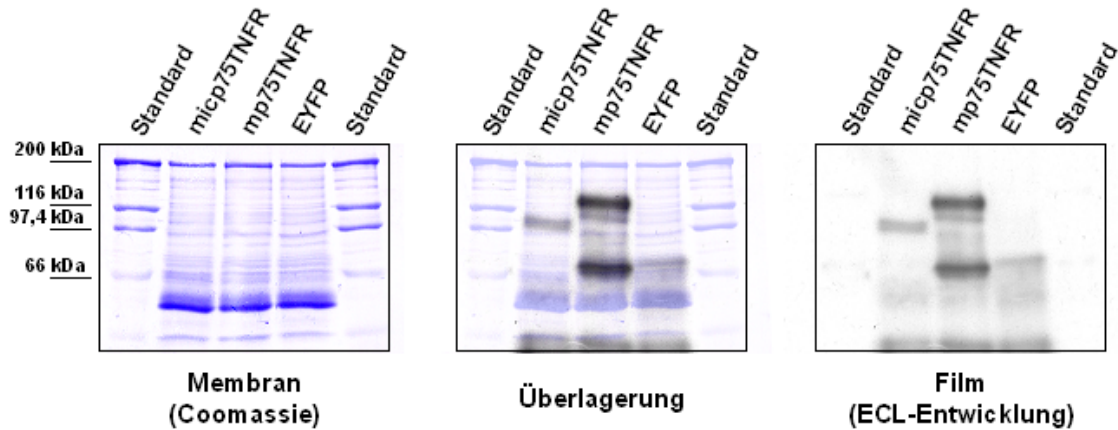


Abb. 23: Immunpräzipitation beider mp75TNFR-Isoformen. Aus L929-Zellen, die mit der jeweiligen Isoform des mp75TNFR, oder dem nur EYFP-enthaltenden Vektor transduziert worden waren, wurde ein Totallysat zubereitet, eine Immunpräzipitation durchgeführt und die präzipitierten Immunkomplexe im SDS-PAGE aufgetrennt. Die spezifische Detektion erfolgte mittels Western Blot.

Präzipitations-Ak: Maus anti-c-Myc (9E10); Detektions-Ak: polyklonaler Kaninchen anti-hp75TNFR-ICD (kreuzreagierend mit mp75TNFR-ICD)

In der Immunpräzipitation resultiert die Verkürzung von Exon 2 des micp75TNFR in einem um ca. 20 kDa verringerten Molekulargewicht (Abb. 23). Durch das C-terminale EYFP zeigt der mp75TNFR ein deutlich höheres apparentes Molekulargewicht, als dies für den endogenen Rezeptor der Fall wäre, der mit 75 bis 80 kDa in der Literatur beschrieben wird. Auch der micp75TNFR wird durch den Anhang des EYFP entsprechend schwerer, wie bereits erwähnt, bleibt aber die Differenz, die sich durch das verkürzte Exon 2 ergibt, erhalten.

2.3.3. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des micp75TNFR

Aufgrund des fehlenden Signalpeptides war auch die neu entdeckte Isoform des p75TNFR in der Maus als intrazellulär bezeichnet worden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sollten dies bestätigen. Da beide Rezeptoren als Fusionsproteine mit EYFP exprimiert werden, ist nach Fixierung der Zellen kein weiteres Anfärben mit Antikörpern nötig; EYFP kann direkt fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden.

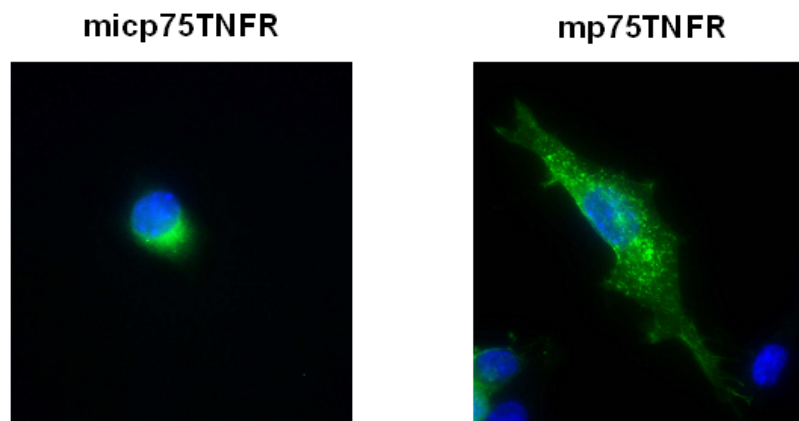


Abb. 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme beider mp75TNFR-Isoformen. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden NIH3T3-Zellen mit den TNFR-EYFP-Fusionsproteinen transduziert und mit Puromycin selektioniert. Der mit DAPI gefärbte Kern erscheint blau. Dem EYFP ist hier eine grüne Fluoreszenzfarbe zugeordnet worden.

Beim mp75TNFR ist deutlich eine Färbung der gesamten Zellmembran zu erkennen, wohingegen sich die Fluoreszenz beim micp75TNFR auf eine Region in Kernnähe beschränkt (Abb. 24). Er wird also nicht wie der mp75TNFR, der im Gegensatz zum micp75TNFR mit Exon 1 ein Signalpeptid enthält, direkt auf die Membran gebracht, sondern verbleibt hauptsächlich intrazellulär in einem perinukleären Bereich.

2.3.4. Untersuchung zur Membranexpression des micp75TNFR

Da bereits für den humanen icp75TNFR gezeigt werden konnte, dass der Rezeptor trotz fehlender Membranfärbung im Fluoreszenzmikroskop sehr wohl zu einem gewissen Teil auf die Zelloberfläche gebracht wird, sollte auch im Maus-System eine eventuelle Membranständigkeit des icp75TNFR untersucht werden. Dazu wurden die mit micp75TNFR stabil transduzierten L929-Zellen mit einem gegen den mp75TNFR gerichteten Antikörper gefärbt und in der Durchflusszytometrie untersucht.

Um auszuschließen, dass eine unterschiedliche Transduktionseffizienz der beiden Zelllinien für ihre jeweilige Rezeptor-Isoform in das Ausmaß der Oberflächenexpression mit eingeht, wurde zunächst im *Density*-Plot über Fluoreszenzkanal 1 für beide Zelllinien eine Region gleicher EYFP-Fluoreszenzintensität festgelegt (Abb. 25A).

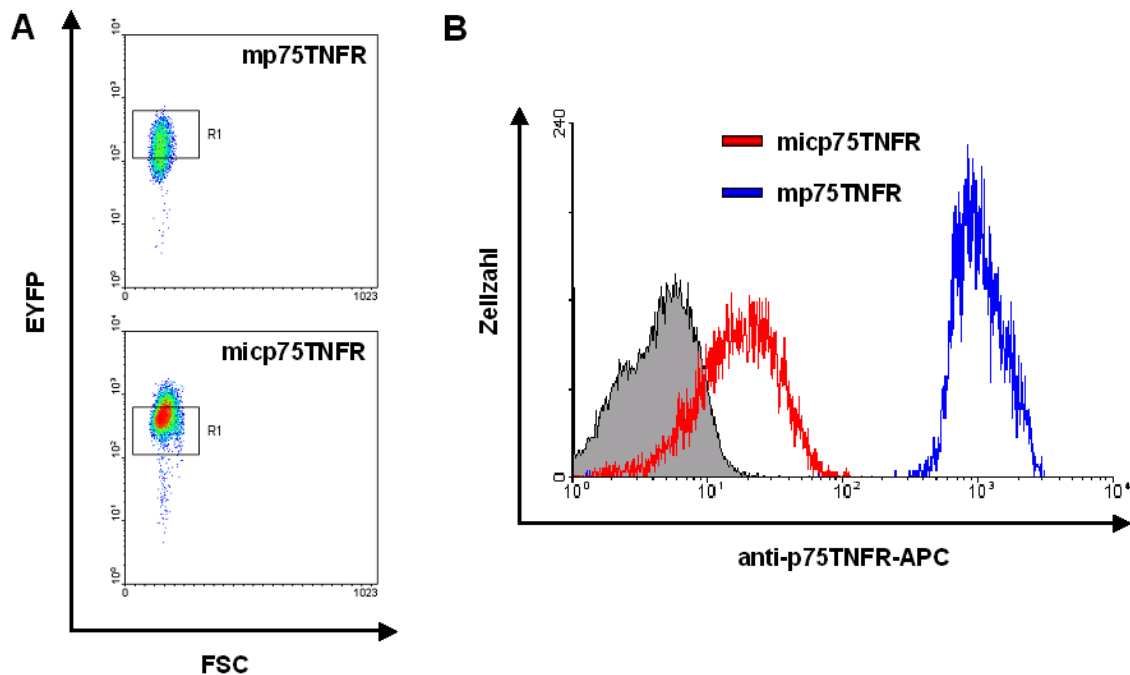


Abb. 25: Membranexpression des micp75TNFR. *Density*-Blot zur Eingrenzung beider Zellpopulationen auf gleiche EYFP-Expression (A) und Histogramm zur Bestimmung der Epitopdichte der jeweiligen p75TNFR-Isoform auf der Zellmembran (B). Beide L929-Zelllinien, die jeweils eine der beiden mp75TNFR-Isoformen exprimieren, wurden zunächst mit einem gegen die Extrazellulärdomäne gerichteten, biotinylierten Antikörper inkubiert. Die Färbung erfolgte mit Streptavidin-APC, welches spezifisch an das Biotin des Primärantikörpers bindet. Der graue Peak links im Histogramm bildet die Fluoreszenz der EYFP-exprimierenden Kontroll-Zellen ab, die ebenfalls mit dem gegen mp75TNFR gerichteten Antikörper und Streptavidin APC gefärbt wurden.

Im Histogramm der auf gleiche EYFP-Expression eingegrenzten Populationen konnte für beide Isoformen eine Membranexpression detektiert werden, diese fiel aber für den micp75TNFR deutlich schwächer aus als für den mp75TNFR (Abb. 25B). Auch der icp75TNFR in der Maus wird also zu einem gewissen Teil auf die Zellmembran von transduzierten Zellen gebracht.

2.3.5. Untersuchungen zur Prozessierung von löslichem mcip75TNFR

Für den p75TNFR ist bekannt, dass er durch Metalloproteasen aus der ADAM-Familie, hier ist vor allem ADAM 17/TACE (TNF-Alpha Converting Enzyme) zu nennen, von der Membran abgeschnitten und in löslicher Form ins Serum abgegeben wird (Wallach, 1991). Da für den micp75TNFR Membranexpression gezeigt werden konnte, ist theoretisch auch eine Prozessierung dieser Isoform in seine lösliche Variante möglich. Zur Klärung dieser Frage sollte der Zellkultur-Überstand von micp75TNFR-

transduzierten Zellen im ELISA untersucht werden. Da ein direktes Binden der potentiell im Überstand vorhandenen löslichen Rezeptoren in eine ELISA-Platte, mit anschließender spezifischer Detektion durch einen Antikörper, nur unspezifische Bindung zeigte, musste ein *Sandwich*-ELISA entwickelt werden, bei dem ein geeignetes Antikörper-Paar Verwendung findet. Hier erfolgt nicht nur die Detektion, sondern schon die Bindung an die Platte spezifisch. Für den mp75TNFR sind drei verschiedene monoklonale Antikörper kommerziell erhältlich, die gegen die Extrazellulärdomäne des Rezeptors gerichtet sind. Da bislang nur für Klon TR-32.4 gezeigt werden konnte, dass auch der micp75TNFR noch erkannt wird (s. Abb. 25B), immerhin fehlen 26 Aminosäuren von Exon 2, und bei keinem der Antikörper das von ihm erkannte Epitop bekannt ist, mussten zunächst die beiden verbleibenden Klone auf Erkennung des micp75TNFR hin untersucht werden.

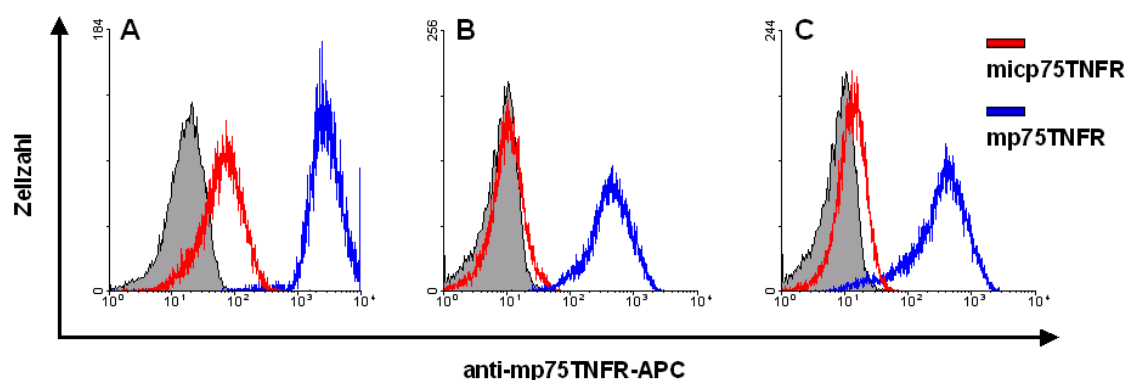


Abb. 26: Test der drei gegen mp75TNFR gerichteten Antikörper auf Kreuzreaktivität mit dem micp75TNFR. Bei Klon TR-32.4 (A) und Klon TR75-89 (B) handelt es sich jeweils um einen biotinylierten Antikörper, die mit Streptavidin-APC als Sekundärantikörper detektiert wurden. Klon TR-54.7 (C) ist dagegen nicht biotinyliert, daher musste eine dreistufige Färbung durchgeführt werden. Als Sekundärantikörper diente hier zunächst ein biotinylierter anti-armenischer Hamster Ak, der im 3. Schritt mit Streptavidin-APC gefärbt wurde. Der graue Peak links im Histogramm stellt jeweils L929-Zellen dar, die nur mit Streptavidin-APC gefärbt wurden.

Alle drei Antikörper erkennen den mp75TNFR auf mp75TNFR-transduzierten L929-Zellen (Abb. 26A bis C, blaue Kurve). Auf L929-Zellen, die mit dem micp75TNFR transduziert wurden, kann aber nur Klon TR-32.4 (Abb. 26A, rote Linie) den Rezeptor nachweisen. Die beiden anderen Klone TR75-89 und TR-54.7 (Abb. 26B und C, rote Linie) erkennen das Protein dagegen nicht mehr.

Da nur einer der drei monoklonalen Antikörper gegen die mp75TFNR-Extrazellulärdomäne demnach auch den micp75TNFR erkannte, stand kein spezifisches Antikörper-

Paar für die Etablierung eines *Sandwich*-ELISAs oder einer Immunpräzipitation zur Verfügung. Ein herkömmlicher Western Blot ohne vorherige Antikörper-gestützte Konzentrierung der löslichen Rezeptoren, wie dies bei einer Immunpräzipitation der Fall wäre, zeigte, dass die in Zellkultur-Überständen enthaltene Epitopmenge zu gering für eine Detektion ist. Selbst löslicher mp75TNFR konnte auf diese Art und Weise nicht nachgewiesen werden.

Da ein direkter Nachweis von löslichem micp75TNFR mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern nicht möglich war, blieb die Option eines indirekten Nachweises über den Einsatz der Zellkultur-Überstände im TNF-induzierten Zytotoxizitäts-Test. Dazu werden L929-Zellen mit abnehmender Konzentration an Maus-TNF (mTNF) in einer 96-Lochplatte inkubiert und so über Aktivierung des endogenen mp55TNFR der L929-Zellen Zelltod induziert. Geschieht dies in Gegenwart von löslichem mp75TNFR, wird das toxische mTNF bereits im Überstand gebunden und der mp55TNFR kann nicht mehr im selben Ausmaß aktiviert werden. Dies führt zu einem verbesserten Überleben der Zellen, die mit löslichem Rezeptor im Überstand inkubiert werden. Sollte auch micp75TNFR in seine lösliche Form überführt werden, muss im Zytotoxizitäts-Test ein Schutz der L929-Zellen erkennbar sein.

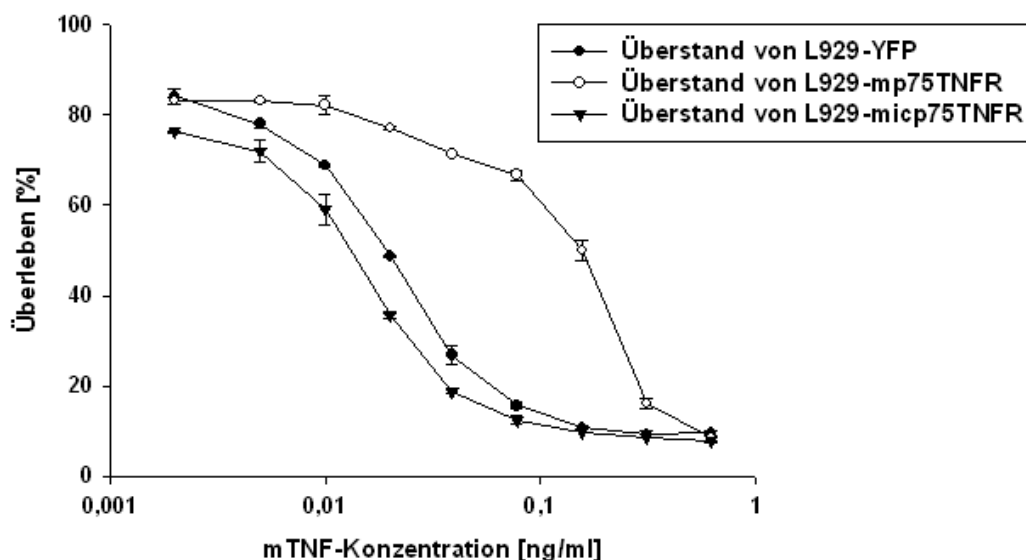


Abb. 27: mTNF-induzierter Zytotoxizitäts-Test mit konditioniertem Medium. Die in eine 96-Lochplatte ausgesäten L929-Zellen wurden mit dem jeweiligen konditionierten Medium inkubiert, welches im 1. *well* mTNF in einer Konzentration von 10 ng/ml enthielt. Durch eine log 2-Verdünnungsreihe wurde die Konzentration je *well* jeweils um die Hälfte reduziert. Zur Verstärkung des induzierten Zelltodes wurde Actinomycin D in einer Endkonzentration von 2 µg/ml zugegeben.

Auch über diesen indirekten Nachweis gelang es nicht, die Prozessierung von micp75TNFR in seine lösliche Form nachzuweisen. Während löslicher mp75TNFR im Überstand zu verbessertem Überleben der L929-Zellen im Test führt, verhalten sich L929-Zellen, die mit Überständen von L929-EYFP- respektive L929-micp75TNFR-exprimierenden Zellen inkubiert wurden, praktisch gleich (Abb. 27).

Unter Umständen ist die niedrige Konzentration des im Vergleich zum mp75TNFR doch in wesentlich geringerem Umfang auf der Membran lokalisierten micp75TNFR dafür verantwortlich.

2.3.6. Rolle des micp75TNFR im TNF-induzierten Zytotoxizitäts-Test

Nicht nur löslicher p75TNFR vermittelt im TNF-induzierten Zytotoxizitäts-Test einen Schutz vor Zelltod, auch der auf der Zellmembran lokalisierte p75TNFR ist dazu in der Lage. Deshalb sollte dies auch für micp75TNFR untersucht werden. Dazu wurden die mit der jeweiligen mp75TNFR-Isoform transduzierten L929-Zellen in eine 96-Lochplatte gesät. Als Kontrolle dienen wieder L929-Zellen, die ausschließlich EYFP als zusätzlich transduziertes Protein exprimieren. Die Induktion des Zelltodes erfolgt erneut über mTNF, welches in absteigenden Konzentrationen in die Platte titriert wurde. Da Actinomycin D als Inhibitor von Proteinbiosynthese zwar einerseits gebraucht wird, um die Induktion des Zelltodes zu verstärken und zu beschleunigen, aber andererseits für anti-apoptotische Signale, wie sie eventuell vom micp75TNFR induziert werden könnten, aktive Proteinbiosynthese erforderlich ist (Karin, 2002), wurde Actinomycin D einmal sofort und einmal mit einer Wartezeit von einer Stunde zugegeben. Da die Induktion von NF- κ B und die damit verbundenen Signalwege relativ schnelle Ereignisse darstellen, sollte durch die verzögerte Zugabe ein potentieller Schutzmechanismus aufgebaut werden können, bevor die Proteinbiosynthese durch das Actinomycin D unterbunden wird.

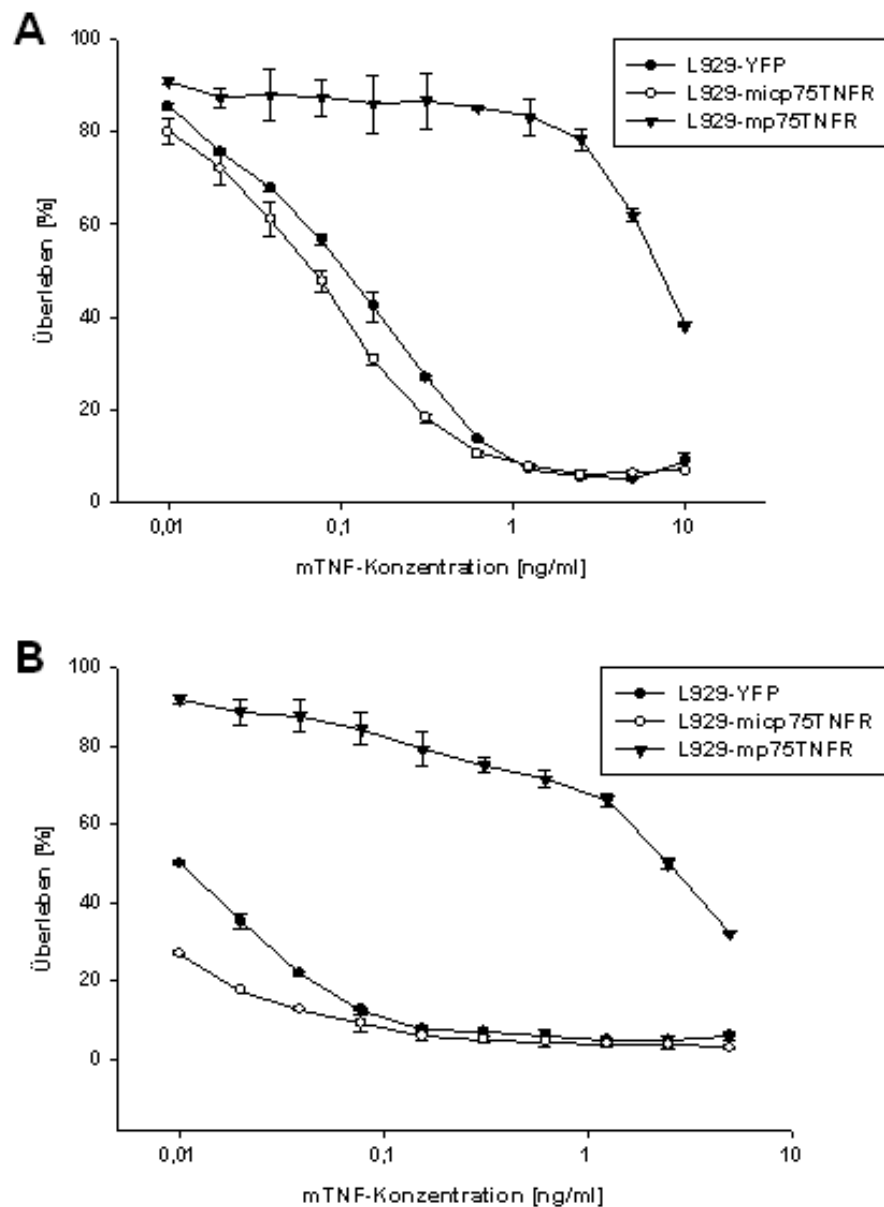


Abb. 28: Rolle des micp75TNFR im mTNF-vermittelten Zytotoxizitäts-Test. Unabhängig davon, ob Actinomycin D sofort (**A**) oder mit einer Wartezeit von einer Stunde zugegeben wurde (**B**), vermittelt mp75TNFR einen deutlichen Schutz vor dem durch mTNF induzierten Zelltod. Die Zellen, die mit micp75TNFR transduziert wurden, verhalten sich dagegen in beiden Fällen wie die Kontrollzellen (L929-YFP).

Der mp75TNFR ist also in der Lage, unabhängig von der Induktion anti-apoptotischer Signale, einen Schutz vor mTNF-induzierter Zytotoxizität zu vermitteln, während der micp75TNFR dies nicht vermag. Im Falle der sofortigen Zugabe von Actinomycin D (Abb. 28A) kann dieser Effekt nicht auf Aktivierung des Rezeptors und damit verbundener Induktion anti-apoptotischer Signale beruhen, sondern muss vielmehr durch ein Wegfangen des Liganden mTNF verursacht sein, der damit in geringerem Ausmaß für

die Bindung an den mp55TNFR zur Verfügung steht, über dessen Aktivierung aber der im Test beobachtete Zelltod induziert wird. Dies zeigt sich in der Tatsache, dass ein derartiger Schutz verloren geht, sobald das Zytotoxizität-vermittelnde Agens nicht mehr von mp75TNFR gebunden und damit abgefangen werden kann, wie dies bei humanem TNF (hTNF) (Abb. 29A) oder einem agonistischen Antikörper gegen den mp55TNFR (Abb. 29B) der Fall ist.

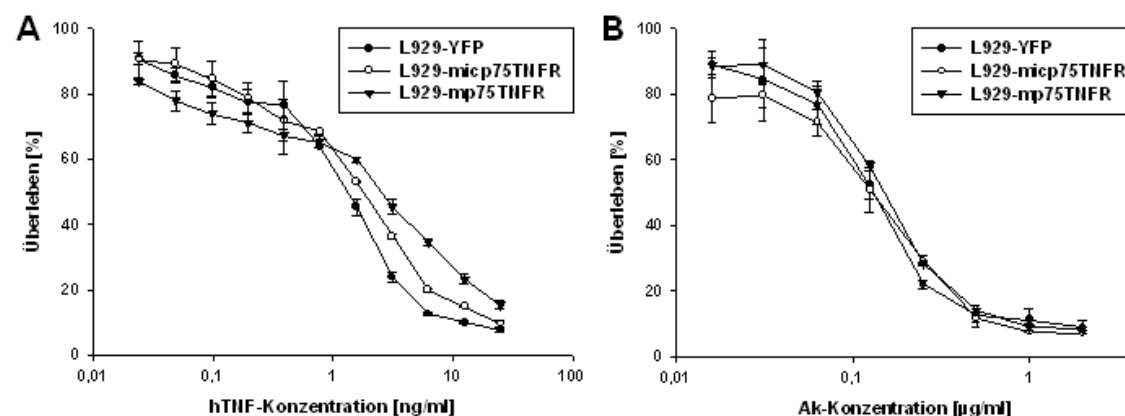


Abb. 29: TNF-induzierter Zytotoxizitäts-Test. Als toxisches Agens wurde in (A) humanes TNF (50 ng/ml im 1. well) und in (B) ein agonistischer Antikörper gegen den mp55TNFR (2 μ g/ml im 1. well) verwendet. Actinomycin D wurde in einer Endkonzentration von 2 μ g/ml zugesetzt.

Einmal mehr stellt sich die Frage, ob der für micp75TNFR nicht vorhandene Schutzeffekt durch eine zu geringe Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche verursacht ist, oder ob die Fähigkeit der Ligandbindung durch die Trunkierung von Exon 2 sogar gänzlich verloren gegangen ist.

2.3.7. Untersuchungen zur Ligandbindung des micp75TNFR

Da der micp75TNFR nur in geringem Umfang auf der Zellmembran exprimiert wird und die Prozessierung in seine lösliche Form nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, ist die Frage der Ligandbindung mit dem bisher verwendeten Rezeptorkonstrukt nicht zu beantworten. Deshalb wurde ein Fusionsprotein aus der Extrazellulärdomäne des micp75TNFR und dem Fc-Teil eines humanen IgG entwickelt, welches, im richtigen Leseraster zum Signalpeptid von CD33 kloniert, direkt in den Überstand von transfizierten Zellen sezerniert wird. Zum besseren Nachweis des Fusionsproteins wurde 3' wieder eine humane c-myc-Markierung angehängt (Abb. 30).

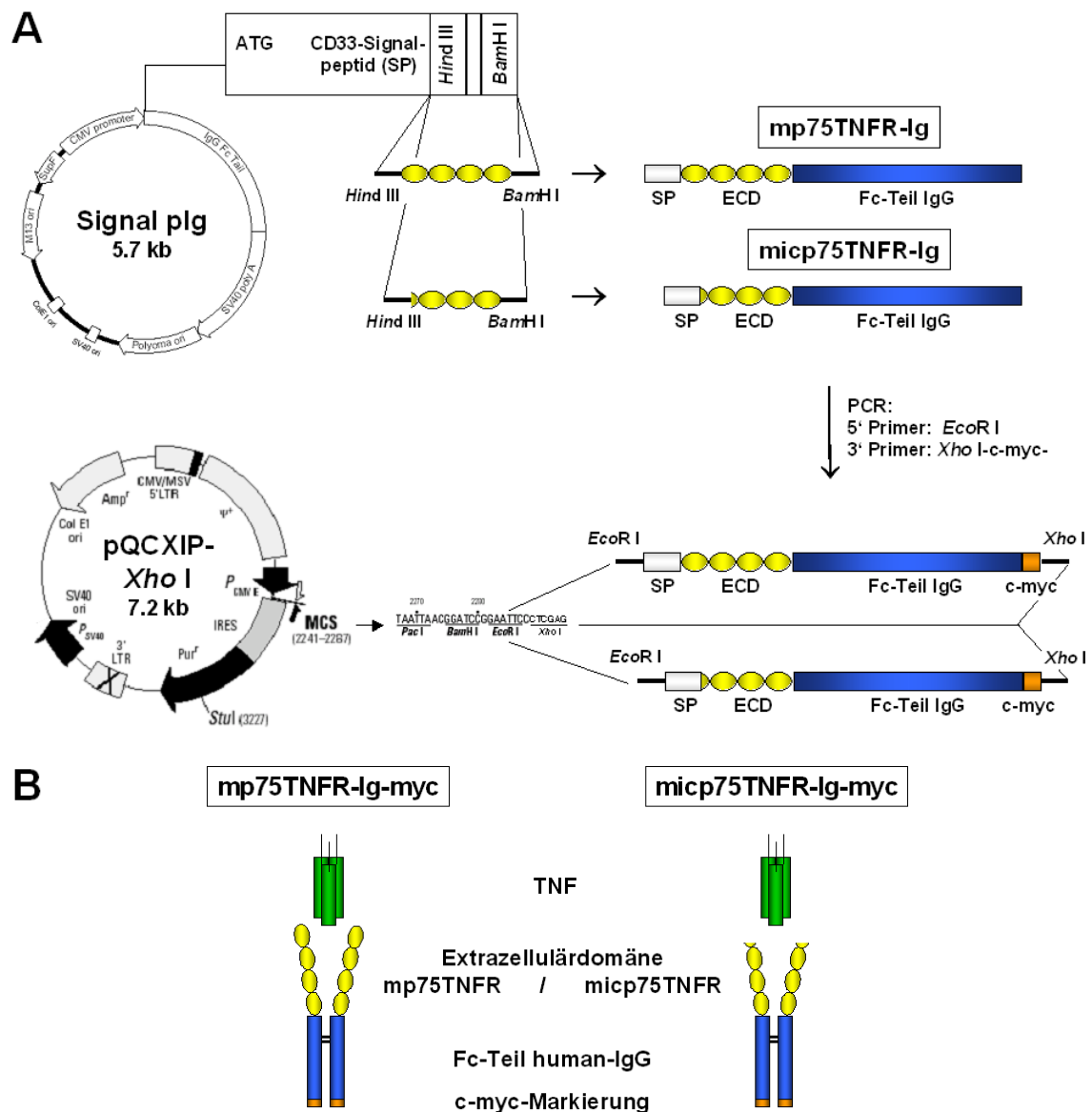


Abb. 30: Klonierung der Fusionsproteine aus mp75-/micp75TNFR-Extrazellulär-domäne und dem Fc-Teil eines humanen IgG. Der Vektor Signal plg beinhaltet bereits das Signalpeptid von CD33 und den Fc-Teil des humanen IgG. Beides wird nach Klonierung der jeweiligen Extrazellulärdomäne im richtigen Leseraster direkt an das 5' bzw. an das 3' Ende angehängt. Über eine PCR mit den entsprechenden Primern auf diesen so entstandenen Vektor werden wiederum die richtigen Restriktionsenzym-Schnittstellen und 3' zusätzlich die Sequenz für das humane c-myc angehängt. Um sich die Möglichkeit des viralen Gentransfers der Konstrukte offen zu halten, wurden die Fusionsproteine dann in den proviralen Vektor pQCXIP-XhoI kloniert (**A**). Das resultierende Protein in dimerisierter Form ist schematisch in (**B**) gezeigt.

Zum Nachweis der Fusionsproteine wurde ein ELISA sowie eine Immunpräzipitation (IP) entwickelt. Über die Kombination aus einem gegen die c-myc-Markierung gerichteten und dem die mp75-/micp75TNFR-Extrazellulärdomäne erkennenden Antikörper, ist

damit ein spezifischer Nachweis beider Proteine möglich, die jeweils durch transiente Transfektion in HEK-Zellen exprimiert wurden. Um auch das Kontroll-Protein, alleiniger Fc-Teil mit c-myc-Markierung, welches nicht vom mp75-/micp75TNFR spezifischen Antikörper erkannt wird, abbilden zu können, wurde bei der IP im ersten Schritt an Stelle eines Antikörpers nur Protein G-Sepharose zur Konzentrierung der Proteine aus dem HEK-Überstand verwendet. Zum Nachweis des Kontroll-Proteins auf der Western-Blot-Membran konnte dann der anti-c-myc-Antikörper verwendet werden.

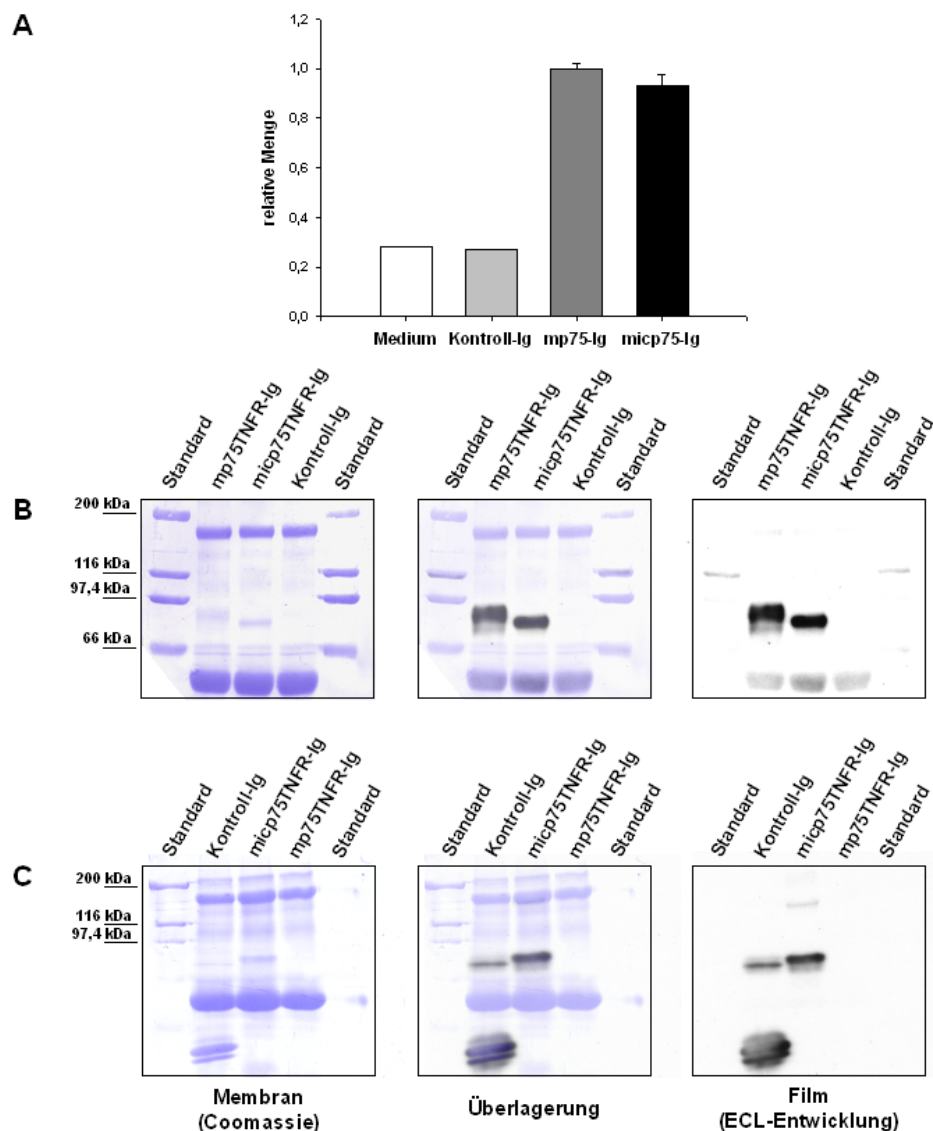


Abb. 31: Nachweis der Fusionsproteine im ELISA und mittels Immunpräzipitation (IP). Im ELISA (A) wurde ein anti-c-myc-Antikörper als Capture-Ak und ein für micp-/mp75TNFR spezifischer Ak (Klon TR-32.4) zur Detektion eingesetzt. Für die IP wurde zur Aufkonzentrierung der Proteine in (B) ein für micp-/mp75TNFR spezifischer Ak und in (C) nur Protein G-Sepharose verwendet, um auch das Kontroll-Protein präzipitieren zu können. Zur Detektion wurde in beiden Fällen der anti-c-myc-Ak (9E10) verwendet. Da für den ELISA kein Standard (Fusionsprotein mit bekannter Proteinkonzentration) existiert, können nur relative Mengen angegeben werden.

Durch den Nachweis der Fusionsproteine in der Immunpräzipitation wird wieder der Unterschied im Molekulargewicht der beiden Isoformen deutlich. Beide Proteine weisen ein Molekulargewicht von ungefähr 80-85 kDa auf, wobei dasjenige mit der Extrazellulärdomäne des micp75TNFR durch die Trunkierung von Exon 2 geringfügig leichter ist (Abb. 31B). Eine Präzipitation, die ohne Antikörper nur mit Protein G-Sepharose durchgeführt wurde, ist offensichtlich nicht für alle Ig-Konstrukte gleichermaßen geeignet. Das mp75TNFR-Ig-Konstrukt entging auf diese Weise dem Nachweis, obwohl es im ELISA (Abb. 31A) und nach vorheriger Präzipitation mit einem spezifischen Antikörper in der IP gut detektierbar war. Jedoch zeigt sich die Vorgehensweise geeignet, um das Kontrollprotein abbilden zu können, dessen Molekulargewicht deutlich kleiner als 50 kDa ist und das bereits auf der Coomassie-gefärbten Membran sichtbar war (Abb. 31C).

2.3.7.1. Bindung des micp75TNFR an lösliches TNF

Die so gewonnenen und getesteten Überstände wurden im TNF-induzierten Zytotoxizitäts-Hemmtest eingesetzt. Ist der micp75TNFR noch in der Lage, an seinen Liganden mTNF zu binden, dann wird auch hier wieder das toxische Agens mTNF bereits im Überstand vom Fusionsprotein gebunden und steht damit in geringerem Ausmaß zur Aktivierung des mp55TNFR zur Verfügung. Dies sollte sich in einem Schutz der im Test verwendeten L929-Zellen äußern, der nicht auftritt, wenn sich im Überstand nur das Kontroll-Protein befindet.

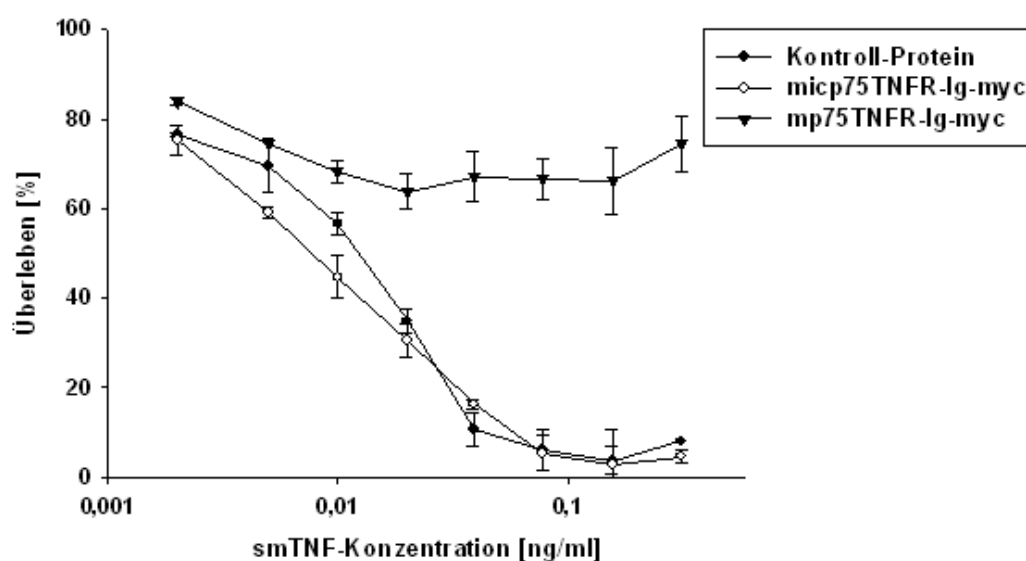


Abb. 32: Bindung von mp75-/micp75TNFR an lösliches mTNF (smTNF). Zur Induktion des Zelltodes wurde wieder mTNF in einer Konzentration von 10 ng/ml im 1. well eingesetzt, sowie Actinomycin D in einer Endkonzentration von 2 µg/ml.

Anhand des mp75TNFR-Fusionsproteins wird deutlich, dass die Bindung des mTNF an die Extrazellulärdomäne seines Rezeptors tatsächlich zu einem Schutz im TNF-vermittelten Zytotoxizitäts-Hemmtest führt (Abb. 32▼). Beim Fusionsprotein welches die Extrazellulärdomäne des micp75TNFR trägt (Abb. 32◇), ist dies aber nicht zu beobachten. Zum Beweis für die Spezifität der Bindung zwischen mTNF und dem mp75TNFR-Ig-Konstrukt wurde derselbe Test unter Verwendung von humanem TNF wiederholt, welches zwar an den mp55TNFR binden und damit Zelltod auslösen kann, jedoch nicht mehr vom mp75TNFR erkannt wird (s. a. Abb. 29A).

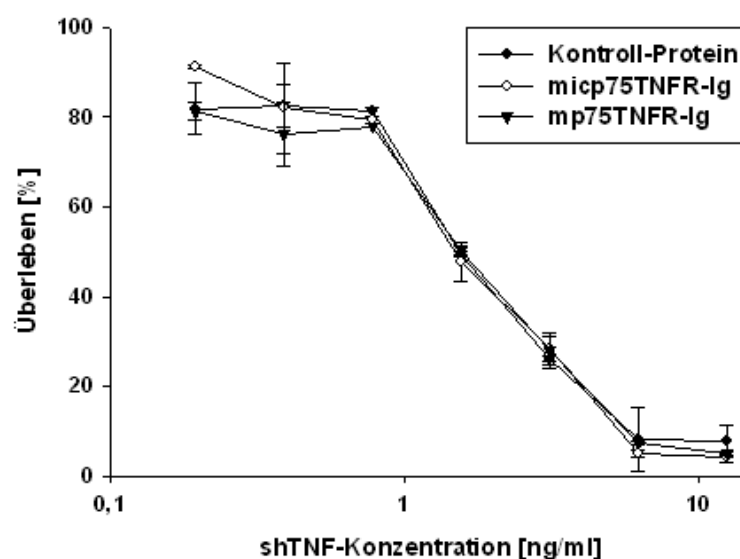


Abb. 33: Bindung von mp75-/micp75TNFR an lösliches humanes TNF (shTNF). Lösliches hTNF wurde in einer Konzentration von 50 ng/ml im 1. well eingesetzt, Actinomycin D in einer Endkonzentration von 2 µg/ml.

Mit der Unfähigkeit zur Bindung des hTNF an das mp75TNFR-Fusionsprotein ging der Schutz im Zytotoxizitäts-Test verloren (Abb. 33▼). Da humanes TNF an keines der im Überstand befindlichen Ig-Konstrukte binden kann, verhalten sich demnach alle Proben im Test gleich (Abb. 33).

2.3.7.2. Bindung des micp75TNFR an membranständiges TNF

Da für den p75TNFR bekannt ist, dass Signaltransduktion primär über membranständiges TNF vermittelt wird (Grell, 1995b) sollte untersucht werden, ob der micp75TNFR eventuell spezifisch an diese Form des Liganden bindet. Dazu mussten Zellen generiert werden, die mTNF auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (memTNF), aber möglichst nicht durch *shedding* in die lösliche Form überführen und in den Überstand abgeben. Dazu wurde eine Mutante des endogenen mTNF verwendet, bei der durch gezielte Punkt-

mutationen alle drei derzeit bekannten Schnittstellen für die proteolytisch aktiven Enzyme, die TNF von der Membran abschneiden (hier ist vor allem TACE zu nennen), inaktiviert wurden (Mueller, 1999). Allerdings kann trotzdem ein gewisser Anteil des auch als *nonsecretable* memTNF bezeichneten Proteins an der Zellmembran in die lösliche Form prozessiert werden, was sich im ELISA, der mit den Kulturüberständen der memTNF-transduzierten Zellen durchgeführt wurde, zeigte (Abb. 34B).

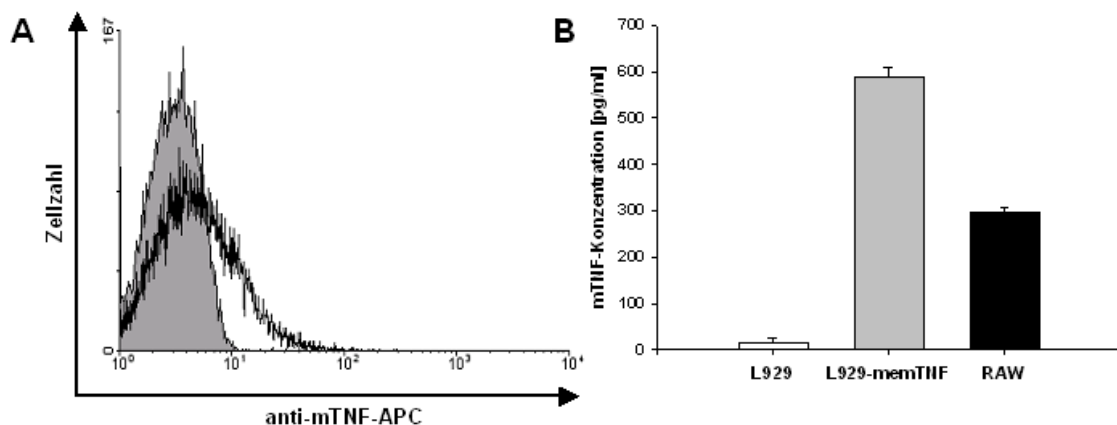


Abb. 34: Charakterisierung der memTNF-transduzierten L929-Zellen. (A) Die transduzierten L929-Zellen zeigen eine positive Membran-Färbung auf mTNF in der Durchflusszytometrie. Der graue gefüllte Peak stellt Wildtyp-L929-Zellen dar, die ebenfalls mit dem anti-mTNF Ak gefärbt wurden. Im ELISA (B) zeigt sich, dass trotz Mutation der drei bekannten Schnittstellen eine Prozessierung der TNF-Mutante in seine lösliche Form zu einem gewissen Grad möglich ist. Als Kontrolle dienen zum einen L929-Zellen, die als Maus-Fibroblasten kein TNF exprimieren und zum anderen RAW 264.7-Zellen, Maus-Monozyten, für die eine relativ hohe TNF-Produktion bekannt ist. Für die im ELISA untersuchten Überstände wurden jeweils 1×10^7 Zellen in eine 10 cm-Schale ausgesät und die Zellen in 10 ml Medium für 24 h inkubiert.

Wie schon bei der Untersuchung zur Ligandbindung von löslichem TNF, wurde auch beim membranären TNF der TNF-induzierte Zytotoxizitäts-Hemmtest verwendet. Da die mit memTNF transduzierten L929-Zellen aber in relativ großem Umfang lösliches TNF in den Überstand abgeben und den Test dadurch verfälschen würden, konnte der Zelltod nicht durch lebende memTNF-transduzierte Zellen ausgelöst werden. Daher wurde ein Zytotoxizitäts-Test entwickelt, bei dem fixierte transduzierte Zellen als toxisches Agens zum Einsatz kommen. Zur Etablierung des Verfahrens und um auszuschließen, dass das Fixativ alleine schon Zelltod vermittelt, wurde der Test zunächst parallel mit fixierten transduzierten und fixierten Wildtyp-L929-Zellen durchgeführt (Abb. 35A), bevor wieder die Fusionsproteine in Form von konditioniertem Medium zugefügt wurden (Abb. 35B).

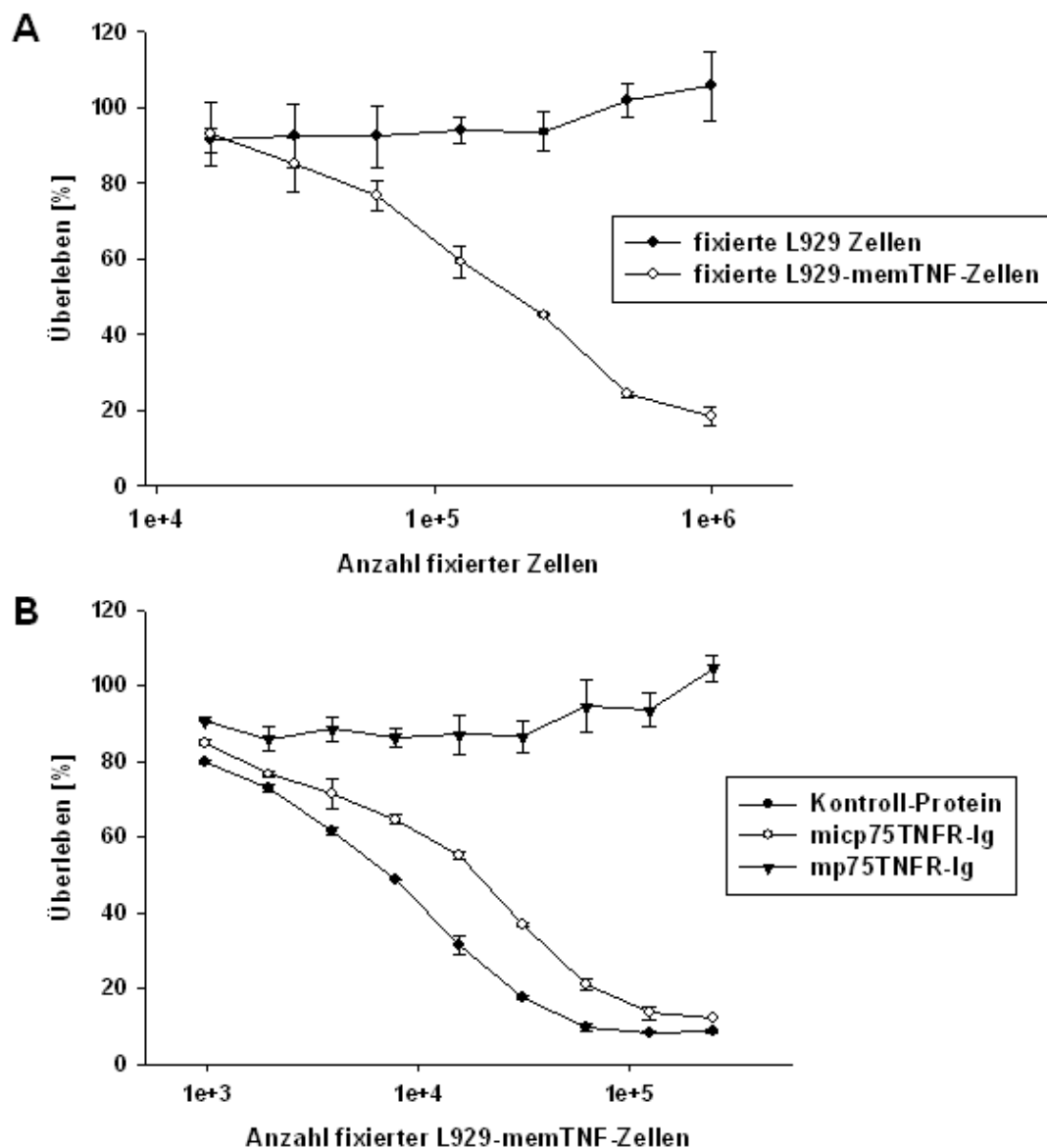


Abb. 35: Bindung von mp75-/micp75TNFR an membranständiges TNF. Zur Etablierung der Methode (**A**) wurden transduzierte und Wildtyp-L929-Zellen fixiert, gewaschen und in einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml im 1. well eingesetzt. Die Endkonzentration an Actinomycin D betrug wieder $2 \mu\text{g/ml}$. In (**B**) wurden die fixierten memTNF-L929-Zellen in Fusionsprotein-haltigem Medium in gleicher Konzentration wie in (A) zugegeben und der Test analog durchgeführt.

Anhand des Etablierungsversuches (Abb. 35A) konnte gezeigt werden, dass nur fixierte L929-Zellen, die mit memTNF transduziert worden sind, konzentrationsabhängig Zelltod von L929-Zellen induzieren (Abb. 35A◇). Fixierte Wildtyp-L929-Zellen dagegen verhalten sich gegenüber den ausgesäten L929-Zellen in Bezug auf das Zellwachstum indifferent (Abb. 35A◆). Der mp75TNFR zeigte auch gegenüber memTNF-induzierter Zytotoxizität einen fast vollständigen Schutz, wohingegen der micp75TNFR diesen Effekt kaum vermittelt (Abb. 35B). Allerdings scheint im Vergleich zum Kontroll-Protein

trotzdem ein gewisser Vorteil zu existieren, wenn auch nicht mit dem des mp75TNFR-Ig vergleichbar. Um die Bindung des micp75TNFR-Ig-Konstruktes an membranäres mTNF genauer zu untersuchen, wurden alle drei Fusionsproteine zusätzlich in der Durchflusszytometrie analysiert. Für den Fall, dass tatsächlich eine Bindung an das von den transduzierten L929-Zellen exprimierte memTNF erfolgt, sollte eine Färbung der Zellen auf humanes IgG und damit den Fc-Teil des Fusionsproteins positiv sein. Als Kontrolle für eventuell vorhandene unspezifische Bindungen, wurden Wildtyp-L929-Zellen in den Test mit einbezogen. Da diese als Maus-Fibroblasten kein TNF exprimieren, darf auch keine Bindung der Fusionsproteine an die Zellen nachweisbar sein.

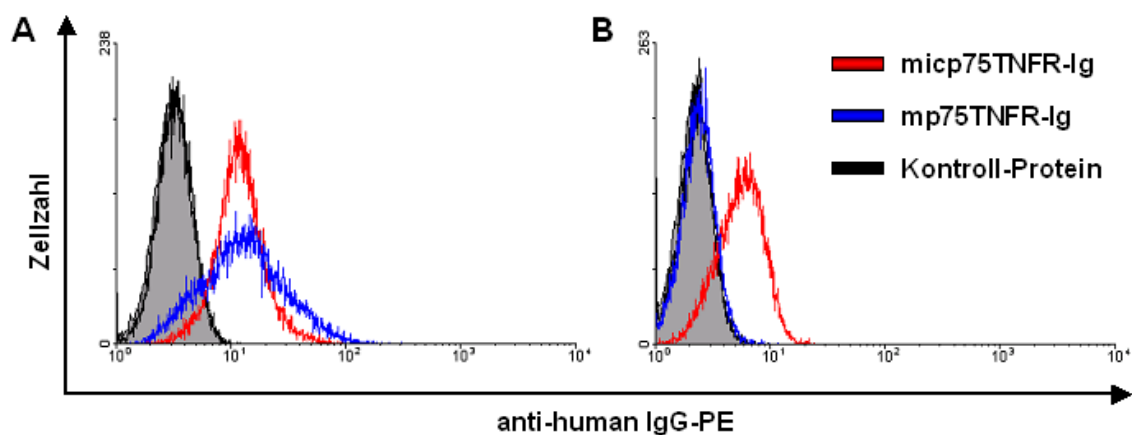


Abb. 36: Durchflusszytometrische Analyse der Fusionsproteine. Beide Fusionsproteine binden an mit memTNF transduzierte L929-Zellen (rote und blaue Kurve); das Kontroll-Protein (schwarze Kurve) weist keine Bindung auf (A). Allerdings bindet das micp75TNFR-Ig auch an Wildtyp-L929-Zellen und damit unspezifisch (B). Der graue gefüllte Peak ist jeweils die Autofluoreszenz von L929-Zellen.

Zwar bindet der micp75TNFR an L929-Zellen, die auf ihrer Zellmembran memTNF exprimieren (Abb. 36A, rote Kurve), allerdings erfolgt eine Bindung auch an Wildtyp-L929-Zellen (Abb. 36B, rote Kurve) und damit vermutlich unspezifisch. Auch für membranäres TNF scheint der micp75TNFR also seine Bindungsfähigkeit verloren zu haben.

Durch eine durchflusszytometrische Analyse diverser anderer Zelllinien unterschiedlicher Spezies nach Inkubation mit dem micp75TNFR-Ig-Fusionsprotein, sollte geklärt werden, ob die an Wildtyp-L929-Zellen beobachtete Bindung spezifisch für ein anderes Epitop speziell dieser Zelllinie ist, oder ob aus der Trunkierung des N-Terminus generell ein unspezifisches Anhaften des Proteins resultiert.

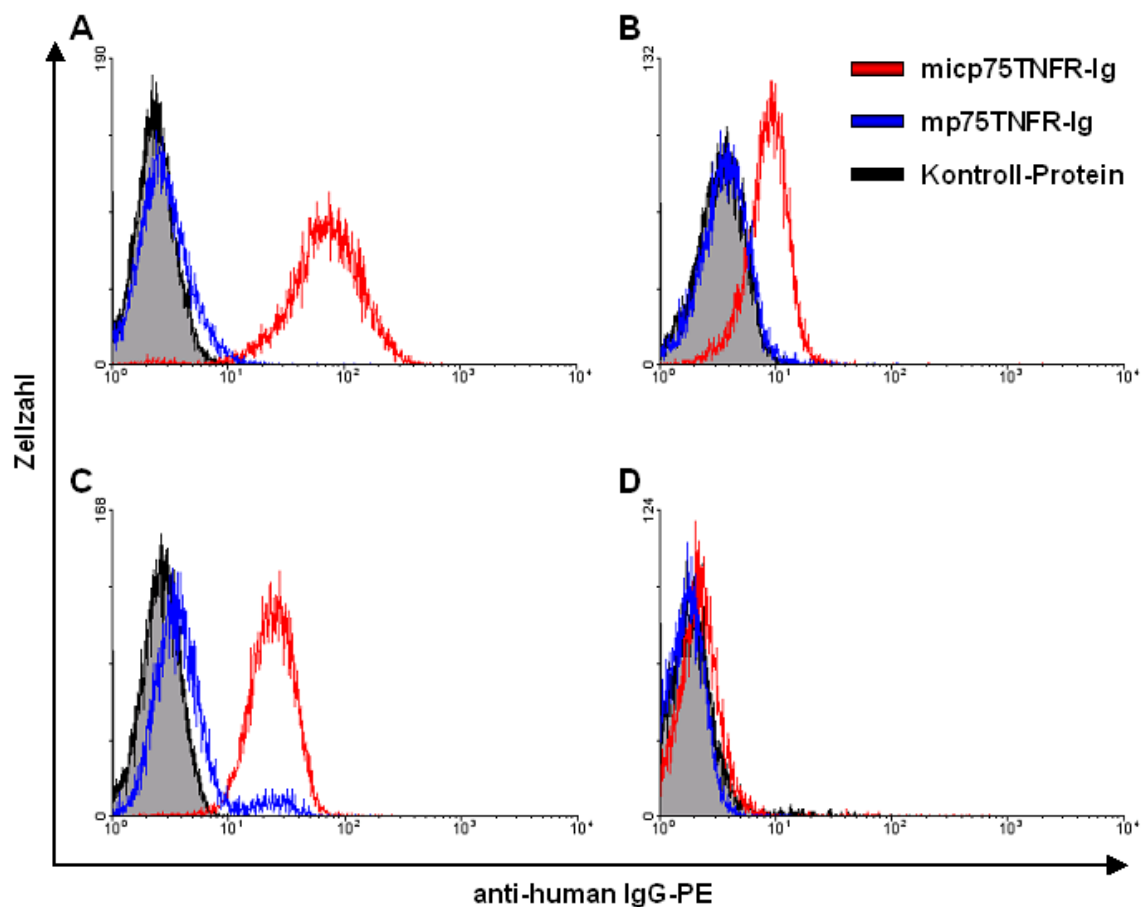


Abb. 37: Bindung der micp-/p75TNFR-Ig-Fusionsproteine an Zelllinien unterschiedlicher Spezies. Die Fusionsproteine wurden mit RAW 264.7- (A), HEK- (B), COS-7- (C) und CHO- (D) Zellen inkubiert und anschließend der Fc-Teil mit einem anti-human IgG Antikörper gefärbt. Die Extrazellulärdomäne des mp75TNFR bindet dabei in keiner der vier Fälle an eine der Zelllinien, wohingegen im Falle des micp75TNFR eine Bindung unabhängig von der Spezies der Zellen zu beobachten ist.

Für alle Zelllinien wurden jeweils 1×10^6 Zellen in 1 ml des jeweiligen Überstandes für 1 h bei 4°C auf einem Rotor inkubiert und die Zellen dann gewaschen, bevor der anti-human IgG PE Ak zugegeben wurde.

Da das micp75TNFR-Ig-Fusionsprotein nicht nur an die Maus-Zelllinie RAW 264.7 (Abb. 37A, rote Kurve) bindet, sondern auch an humane HEK-Zellen (Abb. 37B, rote Kurve) und die Primaten-Zelllinie COS-7 (Abb. 37C, rote Kurve), kann nicht von der spezifischen Bindung der micp75TNFR-Extrazellulärdomäne an ein bestimmtes Epitop auf L929- oder anderen Maus-Zelllinien ausgegangen werden.

D Diskussion

TNF vermittelt als pleiotropes, proinflammatorisches Zytokin eine Reihe unterschiedlichster Effekte in verschiedenen Zelltypen über die Aktivierung von zwei membranständigen Rezeptoren, dem p55TNFR (Typ I TNFR) und dem p75TNFR (Typ II TNFR). Dabei werden so gegensätzliche Effekte wie Induktion von Zelltod und Expression anti-apoptotischer Gene ausgelöst. Beide Rezeptoren sind und waren Gegenstand intensivster Forschung, wobei der p55TNFR sicher besser verstanden ist, weil er über eine so genannte Todesdomäne (death domain, DD) aktiv Zelltod auslösen kann und dadurch lange Zeit im Fokus der Wissenschaft stand.

Der p75TNFR dagegen ist weit weniger gut charakterisiert und anders als der p55TNFR nicht konstitutiv exprimiert, sondern auf Zellen des Immunsystems beschränkt und streng reguliert. Über Anlagerung zahlreicher Adapterproteine kann er, wie auch der p55TNFR, durch eine Aktivierung von NF- κ B anti-apoptotische Signale auslösen. Aber auch eine Verstärkung der durch p55TNFR ausgelösten Apoptose wird diskutiert, wofür unterschiedliche Mechanismen vorgeschlagen werden. Sogar eine direkte Induktion von Zelltod, die auf wenige, distinkte Zelltypen beschränkt zu sein scheint, wird beschrieben (Depuydt, 2005, Pimentel-Muinos, 1999). Aufgrund dieser komplexen Mechanistik und der bereits erwähnten starken Regulation des p75TNFR, erscheint die Existenz einer Isoform durchaus plausibel, zumal für zahlreiche Rezeptoren aus der TNFR-Superfamilie Spleiss-Varianten bekannt sind, die unter anderem zur Entstehung löslicher Varianten führen. Für den p75TNFR wurde so ein alternativ gespleisstes Protein erst kürzlich beschrieben (Lainez, 2004).

Für die in unserem Labor entdeckte intrazelluläre Isoform, es handelt sich hier im strengen Sinn nicht um eine alternative Spleissvariante, weil zwei distinkte Transkriptionsstartpunkte benutzt werden, spricht, dass sie zum einen parallel in zwei unterschiedlichen Spezies gefunden wurde (Human- und Maus-System) und zum anderen im Human-System eine interessante evolutive Entstehung vorweist (Singer, 2004), die einen auf dieser Isoform liegenden Selektionsdruck vermuten läßt. Da TNF und, in den letzten Jahren vermehrt, der p75TNFR immer mehr mit der Entstehung verschiedener Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wird, könnte die Erforschung einer solchen Isoform von entscheidender Bedeutung sein.

1. Nachweis des humanen icp75TNFR

1.1. Nachweis mittels RT-PCR

Nachdem sich der Nachweis des icp75TNFR im Human-System bereits nach der Entdeckung und Klonierung der Isoform als schwierig erwiesen hatte, wurde zunächst die RT-PCR Methodik in Hinblick auf ihre Sensitivität verbessert. Obwohl die Polymerase-Kettenreaktion bei weitem die sensitivste aller Methoden zum Nachweis von Nukleinsäuren ist, kann ihre Effizienz und damit die Nachweisgrenze durch Optimierung einzelner Schritte durchaus noch weiter verbessert werden. Weicht beispielsweise diese Effektivität der PCR um nur 5 % nach unten ab, resultiert dadurch nach 40 Zyklen eine um 275 % geringere Menge an PCR-Produkt (Ding, 2004).

Bei einer so schwach exprimierten RNA wie der des hicp75TNFR, ist neben der Effektivität der PCR aber auch die Qualität der cDNA entscheidend, weil der Verlust einzelner Transkripte bereits zu einem negativen Nachweis führen kann. Da oligo-dT Primer die cDNA-Synthese immer am äußersten 3' Ende der mRNA initiieren (Poly-A⁺-Schwanz), sich der 5' RT-PCR-Primer (vorwärts Primer) für den spezifischen Nachweis des hicp75TNFR aber im 5' gelegenen, alternativen Exon 1a befinden muss (s. Abb. 2), läuft man Gefahr, diesen entscheidenden Teil der mRNA-Sequenz im Umschreibeschritt zu verlieren. Durch Einführung eines in Exon 3 gelegenen, spezifischen Primers konnte zum einen sicher gestellt werden, dass bei der cDNA-Erststrang-Synthese Kopien entstehen, die das 5' Ende der mRNA erreichen und damit die Bindungsstelle für den 5' RT-PCR-Primer erhalten bleibt. Zum anderen kann mit einer genspezifischen Initiierung der cDNA-Synthese eine deutlich gesteigerte Effektivität gegenüber oligo-dT Primern erreicht werden. Lekanne Deprez et al. konnten anhand eines Vergleiches unterschiedlich gewonnener cDNAs in der quantitativen *Real Time* RT-PCR zeigen, dass das PCR-Produkt für GAPDH nach spezifischem Umschreiben 4,5 Zyklen früher einen festgelegten Schwellenwert überschreitet, als nach oligo-dT initiiert cDNA-Synthese und damit in deutlich höherem Ausmaß in der cDNA repräsentiert war (Lekanne Deprez, 2002).

Da mRNA an der Gesamtheit der isolierten RNA (mRNA, tRNA, rRNA) nur einen Anteil von ungefähr 1-5 % aufweist, wurde zusätzlich zur veränderten cDNA-Synthese eine Reinigung der mRNA vor dem Umschreiben eingeführt. Diese Maßnahme empfiehlt sich

vor allem für gering exprimierte Transkripte, die in einer komplexen Mischung verschiedenster RNA-Spezies sonst leicht verloren gehen können.

Trotz der ergriffenen Maßnahmen und zusätzlich neu gewählten Primern für die PCR, die in ihren Schmelzpunkten optimal aufeinander abgestimmt wurden, zeigte sich aber kein verbesserter Nachweis für den humanen icp75TNFR. Nach wie vor war eine Southern-Hybridisierung zur Detektion erforderlich (s. Abb. 4). Die *nested* PCR brachte zwar den Erfolg des direkten Nachweises auf dem Agarose-Gel, realistischere Weise muss aber immer mit einer Kreuz-Kontamination der einzelnen Proben gerechnet werden, da die PCR-tubes nach der ersten PCR-Runde noch einmal geöffnet werden müssen. Deshalb musste auch bei Durchführung einer 2. PCR-Runde auf die Verwendung einer Positivkontrolle (mRNA aus mit hicp75TNFR-cDNA transfizierten Zellen) verzichtet werden. Aber selbst die Etablierung der *nested* PCR führte nicht zwangsläufig in jedem Versuch zu einem positiven Resultat. Dies kann im Endeffekt nur mit einer so geringen Expression des hicp75TNFR erklärt werden, die dazu führt, dass zwar in manchen Fällen eine ausreichende Anzahl Kopien im verwendeten cDNA-Volumen enthalten war, in anderen Fällen aber nicht.

Nach der intensiven Untersuchung des alternativen Exon 1a und der Erkenntnis, dass es sich dabei um ein exonisiertes Alu-Element handelt, wurden die 5' Primer der RT-PCR und der *nested* PCR noch einmal auf ihre Homologie zu dieser repetitiven DNA-Einheit untersucht und festgestellt, dass diese in beiden Fällen äußerst hoch ist. Aus den „Primer-Wolken“ im Agarose-Gel, die nicht verbrauchte Moleküle repräsentieren, und der Abwesenheit von „Geisterbanden“, also PCR-Produkten falscher Größe, die durch unspezifisches Binden der Primer und folgende Amplifikation entstehen, kann aber geschlossen werden, dass für die eigentliche PCR-Reaktion genügend Primer-Moleküle zur Verfügung gestanden haben müssen. Selbst wenn ein gewisser Anteil der 5' Primer an andere in der cDNA enthaltenen Alu-Sequenzen bindet und damit abgefangen wird, so werden diese offensichtlich nicht amplifiziert, weshalb die Primer in einem Konzentrationsbereich gehalten werden, in dem sie nach wie vor in molarem Überschuss vorliegen.

1.2. Nachweis mittels *Ribonuclease Protection Assay*

Zwar ist wie bereits erwähnt die Polymerase-Kettenreaktion die sensitivste Methode zum Nachweis von Nukleinsäuren, zumal wenn sie mit einer Southern-Hybridisierung

gekoppelt ist, dennoch kann durch Fehler vor allem bei der Auswahl der Primer und des PCR-Programmes ein positiver Nachweis ausbleiben. Daher wurde nach erfolglosen Optimierungsversuchen der RT-PCR ein *Ribonuclease Protection Assay* entwickelt. Ein Vorteil gegenüber der PCR Reaktion ist die Möglichkeit zum Einsatz sehr großer RNA-Mengen, da die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde nicht wie beim Northern Blot auf einer Membran erfolgt, sondern in einer flüssigen Matrix stattfindet. Damit kann die eingesetzte Menge an RNA bis auf 100 µg erhöht werden. Zum anderen wird die mRNA direkt, ohne vorheriges Umschreiben in cDNA, nachgewiesen. Die Gefahr der cDNA-Synthese, obwohl bereits für die RT-PCR optimiert, liegt immer in eventuell vorhandenen Sekundärstrukturen der RNA, die von der Reversen Transkriptase (RT) nicht aufgelöst werden können und damit zwangsläufig zum Abbruch des synthetisierten Stranges führen. Bereits drei G-C Basenpaare reichen für eine Schlaufe von 4, 5 oder 6 Nukleotiden aus. Bei A-U Basenpaaren werden zwar mehrere zum Ausbilden einer solchen Schlaufe gebraucht, dennoch liegt ungefähr die Hälfte einer durchschnittlichen mRNA mit gepaarten Nukleotiden vor (Onoa, 2004). Die Reverse Transkriptase des *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV-RT), die für die cDNA-Synthese verwendet wurde, besitzt zwar eine relativ niedrige Fehler-Rate, sie arbeitet aber bei Temperaturen über 42° C nicht mehr effektiv. Bei dieser Temperatur ist sie aber andererseits kaum in der Lage, signifikante Sekundärstrukturen aufzuschmelzen. Höhere Temperaturen bergen dagegen immer das Risiko einer Metallionen-induzierten Hydrolyse der RNA, so dass die cDNA-Synthese immer einen Kompromiss darstellt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der MMLV-RT, mit der gerade seltene mRNAs umgeschrieben werden, signifikant und zwar um mehr als das Dreifache geringer ist, als bei moderat oder häufig exprimierten *templates* (Bustin, 2004). Damit könnten gerade durch die cDNA-Synthese die wenigen Transkripte an *hicp75TNFR* noch weiter dezimiert werden.

Leider konnte mit Hilfe des RPA und damit dem direkten Nachweis der mRNA aber kein Erfolg erzielt werden. Auch hier muss nachträglich wieder die Alu-Problematik beachtet werden. Da die Sonde wieder das spezifische, alternative Exon 1a umfassen muss, anders als die relativ kurzen PCR-Primer aber einen Sequenzbereich von wenigstens 70 Basen abdeckt, kann eine hohe Übereinstimmung mit der Alu-Sequenz nicht verhindert werden. Die Einzelstrang-spezifischen RNasen verdauen aber bereits bei einem *mismatch* von einem einzigen Basenpaar. In der Folge werden also, egal mit welcher Sonde, immer

Fragmente auf dem Autoradiogramm erscheinen, die durch die Alu-Sequenz verursacht sind. Zwar sollten sie deutlich kleiner sein als das Fragment, welches aus der Sonde und dem Transkript des *hicp75TNFR* entsteht, trotzdem bleibt die Gefahr einer Verwechslung bestehen, da Polyacrylamid-Gele wie das im Versuch verwendete, erst Größenunterschiede von ungefähr 20 Nukleotiden auflösen können. Somit kann der RPA für den Nachweis des *hicp75TNFR* nicht als optimale Methode gewertet werden.

Der entscheidende Punkt des Misserfolges ist aber wohl die deutlich geringere Sensitivität des RPA im Vergleich zur PCR, die selbst durch den Einsatz relativ hoher RNA-Mengen nicht wieder kompensiert werden kann. Direkte Vergleiche der beiden Methoden weisen für die RT-PCR eine Nachweisgrenze von ca. 10-100 Kopien aus, während für den RPA ca. 100 000 Kopien benötigt werden (Rottman, 2002).

1.3. Nachweis mittels quantitativer *Real Time* RT-PCR

Nachdem also eine Amplifikation für den Nachweis des *hicp75TNFR* erforderlich ist und Assays für die quantitative *Real Time* RT-PCR ohnehin unabhängig von den Bedingungen der herkömmlichen RT-PCR neu etabliert werden müssen, sollte schließlich die Möglichkeit des Nachweises in der quantitativen *Real Time* RT-PCR ausgeschöpft werden. Dazu wurden zwei Sets an Primern und TaqMan-Sonden entwickelt, diesmal unter Berücksichtigung der Homologie zwischen Alu- und Exon 1a-Sequenz.

Die Verwendung einer TaqMan-Sonde und damit eines dritten genspezifischen Primers erhöht die Sensitivität gegenüber dem Einbau von SYBR-Green, bei dem nur die Interkalation eines fluoreszierenden Farbstoffes in doppelsträngige DNA gemessen wird, deutlich und ersetzt zudem die nach der herkömmlichen RT-PCR durchgeführte Southern-Hybridisierung. Damit verbunden ist allerdings der Wechsel von einer radioaktiven hin zu einer fluoreszenz-basierten Detektion. Radioaktive, vor allem mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dNTP markierte Oligonukleotide erreichen höchste Sensitivität und erlauben den Nachweis von bis zu 10 fg der Ziel-DNA. Auch die Verbesserung der Filmemulsionen sowie die Verwendung von Verstärkerfolien (*intensifying screens*), die den Teil der emittierten β -Strahlung, der den Röntgenfilm ohne Anregung von Kristallen passiert, zunächst absorbieren, dann in Form von Licht wieder abgeben und so das Signal verstärken, haben diese Sensitivität in den letzten Jahren nochmals weiter verbessert (Osborn, 2000). Dies gilt aber ebenso für Fluoreszenz-basierte Systeme, denen in vielen

Übersichtsartikel eine ähnliche oder gleichwertige Sensitivität bescheinigt wird, wenn sie innerhalb der gleichen Methode (z.B. Southern-Hybridisierung) verglichen werden (Chevrier, 1993, Sambrook, 2001, Viale, 1992). In einer Arbeit von Ryschkewitsch et al. wurde ein direkter Vergleich zwischen einer RT-PCR/Southern-Hybridisierung und einer auf TaqMan-Sonden basierenden quantitativen *Real Time* RT-PCR vorgenommen und dabei eine äquivalente Sensitivität beider Methoden festgestellt, bei einem Detektionslimit von jeweils 10 Kopien (Ryschkewitsch, 2004). Bei Kopienzahlen unter 10 konnte die *Real Time* PCR Methode zwar zum Teil keinen Nachweis mehr erbringen, wohingegen auf dem Autoradiogramm des Southern Blots eine schwache Bande detektierbar war. Im vorliegenden Fall werden aber die verschiedenen Primer sowie das unterschiedliche Protokoll als mögliche Ursache genannt. Somit kann also nicht von vornherein von einer Unterlegenheit der *Real Time* PCR *in puncto* Sensitivität ausgegangen werden.

Beide entwickelten Assays wurden getestet und erkannten die mitgeführte Positivkontrolle, eine aus hicp75TNFR-transfizierten Zellen gewonnene cDNA. Wie bereits angedeutet ergaben sich aber mit dem nicht cDNA-spezifischen Assay (s. Abb. 7; Assay 1) erhebliche Probleme hinsichtlich des Nachweises von genomischer DNA. Die Gruppe um S. A. Bustin konnte zeigen, dass nach RNA-Isolierung mit dem RNeasy Kit von Qiagen, der auch für die auf hicp75TNFR zu untersuchenden Proben für die quantitative *Real Time* RT-PCR verwendet wurde und von dem die Firma behauptet, er erlaube die Gewinnung praktisch DNA-freier Präparationen, 20-50 % der isolierten Nukleinsäuren aus genomischer DNA bestehen (Bustin, 2002). So erklärt sich auch der deutlich positive Nachweis des hicp75TNFR in nicht DNase-verdauten Proben, der durch eine cDNA-Synthese ohne Reverse Transkriptase (minus-RT-Kontrolle) unverändert hoch blieb. Demnach ist eine DNase-Behandlung vor Anwendung eines nicht cDNA-spezifischen Assays unabdingbar, birgt aber durch die zusätzlichen Schritte wieder die Gefahr der RNA-Degradierung. Ausserdem muss die völlige Inaktivierung der DNase vor der RT-PCR sicher gestellt werden, da sonst das in der Reaktion entstehende PCR-Produkt sofort wieder durch das verbliebene Enzym verdaut würde. Darüber hinaus riskiert man bei niedrig konzentrierten Proben, die nicht ohne weiteres neu gewonnen werden können, immer den Verlust wertvollen Materials. Nachdem der cDNA-spezifische Assay 2 die Positivkontrolle ebenso gut erkannte wie Assay 1 wurde in der Folge praktisch ausschließlich mit ersterem gearbeitet.

Trotz zahlreicher untersuchter Proben blieb aber ein positiver Nachweis in der quantitativen *Real Time* RT-PCR aus. Eine Untersuchung der Primer- und Sonden-Sequenz auf bekannte *Single Nukleotide Polymorphisms* (SNPs) lieferte keine dieser Mutationen im Bereich der Bindungsstellen. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass zwar die Positivkontrolle erkannt wird, der Assay aber für endogenen hicp75TNFR nicht funktionsfähig ist.

Nachdem sich auch in der quantitativen RT-PCR so enorme Schwierigkeiten beim Nachweis ergeben hatten, wurde zur Sicherheit noch ein dritter Assay entworfen, der in der Lage der Primer vollständig mit Assay 2 übereinstimmt, bei dem die Sonde aber nicht über der Exon-Grenze (Exon 1a/ Exon 2) liegt, sondern sich komplett in Exon 2 befindet. Die negativen Ergebnisse in der *Real Time* RT-PCR blieben aber unverändert.

Da für die Normalisierung der hicp75TNFR-Transkriptmenge ribosomale 18S RNA als Referenz-Gen verwendet werden sollte, musste die cDNA-Synthese von einer spezifischen auf eine durch *random*-Hexamere initiierte Reaktion umgestellt werden. Dadurch sollte aber die Qualität der cDNA, auch im Hinblick auf die enthaltenen 5' Enden unverändert hoch sein.

2. Funktioneller *knock down* des hicp75TNFR mittels RNAi

Das spezifische Ausschalten bestimmter zellulärer Strukturen und die Beobachtung eines eventuell damit verbundenen Phänotyps, ist in vielen Fällen ein wichtiger Schritt in der Charakterisierung von neu entdeckten Proteinen und trägt oftmals zur Zuweisung distinkter Funktionen bei. Dies hätte auch beim hicp75TNFR den entscheidenden Hinweis auf seine biologische Relevanz erbringen können, weshalb gerade dieser funktionelle *knock down* des Rezeptors als essenziell wichtiges Experiment gewertet werden konnte.

Bereits seit über 30 Jahren ist bekannt, dass lange doppelsträngige RNA (dsRNA) in Säugerzellen das angeborene Immunsystem stimuliert und unter anderem antivirale, Interferon-abhängige Mechanismen auslöst (Hannon, 2004). In der Folge kommt es zur Aktivierung dsRNA-abhängiger Proteinkinasen (PKR), die eine Sequenz-unabhängige Zerstörung von RNAs und damit verbunden eine generalisierte Suppression von Proteinbiosynthese auslösen (Williams, 1997). Nachdem man heraus gefunden hatte, dass dsRNAs aber auch eine genspezifische Antwort auslösen können (Hannon, 2002), wurde

versucht, die Immunantwort weg von dem unspezifischen Abwehrmechanismus hin zur spezifischen RNA-Interferenz (RNAi) zu verschieben. Als sich dsRNAs als häufig nicht sehr effektiv in dieser Hinsicht erwiesen und ab einer Länge von ca. 30 bp eben zwangsläufig den antiviralen Interferon-*pathway* induzieren (Elbashir, 2001), kamen die sogenannten *short interfering* RNAs (siRNAs) zum Einsatz, die im Hinblick auf die spezifische mRNA Degradierung wesentlich potenter sind. Mit der Entschlüsselung des intrazellulären Mechanismus, der der RNA-Interferenz zu Grunde liegt, hatte sich herausgestellt, dass längere Stücke an doppelsträngiger RNA im Cytoplasma von der zur RNase III-Familie gehörenden Nuklease Dicer, ohnehin in kleinere Stücke von ungefähr 22 Nukleotiden prozessiert werden. Diese eben als siRNAs bezeichneten Stücke werden wiederum in den RNA-induzierten *silencing*-Komplex RISC aufgenommen, wodurch komplementäre mRNA erkannt und daraufhin degradiert wird (Hammond, 2000, Zamore, 2000). In den meisten Organismen gibt es auch endogene Strukturen, die die RNAi-Kaskade auslösen können. Es handelt sich um sogenannte microRNAs (miRNAs), die im Nukleus ausgehend von nicht kodierenden RNAs zunächst als lange Primärtranskripte entstehen (pre-miRNAs) und sich auf Grund ihrer Struktur an manchen Stellen zu einer meist nicht ganz perfekt gepaarten Haarnadelschleife (*hairpin loop*) falten. Diese *loop*-Strukturen werden noch im Kern von einer weiteren zur RNase III-Familie gehörenden Nuklease namens Drosha von der restlichen Sequenz abgeschnitten und ins Cytoplasma ausgeschleust, wo sie als doppelsträngige RNAs wieder erst von Dicer geschnitten und dann in den RISC-Komplex aufgenommen werden (Lund, 2004). Eben diesen endogenen Mechanismus, der bei Pflanzen genauso zu finden ist wie in tierischen Organismen, nahmen sich gleich mehrere Wissenschaftler zum Vorbild, um ausgehend von Vektoren, die einen RNA-Polymerase II oder III Promotor enthalten, direkt in der Zelle solche Haarnadelstrukturen, *short hairpin* RNAs (shRNAs), zu synthetisieren (Brummelkamp, 2002, Paddison, 2004, Robinson, 2003, Zeng, 2002). Dabei ist die Art des Vektors relativ frei wählbar und so kann durch die Verwendung proviraler Vektoren die entsprechende shRNA bzw. deren Vorstufe auch über retro- oder sogar lentiviralen Gentransfer in die Zielzellen gebracht werden. Dies ist besonders wichtig, wenn es sich dabei um Primärzellen handelt, die mit herkömmlichen Transfektionsmethoden nicht transfizierbar sind und damit auch keine chemisch synthetisierten siRNAs aufnehmen würden. Um die Option des viralen Gentransfers offen zu halten, vor allem im Hinblick auf die Untersuchung von primären Monozyten bzw. Makrophagen, die der Hypothese zu Folge

Hauptträger des icp75TNFR sein könnten, wurde in der vorliegenden Arbeit diese Vektor-gestützte shRNA-Methode verwendet. Allerdings zunächst nicht mit einem proviralen Vektor, sondern mit einem neu klonierten, auf dem pSUPER-Vektor basierenden Plasmid, über das die Selektion transfizierter Zellen ermöglicht wurde (s. Abb. 9).

Weit wichtiger als das Plasmid selbst ist aber die Auswahl einer geeigneten, zur Ziel-mRNA komplementären Sequenz, die die gezielte RNA-Interferenz auslöst und im Falle der pSUPER-basierten Methode 19 Basenpaare umfassen muss. Idealerweise sollte sie ca. 100 bp in 3' Richtung vom Startpunkt der Transkription entfernt sein. Um eine Diskriminierung gegenüber dem hp75TNFR zu erzielen, blieb für die Wahl des 19 bp-Oligonukleotides auch hier wieder ausschließlich Exon 1a, welches aber nur aus 81 bp besteht. Damit konnte diese Regel im Falle des hicp75TNFR nicht eingehalten werden. Darüber hinaus mußte zusätzlich eine möglichst gute Abgrenzung zum Alu-Element erreicht werden, weshalb der Bereich, der um die 7 bp Deletion liegt, gewählt wurde, denn Unterschiede in nur einzelnen Nukleotiden reichen für eine möglichst hohe Spezifität der resultierenden shRNA nicht aus. Weil die 19 bp-umfassende Sequenz in der mRNA am 5' Ende von zwei Adeninen flankiert werden muss, blieben für ihre Auswahl praktisch kaum alternative Möglichkeiten. Die Bedingung zweier flankierender Thymidine am 3' Ende, die zwar weit weniger entscheidend ist, als die flankierenden Adenine, aber einen besseren Erfolg des gewählten Oligonukleotides gewährleisten, konnte durch die vorgegebenen Einschränkungen nicht erfüllt werden. Des weiteren muss darauf geachtet werden, dass die Sequenz keine vier aufeinander folgenden Adenine oder Thymidine aufweist, weil dies zu einer vorzeitigen Termination des Transkriptes und damit der shRNA führen würde.

Eventuell war die zwangsläufige Missachtung einiger der vorgegebenen Regeln schon ausschlaggebend für den Misserfolg der konstruierten shRNA.

Da die Menge an siRNAs, die es braucht, um eine Reduktion des mRNA-Niveaus auf 50 % zu erreichen, mit 500 pM relativ niedrig angegeben wird und die L929-Zellen stabil mit dem pSUPERneu Vektoren transfiziert wurden, scheint eine zu geringe intrazelluläre Konzentration an shRNA als Ursache kaum wahrscheinlich.

Hinsichtlich der RNA-Polymerase Promotoren gibt es mittlerweile eine Tendenz hin zur Verwendung des RNA Polymerase III U6 Promotors, für den in pSUPER verwendeten H1 Promotor zeigte sich aber in parallel durchgeführten Experimenten eine gleichwertige

Effizienz (Paddison, 2004). Auch die Verwendung eines anderen Promotors hätte also am Ergebnis der durchgeführten RNA-Interferenz nichts geändert.

Vergleichende Studien mit shRNAs unterschiedlicher Länge (19 vs. 29 bp) weisen der längeren Variante einen deutlich größeren Erfolg zu. Da aber auch hier dieselben Einschränkungen bei der Sequenz-Auswahl gelten, ist es mehr als fraglich, ob auf diese Weise ein Erfolg im Falle des *hicp75TNFR* hätte erzielt werden können (Mittal, 2004).

Durch immer genauere Einblicke in die Mechanistik der RNA-Interferenz kristallisiert sich heraus, dass die Aufnahme des richtigen, also des in *antisense* zur Ziel-mRNA orientierten, Stranges der shRNA in den RISC-Komplex, einen zentralen Punkt darstellt. Nur so kann spezifisch die Ziel-mRNA komplementär an den RISC-Komplex gebunden und damit degradiert werden. Durch Verwendung verschiedenster siRNAs und strukturellem Vergleich derjenigen, die besonders potent ihr jeweiliges *target* erkannten und damit ausschalteten, fand man heraus, dass immer der Strang der shRNA ausgewählt wird, dessen 5' Ende thermodynamisch instabiler, also weniger stark an seinen Gegenstrang gepaart ist (Schwarz, 2003). Auf diese Weise lässt sich relativ gut die Aufnahme des *antisense*-Stranges in den RISC-Komplex und damit der Erfolg der ausgewählten Sequenz steuern. Diese funktionelle Asymmetrie der beiden RNA-Stränge (*sense* und *antisense*) findet man auch bei den endogenen miRNAs wieder, weshalb sie auch auf das Design von shRNAs anwendbar ist. Im Falle des spezifischen Konstruktes für den *hicp75TNFR* ist das 5' Ende des *antisense* Stranges über G/C an den Gegenstrang gepaart, das 5' Ende des *sense* Stranges dagegen über A/T, wodurch diese Bindung deutlich thermodynamisch instabiler ist. Dies würde aber in einer Präferenz des *sense* Stranges resultieren und könnte damit den Misserfolg des ausgewählten Oligonukleotides weiter begründen.

In Bezug auf den GC-Gehalt der Sequenz, für den zum Teil < 50 % gefordert wird, und die Entfernung vom Startkodon, die laut anderer Publikationen mehr als 75 Nukleotide betragen soll und damit geringer angegeben ist, als bei der pSUPER-Methode, gibt es noch weitere abweichende Auffassungen (Mittal, 2004), die aber, zumindest was die Entfernung vom ATG betrifft, beim *hicp75TNFR* nicht eingehalten werden können, will man die spezifische Unterscheidung von der Alu-Sequenz nicht aufgeben.

Da zusätzlich der Nachweis des endogenen Transkriptes ohnehin nicht stabil gelungen war, wurde die Strategie der RNA-Interferenz nicht weiter verfolgt.

3. Die Rolle von Alu-Elementen in der Entstehung neuer Gene

Alu-Elemente gehören mit einer geschätzten Kopienzahl von 500 000 bis 1 Million zu den am häufigst vorkommenden repetitiven DNA Einheiten des menschlichen Genoms und repräsentieren ca. 10 % der humanen nukleären DNA (Batzer, 1990). Sie weisen immer eine Länge von ca. 300 Basenpaaren auf und zählen damit zu den sogenannten *short interspersed repeats* (SINE). Auf Grund des großen Erfolges mit dem sich Alu-Elemente über die Jahrmlionen im Genom von Primaten durch einen als Retrotransposition bezeichneten Mechanismus kopiert und verankert haben, herrscht eine angeregte Diskussion darüber, ob es sich bei Alu-SINEs um eine intrazelluläre Plage handelt, der sich der Organismus nicht erwehren kann, oder ob sie wegen ihrer gelegentlich positiven Effekte auf die Evolution toleriert werden (Batzer, 2002). Tatsache ist, dass Alu-Elemente zwar vermehrt in genreichen Strukturen zu finden sind, dort aber seltener in Protein-kodierenden Bereichen, sondern vor allem zwischen einzelnen Genen, in Introns und in 5' sowie 3' untranslatierten Regionen (Bailey, 1993). Diese Unterrepräsentation in Protein-kodierenden Exonen ist sehr wahrscheinlich die Folge eines starken Selektionsdruckes, da eine Veränderung bzw. Zerstörung wichtiger Proteine einen klareren evolutiven Nachteil mit sich bringen würde. Dennoch berichtet eine 2001 durchgeführte Studie, dass sich in 4 % aller humaner Gene repetitive Einheiten in den Protein-kodierenden Bereichen befinden und dass ein Drittel davon Alu-Elemente sind (Nekrutenko, 2001). Unter der Annahme von ca. 30 000 Genen im humanen Genom sollten also rund 400 von ihnen Alu-Elemente in den Protein-kodierenden Bereichen enthalten (Sorek, 2002). Diese Insertionen zeichnen dann auch in einigen Fällen für genetisch bedingte Erkrankungen, wie beispielsweise dem Alport Syndrom, bei dem ein für Kollagen Typ IV kodierendes Gen betroffen ist (Knebelmann, 1995), oder der Zerstörung des richtigen Leserasters von Faktor IX, die mit Hämophilie B assoziiert ist (Vidaud, 1993), verantwortlich. Es gibt aber auch seltene Berichte in denen Alu-Elemente tatsächlich positive Funktionen übernommen bzw. bestehende Funktionen ergänzt haben. Nur die alternative Spleissvariante des Bcl-*rambo* β Proteins, die ein zum Teil aus Alu-Sequenz bestehendes Exon beinhaltet, vermittelt zum Beispiel Etoposid- und Taxol-induzierten Zelltod (Yi, 2003). Auch für den humanen *decay-acceleration* Faktor (DAF) ist eine alternative Spleissvariante beschrieben, die ein Alu-SINE enthält, und sich vom herkömmlichen DAF durch einen hydrophilen C-Terminus unterscheidet. Dadurch wird

die Migration des Faktors in die Zellmembran verhindert und es kommt auf diese Weise zu einer anderen Lokalisierung des Proteins (Caras, 1987). Entscheidend für alle diese Fälle, in denen sich Alu-enthaltende Exone entweder als indifferent oder sogar als vorteilhaft zeigen, scheint die Tatsache zu sein, dass es sich stets um alternativ verwendete Exone handelt und somit das ursprüngliche Protein erhalten bleibt. In der Tat konnten Rotem Sorek und Kollegen zeigen, dass sich mehr als 5 % aller alternativ gespleisster Exone von Alu-Elementen ableiten und dass die meisten, wenn nicht alle Alu-enthaltenden Exone eben alternativ gespleisst werden (Sorek, 2002). Zudem konnten sie für die meisten der Alu-Spleissvarianten zeigen, dass sie nur in ca. einem Fünftel aller mRNA-Transkripte eines Gens zu finden sind und damit eher moderat bis sehr schwach exprimiert werden. Es muss also auch hier ein hoher Selektionsdruck existieren, der verhindert, dass ein alternatives, Alu-enthaltendes Exon in ein konstitutives umgewandelt wird und dadurch die herkömmliche und funktionelle Variante des Proteins zerstört. Für die Umwandlung eines stillen oder alternativ gespleissten Alu-Elementes in ein konstitutives bedarf es aber in vielen Fällen nur einer einzigen Punktmutation. Beim bereits erwähnten Alport Syndrom führte beispielweise eine Punktmutation in Intron 5 des COL4A3-Gens dazu, dass ein bis dato stilles Alu-Element konstitutiv gespleisst wird und damit die entsprechende Erkrankung auslöst. Gerade das relativ häufige Auftreten von Punktmutationen und damit die potentielle Entstehung neuer Spleiss-sites kann den Umfang der Alu-Exonisierungen gut erklären. Den Daten von Sorek und Kollegen zufolge sind es dann auch Alu-Elemente der Subfamilie J und damit der ältesten aller fünf Subfamilien, die durch Anhäufung von Mutationen nur noch zu 86 % mit ihrer Ursprungssequenz übereinstimmen und verglichen mit ihrer Verteilung im Genom übermäßig oft exonisiert wurden. Damit könnte die Häufigkeit, mit der gerade ältere Alu-Sequenzen in Exonen auftauchen, darin begründet sein, dass im Laufe der Zeit eben die erforderlichen Substitutionen haben statt finden können.

In Bezug auf die Bedeutung des humanen icp75TNFR kann nur spekuliert werden. Die von Silke Singer beschriebenen schrittweisen Mutationen, die zur Exonisierung des Alu-Elementes geführt haben, können leicht einen gerichteten Prozess vermuten lassen (Singer, 2004). Die Literatur über Alu-enthaltende Exone legt aber auch den Schluss nahe, dass solche Exone toleriert werden, solange die herkömmliche Variante des Proteins, in unserem Fall der p75TNFR, unbeeinflusst bleibt. Da das dem hicp75TNFR zugrunde liegende Alu-Element der Familie Jo zugerechnet wird, zeigen sich auch hier

zahlreiche Mutationen und Deletionen gegenüber der Konsensus-Sequenz, die durchaus auch zufällig in der Form entstanden sein können. Die reduzierte Häufigkeit mit der die Alu-Varianten in der Gesamtmenge der Transkripte repräsentiert sind, zeigt sich im Falle des hicp75TNFR besonders deutlich. Hinzu kommt, dass es sich in diesem Fall ja nicht unbedingt um alternative Spleissvarianten handelt, denn für den hicp75TNFR muss in jedem Falle Transkriptionsstart II (TS II) verwendet werden, wohingegen für den hp75TNFR auch Transkriptionsstart I (TS I) genutzt werden kann und wird. Die Transkriptmenge für hicp75TNFR hängt also primär gar nicht vom Vorgang des Spleissens, sondern vielmehr von der Verwendung des entsprechenden Transkriptionsstartpunktes ab. Möglich ist daher natürlich auch, dass das Szenario, in dem die Zelle von TS I auf TS II umschaltet, von uns nicht erfasst wurde. So ist für den *insulin-like growth* Faktor I (IGF-I) in der Maus bekannt, dass zwei unterschiedliche Promotoren existieren, von denen einer die Verwendung von Exon 1 und der andere die von Exon 2 initiiert, die beide für unterschiedliche Leader-Sequenzen kodieren und der mRNA verschiedene 5' UTRs anfügen. Die Spezifität mit der solche Varianten in den diversen Zellen vorkommen können, zeigt sich in diesem Beispiel darin, dass in Makrophagen ausschließlich eines der beiden möglichen Transkripte, nämlich dasjenige, welches Exon 1 enthält, zu finden ist (Adamo, 1991, Arkins, 1993). So kann eine sehr spezifische Regulierung durch die Wahl der experimentellen Vorgehensweise auch im Verborgenen bleiben.

Als biologische Relevanz des hicp75TNFR bleibt die Möglichkeit eines intrazellulären Speichers an funktionellem p75TNFR, in dem präformiertes Rezeptorprotein in Form des icp75TNFR von der Membran zurückgehalten und damit proteolytischen Prozessen (Rezeptor-*shedding*) entzogen wird. Dies wurde bereits von Christoph Scherübl in seiner Dissertation zur Charakterisierung des humanen icp75TNFR diskutiert (Scherübl, 2004) und scheint durchaus plausibel, da durch verschiedene Stimuli die Zellmembran vorübergehend an TNF-Rezeptoren verarmt und durch ein intrazelluläres Depot der Grundzustand schneller wieder hergestellt werden könnte. Ein ähnlicher Mechanismus ist für den p55TNFR bekannt (Wang, 2003).

Alle diese möglichen Funktionen setzen aber die Expression deutlicher Proteinmenge an hicp75TNFR voraus, was mit der gemessenen Transkriptmenge kaum in Einklang zu bringen ist.

In letzter Konsequenz wird sich eine neue, für den icp75TNFR spezifische Funktion, vielleicht erst in den nächsten Jahrillionen der Evolution manifestieren.

4. Nachweis des icp75TNFR in der Maus

Nachdem der Zugriff auf Informationen des murinen und humanen Genoms in immer größerem Umfang möglich ist, zeigen Sequenzvergleiche, dass wohl fast 99 % der Gene in der Maus Homologien zum Menschen aufweisen und umgekehrt (Waterston, 2002). Circa 74 % der konstitutiv und 61 % der alternativ gespleissten Gene sind einer anderen Studie zufolge in der Maus konserviert (Thanaraj, 2003). Mihaela Zavolan und Kollegen fanden schließlich heraus, dass interessanterweise bei rund der Hälfte aller in ihrer Studie untersuchten Spleissvarianten der Maus alternative Transkriptionsstart- bzw. -endpunkte zur alternativen Verwendung von initialen bzw. terminalen Exonen und damit zur Entstehung neuer Proteinvarianten führen (Zavolan, 2003). All das bestätigt sich am Beispiel des icp75TNFR, der speziesübergreifend im humanen und im Maus-System gefunden wurde, und unterstreicht noch einmal die Wahrscheinlichkeit einer wichtigen biologischen Funktion.

Da für den icp75TNFR sowohl die Möglichkeit einer parallel zum p75TNFR verlaufenden, als auch einer gegenläufigen Regulation besteht, wurden in der quantitativen *Real Time* RT-PCR beide Isoformen untersucht. Nachdem sich mittlerweile ganz klar herausgestellt hat, dass die klassischen *housekeeping*-Gene β -Actin und GAPDH unter verschiedensten Bedingungen signifikant reguliert werden (Bustin, 2002), wurde ribosomale 18S RNA (18S rRNA) als Referenzgen für die Quantifizierung verwendet, für die bis dato weder eine regulierte Expression noch interindividuelle Schwankungen berichtet wurden. Da ribosomale RNA nicht über einen Poly-A⁺-Schwanz verfügt, muss die cDNA-Synthese mit *random*-Hexameren initiiert werden. Da diese an mehreren Stellen eines Transkriptes die Reverse Transkription anstoßen, entsteht pro RNA-Molekül in der Regel mehr als nur ein cDNA-Transkript, weshalb diese Methode zu den höchsten cDNA-Ausbeuten führt. Ein Verlust schwach exprimierter mRNAs muss also nicht befürchtet werden.

Der Nachweis des icp75TNFR in der Maus gelang vergleichsweise leichter und stabiler in der herkömmlichen RT-PCR, blieb allerdings zunächst auf die monozytären Tumorzelllinien RAW 264.7 und PU5-1.8 beschränkt. Dabei darf nicht außer Acht gelassen

werden, dass zumindest für PU5-1.8 im Endeffekt 20 µl cDNA pro 50 µl PCR Reaktion eingesetzt werden mussten, was umgerechnet der Verwendung von cDNA aus ca. 200 000 Zellen entspricht. Bei einer Detektion an der Nachweisgrenze, die bei der RT-PCR/Southern-Methodik bei 5-10 Kopien je Reaktion liegt, bedeutet dies trotz des positiven Nachweises eine extrem geringe Expression des *micp75TNFR* in der entsprechenden Zelllinie. Hierin könnte auch die vergleichsweise schlechtere Sensitivität der TaqMan-PCR begründet sein, bei der mit einem Gesamtvolumen der PCR-Reaktion von 20 µl bei weitem nicht die in der herkömmlichen RT-PCR eingesetzten cDNA-Mengen verwendet wurden. Die hohe Empfindlichkeit der RT-PCR-/Southern-Methode bestätigt sich auch noch einmal in der Tatsache, dass ein Transkript nachgewiesen werden konnte, das sowohl Exon 1, als auch die alternative 5' UTR noch enthielt, bei dem es sich also auf Grund des noch unvollständigen Spleissvorganges um eine Kernverunreinigung handeln muss.

Anhand des Nachweises von *micp75TNFR*-mRNA lässt sich trotz vorhandener Sensitivität, einzelne Transkripte zu detektieren, sehr gut verdeutlichen, dass die quantitative *Real Time* RT-PCR, wie wohl auch vergleichbare Methoden, an der Nachweisgrenze keine quantitativen Ergebnisse mehr liefern kann (Bustin, 2004). Beim Vergleich der Triplikate einer PCR-Reaktion zeigen sich massive Schwankungen der gemessenen Ct-Werte, die teilweise für ein und dieselbe cDNA eine Regulation um das 8-fache ergeben. Diese Beobachtung lässt sich mit dem sogenannten „Monte Carlo“ Effekt erklären, der die Limitierung der PCR-Amplifikation beschreibt, *templates* die über einen gewissen Grenzwert hinaus verdünnt vorliegen, in der richtigen Menge im Endprodukt zu repräsentieren. Dieses Phänomen gründet sich in der Tatsache, dass für jedes Transkript eine gewisse Wahrscheinlichkeit besteht, mit der es amplifiziert wird oder in der Reaktion verloren geht. Treten dadurch verursachte Unterschiede der Amplifikation in einer frühen Phase der PCR-Reaktion auf, resultiert daraus eine erhebliche Variation in der Konzentration des Endproduktes. Eine mögliche Erklärung ist das Binden der Primer an die Matrize, das in jedem PCR-Zyklus als ein zufälliger Vorgang betrachtet werden muss. Geringste Unterschiede darin, ob sich die Primer anlagern konnten oder nicht, resultieren in erheblichen Variationen der Amplifikations-Effizienz (Karrer, 1995). Verdeutlicht wird dies darüber hinaus in der Tatsache, dass eine Verdopplung des cDNA-Volumens in vielen Fällen keinen um 1 verringerten Ct-Wert beim Nachweis des *hicp75TNFR* ergab.

Demnach kann auf Grund der geringen Expression nicht davon ausgegangen werden, dass sich mit dem Volumen zwangsläufig auch die Anzahl der Transkripte verdoppelt.

Anhand der Untersuchung von C57BL/6-Mäusen im D-Galaktosamin (DGalN)/LPS induzierten Hepatotoxizitäts-Test lässt sich erkennen, dass eine Regulation des icp75TNFR wohl kaum mit der des mp75TNFR einhergeht. Durch die alleinige Gabe von LPS steigt die Transkriptmenge für mp75TNFR bis auf das Fünffache des Ursprungsniveaus an (s. Abb. 20), trotzdem kann die mRNA für micp75TNFR nicht nachgewiesen werden. Die zunächst vermutete spezifische Expression von micp75TNFR nach kombinierter Gabe von DGalN und LPS (s. Abb. 15) erweist sich bei genauerer Betrachtung der Methode als Trugschluss. Um in den Hepatozyten über LPS und in der Folge TNF Hepatotoxizität und damit Zelltod induzieren zu können, braucht es eine transkriptionelle Blockade der entsprechenden Zellen (Leist, 1994), weil sonst über die Aktivierung von NF- κ B die Transkription von anti-apoptotischen Schutz-Genen initiiert würde (Schumann, 1999). Dies bestätigt sich in Mausmodellen, die gendefizient für RelA oder andere entscheidende Komponenten des TNF-induzierten NF- κ B-Signalweges sind und auf Grund dieser Deletionen bereits im Embryonalstadium oder kurz nach der Geburt an fulminantem TNF-abhängigem Leberversagen sterben (Beg, 1995, Bonnard, 2000, Rudolph, 2000). Somit ergibt sich für die über den p55TNFR induzierte Signaltransduktion *in vivo* und *in vitro* eine Dominanz der NF- κ B-Aktivierung über die Induktion von Zelltod, die nur durch entsprechende Inhibierung aufgebrochen werden kann. Die erforderliche transkriptionelle Blockade wird über die Gabe von DGalN induziert und besteht praktisch unmittelbar ab dem Zeitpunkt der Injektion (Leist, 1995). Die Spezifität für Hepatozyten resultiert dabei aus der Verstoffwechslung der Substanz in den Zellen der Leber und eine dadurch verursachte, selektive Depletion der Uridin-Nukleotide vor Ort (Bradham, 1998). Die dadurch verursachte Inhibition der Transkription lässt sich am Beispiel der mp75TNFR-Expression verdeutlichen, die wie bereits erwähnt durch alleinige Gabe von LPS auf das Fünffache ansteigt, durch die zusätzliche transkriptionelle Blockade des DGalN aber im Vergleich zum Ausgangsniveau (PBS-behandelte Maus) praktisch unverändert bleibt (s. Abb. 20). Deshalb kann konsequenterweise nicht von einer spezifischen Expression des micp75TNFR im TNF-induzierten Hepatotoxizitäts-Modell gesprochen werden. Warum reproduzierbar immer nur in der DGalN/LPS behandelten Maus der Nachweis des micp75TNFR gelang bleibt spekulativ. Eventuell kommt es durch die massive Zerstörung

der Hepatozyten und damit der ganzen Leber zur Detektion von Transkripten, die ansonsten dem Nachweis entgehen würden. Versuche aus unserer Arbeitsgruppe mit hicp75TNFR-transgenen Mäusen im DGalN/LPS induzierten Hepatotoxizitäts-Test, zeigten jedenfalls keinen Vorteil der transgenen gegenüber den Wildtyp-Tieren (unveröffentlichte Daten).

Bei den primären CD8⁺ T-Zellen ist wohl der Zeitpunkt der anti-CD3/anti-CD28-Stimulierung für die Regulation auf RNA-Ebene zu spät gewählt. Edward Kim konnte in einer Stimulierungs-Kinetik zeigen, dass die maximale Expression an mp75TNFR auf Proteinebene erst nach 48 h auf der Zellmembran detektiert werden kann, und das obwohl zu diesem Zeitpunkt schon vermehrt die proteolytische Abspaltung des Rezeptors und damit die Prozessierung in seine lösliche Form statt gefunden hat (Kim, 2001). Die Regulation auf RNA-Ebene scheint zu diesem Zeitpunkt aber bereits abgeschlossen zu sein. Ein positiver Nachweis des micp75TNFR gelang in diesem Szenario aber ohnehin nur in den unstimulierten CD8⁺ T-Zellen der p75TNFR-gendefizienten Mäuse, bei denen Exon 1 durch Insertion einer Neomycin-Kassette zerstört wurde (Erickson, 1994). Demnach kann sehr wohl ein Transkript generiert werden, das an Stelle von Exon 1 eine alternative 5' UTR verwendet. Dies könnte als Versuch der Zelle gedeutet werden, den Verlust eines funktionellen Rezeptors zu kompensieren, erscheint aber unter Betrachtung der nicht mehr vorhandenen Fähigkeit zur Ligandbindung wenig plausibel.

5. Charakterisierung des micp75TNFR

In der Immunpräzipitation kann man relativ gut den Unterschied beider mp75TNFR-Isoformen hinsichtlich ihres Molekulargewichtes erkennen (s. Abb. 23). Die beim micp75TNFR fehlenden 26 Aminosäuren aus Exon 2 spiegeln sich im SDS-PAGE in einer Differenz von ca. 20 kDa wider. Zwar liegt der errechnete Wert für die fehlende Aminosäure-Sequenz bei nur 6,2 kDa, durch Änderungen in der Struktur des Proteins oder eine eventuell veränderte Glykosylierung, können aber leicht größere als die kalkulierten Unterschiede verursacht werden. So beträgt das errechnete Molekulargewicht für die 439 Aminosäuren des p75TNFR auch nur 45 kDa, im SDS-PAGE zeigt sich aber ein apparentes Molekulargewicht von 75 kDa, woher ja auch der Name des Rezeptors rührt. Diese Diskrepanz kann nicht allein durch die Glykosylierung des Proteins verursacht sein, denn durch Entfernung der Zucker reduziert sich das Gewicht nur um

4 kDa. Man erklärt sich die Beobachtung vielmehr mit einer speziellen Tertiärstruktur des reduzierten Proteins, die durch das verwendete SDS und die Bedingungen im PAGE-Gel verursacht wird (Kohno, 1990). Bei der zweiten, deutlich kleineren Bande des mp75TNFR, handelt es sich vermutlich um eine noch nicht vollständig glykosylierte Vorstufe des Proteins, die auf Grund der veränderten Struktur ein anderes Laufverhalten aufweist.

In der Fluoreszenzmikroskopie zeigt sich das gleiche Bild wie schon im Humansystem. Während für den mp75TNFR eine deutliche Membranfärbung zu erkennen ist, verbleibt der micp75TNFR praktisch ausschließlich intrazellulär in einem perinukleären Bereich, bei dem es sich sehr wahrscheinlich um den Golgi-Apparat handelt (s. Abb. 24).

Weil schon beim humanen icp75TNFR gezeigt werden konnte, dass mit der wesentlich sensitiveren Methode der Durchflusszytometrie trotz ähnlicher mikroskopischer Aufnahmen, eine gewisse Membranexpression detektierbar war (Scherübl, 2005), wurde diese Untersuchung auch beim micp75TNFR durchgeführt, mit gleichem Resultat. Auch in der Maus kann die als intrazellulär bezeichnete Variante zu einem gewissen Teil auf der Oberfläche transduzierter Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 25). Zwar fehlt ihr mit Exon 1 das Signalpeptid, das den p75TNFR direkt auf die Zellmembran bringt, aber auch für andere Proteine, darunter Beispiele aus der Gruppe der TNF-Rezeptoren, denen eine solche *leader* Sequenz fehlt, ist eine membranständige Expression beschrieben worden. Diese verläuft zwar nicht in einem aktiven, gerichteten Prozess, das Protein kann aber über die vorhandene Transmembrandomäne in der Plasmamembran verankert werden (Bodmer, 2002). Der qualitative Unterschied im Transport der jeweiligen Isoform zur Membran manifestiert sich folgerichtig in der Quantität in der einerseits der mp75- und andererseits der micp75TNFR auf der Membran bzw. im Zytoplasma der Zelle detektierbar ist.

Zwar konnte die Prozessierung des micp75TNFR in seine lösliche Form auf Grund methodischer Unzulänglichkeiten nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, aber durch die zumindest teilweise membranständige Lokalisierung des Rezeptors ist die Möglichkeit zur proteolytischen Abspaltung dieser Membranfraktion mehr als wahrscheinlich. Für die zur ADAM-Familie gehörende Metalloprotease TACE ist zum einen bekannt, dass sie in

großem Umfang für die Abspaltung des mp75TNFR von der Zellmembran verantwortlich ist, zum anderen kennt man mittlerweile die für das Enzym entscheidende Domäne um Valin 114, in der das Ziel-Protein geschnitten wird (Hooper, 1997). Da beide mp75TNFR-Isoformen in diesem Bereich vollkommen identisch sind und ein Teil des micp75TNFR durch die Lokalisierung auf der Membran für TACE zugänglich gemacht wird, wäre die Existenz eines löslichen micp75TNFR nur logische Konsequenz, wenn auch das Ausmaß der Prozessierung auf Grund der hohen intrazellulären Retention deutlich geringer sein dürfte als für den mp75TNFR. Daher konnte bei einem fehlenden Effekt des Überstandes von micp75TNFR-transduzierten Zellen im TNF-induzierten Zytotoxizitäts-Hemmtest (s. Abb. 27) nicht *per se* von verlorengegangener Ligandbindung oder fehlendem *shedding*-Mechanismus ausgegangen werden, sondern musste auch die vermutlich deutlich geringere Konzentration an löslichem Rezeptor als Ursache in Erwägung gezogen werden.

Um die Rolle des intrazellulär und membranständig exprimierten Anteils an micp75TNFR in Bezug auf TNF-vermittelte Zytotoxizität zu untersuchen, wurde der Test an Stelle des konditioniertem Mediums noch einmal mit micp- bzw. mp75TNFR transduzierten Zellen im Vergleich zu einer nur EYFP-produzierenden Kontrollzelllinie durchgeführt. Um die Möglichkeit der Induktion von NF- κ B und dadurch die Expression anti-apoptotischer Schutzgene über den micp- bzw. mp75TNFR zu gewährleisten, wurde neben der sofortigen Zugabe des RNA-Polymerase Inhibitors Actinomycin D, das zur Verstärkung und Beschleunigung des im Test induzierten Zelltodes benötigt wird, die Substanz zusätzlich mit einer Verzögerung von einer Stunde beigelegt (s. Abb. 28). Unabhängig von der Aktivierung des jeweiligen Rezeptors muss ein Schutz vor der induzierten Zytotoxizität zumindest durch das Wegfangen bzw. Binden von mTNF an die jeweilige mp75TNFR-Isoformen vermittelt werden, weil dadurch eine Aktivierung des endogenen mp55TNFR der L929-Zellen und damit die Induktion des Zelltodes stark abgeschwächt werden müsste. Ein solcher Effekt konnte aber nur für den mp75TNFR beobachtet werden, micp75TNFR-transduzierte Zellen verhalten sich wie die Kontroll-Zelllinie. Für den mp75TNFR besteht der Schutz unabhängig von einer Expression NF- κ B-induzierter Schutz-Proteine, was mit der kompetitiven Hemmung der mp55TNFR-Aktivierung durch ein Überangebot an mp75TNFR-Epitopen und dem damit einhergehenden verstärkten Abfangen des toxischen Agens erklärt werden kann. Dieser

kompetitive Hemm-Mechanismus bestätigt sich noch einmal durch die Verwendung von humanem TNF bzw. einem agonistischem Antikörper gegen den mp55TNFR. Beide Agentien aktivieren zwar den mp55TNFR und induzieren dadurch Zelltod, keine der beiden bindet aber an den mp75TNFR. Somit muss der mp55TNFR nicht mit anderen Proteinen auf der Zellmembran um seinen Liganden bzw. den Antikörper konkurrieren. Für den micp75TNFR stellt sich erneut die Frage, ob die zu geringe Oberflächenexpression für den fehlenden Effekt verantwortlich ist, oder ob die neue Isoform tatsächlich die Fähigkeit zur Ligandbindung und damit zum Abfangen des mTNF im Zytotoxizitäts-Test verloren hat.

Zur Untersuchung der Ligandbindung des micp75TNFR wurde ein Fusionsprotein aus der Extrazellulärdomäne des Rezeptors und dem Fc-Teil eines humanen IgG generiert. Da das entstehende Protein N-terminal das Signalpeptid von CD33 enthält, wird es schnell und zielgerichtet durch das Trans-Golgi-Netzwerk transportiert und in den Überstand der exprimierenden Zellen abgegeben. Somit kann von vorne herein eine im Vergleich zum mp75TNFR verringerte Konzentration an Rezeptor-Extrazellulärdomäne im Überstand verhindert und bei Bindung des Liganden an den Rezeptor, ein äquivalenter Effekt des micp75TNFR erwartet werden. Zudem wird über die Expression als Fusionsprotein eine Dimerisierung des Rezeptors über die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen zwei IgG-Teilen verursacht. Da die Affinität von TNF zu den löslichen Rezeptoren verglichen mit den membranintegrierten auf Grund fehlender Cluster-Bildung deutlich niedriger ist, gewährleistet die Dimerisierung der Fusionsproteine zusätzlich eine ausreichend stabile Bindung des Liganden an den Rezeptor (Wajant, 2003). Dieser Effekt wird schließlich auch in Etanercept, einem IgG-Fusionsprotein mit humaner p75TNFR-ECD, erfolgreich in der Therapie verschiedenster chronischer Entzündungen umgesetzt. Da für den p75TNFR gezeigt werden konnte, dass für seine Aktivierung weniger lösliches als vielmehr membranständiges 26 kDa TNF verantwortlich ist (Grell, 1995b), wurde die Bindung beider Varianten an den micp75TNFR untersucht. Für den p55TNFR dagegen besteht laut Literatur keine Präferenz für eine der beiden Ligand-Formen, einige Quellen weisen ihm eine höhere Affinität zu löslichem TNF zu (Wajant, 2003). In jedem Fall können beide Ligand-Formen in L929-Zellen Zelltod induzieren und folglich im Zytotoxizitäts-Hemmtest eingesetzt werden. Für die membranständige Form des mTNF geschah dies in Form

fixierter Zellen (s. Abb. 35A), um eine Kontamination des Assays mit löslichem mTNF zu verhindern. Die Fusionsproteine wurden dem Test als kompetitive Inhibitoren zugefügt und sollten nach erfolgter Bindung an die jeweilige mTNF-Variante, zu einem deutlichen Schutz der L929-Zellen führen. In beiden Fällen (s. Abb. 32 und Abb. 35) konnte dies für den mp75TNFR gezeigt werden. Dass es sich um eine spezifische Ligand-Rezeptor-Interaktion handelt, zeigt der Zytotoxizitäts-Hemmtest mit humanem TNF (s. Abb. 33), in dem ein mp75TNFR-Fusionsprotein keinen Vorteil bringt. Obwohl TNF speziesübergreifend stark konserviert ist, bindet das humane TNF nur ausreichend gut an den Maus-p55TNFR, aber nicht mehr an den Maus-p75TNFR. Diese Spezies-Spezifität könnte darin begründet sein, dass zwischen humanem und Maus-p55TNFR wesentlich stärkere Homologien bestehen als dies beim p75TNFR beider Spezies der Fall ist (Lewis, 1991).

Leider blieb auch hier ein Effekt des micp75TNFR aus, womit unumstößlich der Verlust der Ligandbindungsfähigkeit für die neue Isoform des mp75TNFR konstatiert werden muss. Der im memTNF-induzierten Zytotoxizitäts-Hemmtest beobachtete, geringfügige Schutz durch Zugabe des micp75TNFR-Fusionsproteins, entlarvt sich in der Durchflusszytometrie als unspezifische Bindung und einer damit einhergehenden sterischen Hinderung des memTNF auf den fixierten L929-Zellen durch anhaftendes Fusionsprotein. Dies führt zu einer nicht mehr ganz optimalen Bindung des memTNF an den mp55TNFR und folglich zu einer weniger potenten Induktion des Zelltodes in den L929-Zellen, detektierbar als leichte Rechtsverschiebung der Kurve (s. Abb. 35). Da das micp75TNFR-Fusionsprotein nicht nur auf Zelllinien der Maus (L929- und RAW 264.7-Zellen) sondern auch auf den humanen HEK-Zellen und der Primaten-Zelllinie COS-7 bindet, handelt es sich nicht um eine spezifische Bindung an ein bestimmtes Protein der Maus, sondern tatsächlich um ein völlig unspezifisches Anhaften.

Auch die Ligandbindung von löslichem $LT\alpha_3$ an den micp75TNFR wurde mit Hilfe des Fusionsproteins untersucht. Mit dem zur Verfügung stehenden rekombinanten Protein der Firma R&D-Systems konnte aber im Test selbst die Bindung an den mp75TNFR nicht gezeigt werden. Deshalb kann zu einer Bindung dieses Liganden an den micp75TNFR keine Aussage getroffen werden.

Betrachtet man die Aminosäuresequenz des micp75TNFR, so stellt man fest, dass durch die Verkürzung von Exon 2 ein Teil der ersten *Cystein-rich Domain* (CRD1) fehlt. Die Ligand-Bindungstasche für TNF, wird aber hauptsächlich von der CRD2 und CRD3

gebildet, somit sollten die fehlenden 26 AS die Ligandbindung eigentlich nicht weiter beeinträchtigen (Banner, 1993). Francis Chan und Kollegen berichteten 2000 von einer konservierten Region in der Extrazellulärdomäne beider humaner TNF-Rezeptoren, die eine Ligand-unabhängige Homotri- oder sogar -multimerisierung der Rezeptoren verursacht und daher als *pre-ligand-binding assembly domain* (PLAD) bezeichnet wurde (Chan, 2000). Obwohl die PLAD von dem Bereich, in dem der Ligand tatsächlich mit dem Rezeptor in Kontakt tritt, völlig unabhängig ist, ist sie für die Bindung von TNF an den Rezeptor essentiell. Eine Deletionsmutante des humanen p75TNFR, bei der die Aminosäuren +10 bis +54 fehlen, kann trotz erhaltener übergeordneter Struktur der Extrazellulärdomäne kein TNF mehr binden. Eine Übertragung dieser Ergebnisse aus dem humanen ins Maus-System ist auf Grund der hohen Homologien im TNF-/TNFR-System zulässig und könnte damit den Verlust der Ligandbindung erklären. Zwar fehlt im Vergleich zu der von Chan et al. zunächst verwendeten Mutante ein wesentlich kürzeres Stück von Exon 2, die Gruppe konnte aber weiter zeigen, dass eine spezifische Mutation der Aminosäuren 19 und 20 bereits ausreichend ist, um eine Elimination der Bindungsfähigkeit zu verursachen. Somit würden auch die fehlenden 26 Aminosäuren des micp75TNFR massiv mit der Ausbildung der PLAD interferieren und daraus der Verlust der Ligandbindung resultieren.

Damit stellt sich einmal mehr die Frage nach der biologischen Relevanz des icp75TNFR in der Maus. Die Schaffung eines intrazellulären und damit vor proteolytischer Spaltung geschützten Speichers an funktionellen p75TNFR-Molekülen scheidet durch den Verlust der Aktivierbarkeit des Rezeptors aus.

Für IL-6 ist eine alternative Spleissvarinante beschrieben worden, die durch Herausspleissen von Exon 4 (IL-6 Δ 4) entsteht und zwar noch an den IL-6 α R, aber nicht mehr an den IL-6 β R binden kann, wodurch die Formierung eines funktionellen IL-6-Rezeptorkomplexes, der normalerweise in Form eines Heterohexameres gebildet wird, unterbunden ist. Damit geht gleichzeitig der Verlust von Signaltransduktion einher, der diese Variante des IL-6 zu einem kompetitiven Antagonisten des herkömmlichen Zytokins macht. Auffällig ist hier die mittels RT-PCR nachgewiesene, äußerst geringe Expression der IL-6 Δ 4-Variante im Vergleich zum herkömmlichen IL-6, wie dies in ähnlicher Weise beim micp75TNFR beobachtet werden kann. Erst nähere Untersuchungen werden klären, ob im Falle von IL-6 eine Verschiebung des Verhältnisses beider

alternativer Spleissvarianten von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren oder einem unterschiedlichen Stand der Zelldifferenzierung abhängig ist (Bihl, 2002). Des weiteren wurden auch für die Zytokine IL-2 (Denesyuk, 1998, Ketzinell, 1999) und IL-4 (Atamas, 1996, Denesyuk, 1998, Zav'yalov, 1997) alternativ gespleisste Varianten beschrieben, die für Proteine mit kompetitiv antagonistischer Wirkung kodieren. Für die Spleissvariante des IL-4 wurde beispielsweise eine Hemmung der IL-4 vermittelten T-Zell Aktivierung beschrieben.

Denkbar wäre auch für den micp75TNFR eine solche kompetitiv antagonistische Funktion, die aber wieder an die Existenz signifikanter Proteinmengen gebunden wäre, was, wie schon im Human-System, mit den Ergebnissen aus der herkömmlichen und der quantitativen RT-PCR nicht in Einklang zu bringen ist. Eventuell findet die Expression des icp75TNFR nur unter sehr spezifischen Umständen statt, die von den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bedingungen nicht erfasst wurden.

Eine abschließende Klärung dieser Frage kann vielleicht letztendlich nur über die Generierung einer icp75TNFR-gendefizienten Maus und deren Phänotypisierung erzielt werden.

E Zusammenfassung

Sowohl im humanen als auch im Maus-System war in unserem Labor eine intrazellulär lokalisierte Isoform des p75TNFR entdeckt worden, die durch Verwendung eines weiter 5' gelegenen alternativen Promotors und anschließend alternativen Spleissen generiert wird (Seitz, 2001). Dadurch entsteht im Falle des humanen icp75TNFR ein Protein, das an Stelle von Exon 1 ein alternatives Exon 1a enthält, welches durch Exonisierung eines Alu-Elementes entstanden ist (Singer, 2004). In der Maus wird dagegen alternativ zu Exon 1 eine untranslatierte Region direkt an Exon 2 gespleisst, von dem ein im richtigen Leseraster gelegenes ATG als Startpunkt der Proteinbiosynthese verwendet werden kann. Somit verkürzt sich das Protein N-terminal um 26 Aminosäuren.

Durch Untersuchungen zur Regulation und dem spezifischen *knock down* zunächst des humanen icp75TNFR, sollte ein näherer Einblick in die Funktion der neuen Isoform erzielt werden. Nachdem sich dies wegen der geringen Expression des Rezeptors als äußerst schwierig darstellte, wurde der icp75TNFR im Maus-System in die Untersuchungen mit einbezogen.

Im Human-System konnte durch Optimierung der RT-PCR und anschließender spezifischer Hybridisierung zwar der Nachweis für den humanen icp75TNFR reproduzierbar geführt werden, es handelt sich aber in allen untersuchten Zelllinien und Primärzellen um eine sehr geringe Expression. Zudem wird die spezifische Detektion der Isoform zusätzlich durch die hohe Homologie zur AluJo-Sequenz erschwert, die in hoher Kopienzahl in den RNA-Präparationen repräsentiert ist.

Der *Ribonuclease Protection Assay* erwies sich als Methode zum Nachweis für den hicp75TNFR auf Grund fehlender Amplifikations-Schritte als zu wenig sensitiv und auf Grund der hohen Übereinstimmung zwischen Exon 1a- und Alu-Sequenz als nicht geeignet.

Mittels quantitativer *Real Time* RT-PCR, obwohl *per se* nicht weniger sensitiv als eine herkömmliche RT-PCR-/Southern-Methode, konnte im Falle des hicp75TNFR ebenfalls kein Transkript für diese Isoform detektiert werden, was noch einmal die geringe Expression unterstreicht.

Der funktionelle *knock down* des hicp75TNFR, der mittels RNA-Interferenz vermittelt werden sollte, konnte wegen der starken Einschränkungen, wieder bedingt durch die hohe Übereinstimmung zwischen einerseits dem hp75TNFR und andererseits dem Alu-Element, ebenfalls nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Im Maus-System, wo die Entstehung der intrazellulären Variante des p75TNFR nicht durch Insertion eines repetitiven DNA-Elementes in den p75TNFR-Genloкус verursacht ist, konnte ebenfalls nur eine geringe Expression des icp75TNFR detektiert werden, die mRNA war aber reproduzierbar in einigen Zellen mittels RT-PCR-/Southern-Hybridisierung nachweisbar.

Im Gegensatz zum humanen System gelang in der Maus auch in der quantitativen *Real Time* RT-PCR ein positiver Nachweis für den icp75TNFR, allerdings geschah dies am Rande der Nachweisgrenze, womit wegen der großen Schwankungen einzelner PCR-Reaktionen keine quantitativen Aussagen getroffen werden konnten.

Die biochemische Charakterisierung des micp75TNFR zeigte, dass die fehlenden 26 Aminosäuren aus Exon 2 in einem um ca. 20 kDa verringertem Molekulargewicht resultieren. Die Lokalisierung des micp75TNFR ist vorwiegend intrazellulär, wie im Human-System konnte ein gewisser Teil des Rezeptors dennoch auf der Zellmembran detektiert werden. Dadurch ist eine Prozessierung des micp75TNFR in seine lösliche Form zwar mehr als wahrscheinlich, auf Grund methodischer Unzulänglichkeiten aber nicht zweifelsfrei nachweisbar.

Die funktionelle Charakterisierung des micp75TNFR mittels TNF-induziertem Zytotoxizitäts-Test zeigte keinen Schutzeffekt der neuen Isoform vor dem durch den p55TNFR ausgelösten Zelltod, obwohl dies für den humanen icp75TNFR, durch Abfangen des toxischen TNF und dadurch verursachte kompetitive Hemmung des Todesrezeptors (p55TNFR), nachgewiesen werden konnte.

In Untersuchungen zur Ligandbindung der neuen p75TNFR-Isoform konnte schließlich gezeigt werden, dass weder lösliches noch transmembranäres Maus-TNF an den micp75TNFR bindet und er damit nicht aktiviert werden kann. Dies erklärt auch den fehlenden Schutz im TNF-Zytotoxizitäts-Test.

Vor allem unter Berücksichtigung der geringen Expression des micp75TNFR ist die Zuweisung einer biologischen Bedeutung schwierig und vielleicht nur über die Generierung einer icp75TNFR-gendefizienten Maus und deren Phänotypisierung möglich.

F Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Lichtmann, A. H., Pober, J. S.** (2000) Cellular and molecular immunology. *W.B.Saunders company*
- Adamo, M. L., Ben Hur, H., LeRoith, D., Roberts, C. T., Jr.** (1991) Transcription initiation in the two leader exons of the rat IGF-I gene occurs from disperse versus localized sites. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **176**, 887-893.
- Aggarwal, B. B.** (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat.Rev.Immunol.* **3**, 745-756.
- 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.
- 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.
- Arkins, S., Rebeiz, N., Biragyn, A., Reese, D. L., Kelley, K. W.** (1993) Murine macrophages express abundant insulin-like growth factor-I class I Ea and Eb transcripts. *Endocrinology* **133**, 2334-2343.
- 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.

- Atamas, S. P., Choi, J., Yurovsky, V. V., White, B.** (1996) An alternative splice variant of human IL-4, IL-4 delta 2, inhibits IL-4-stimulated T cell proliferation. *J.Immunol.* **156**, 435-441.
- Bailey, A. D., Shen, C. K.** (1993) Sequential insertion of Alu family repeats into specific genomic sites of higher primates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 7205-7209.
- Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., Loetscher, H., Lesslauer, W.** (1993) Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* **73**, 431-445.
- Batzer, M. A., Deininger, P. L.** (2002) Alu repeats and human genomic diversity. *Nat.Rev.Genet.* **3**, 370-379.
- Batzer, M. A., Kilroy, G. E., Richard, P. E., Shaikh, T. H., Desselle, T. D., Hoppens, C. L., Deininger, P. L.** (1990) Structure and variability of recently inserted Alu family members. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6793-6798.
- Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S., Baltimore, D.** (1995) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* **376**, 167-170.
- 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.
- Bihl, M. P., Heinemann, K., Rudiger, J. J., Eickelberg, O., Perruchoud, A. P., Tamm, M., Roth, M.** (2002) Identification of a novel IL-6 isoform binding to the endogenous IL-6 receptor. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **27**, 48-56.
- 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., Tschoep, J.** (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem.Sci* **27**, 19-26.
- Boldin, M. P., Mett, I. L., Wallach, D.** (1995) A protein related to a proteasomal subunit binds to the intracellular domain of the p55 TNF receptor upstream to its 'death domain'. *FEBS Lett.* **367**, 39-44.
- Bonnard, M., Mirtsos, C., Suzuki, S., Graham, K., Huang, J., Ng, M., Itie, A., Wakeham, A., Shahinian, A., Henzel, W. J., Elia, A. J., Shillinglaw, W., Mak, T. W., Cao, Z., Yeh, W. C.** (2000) Deficiency of T2K leads to apoptotic liver

- degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription. *EMBO J.* **19**, 4976-4985.
- Bradham, C. A., Plumpe, J., Manns, M. P., Brenner, D. A., Trautwein, C.** (1998) Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am.J.Physiol* **275**, G387-G392.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., Agami, R.** (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-553.
- Bustin, S. A.** (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J.Mol.Endocrinol.* **29**, 23-39.
- Bustin, S. A., Nolan, T.** (2004) Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J.Biomol.Tech.* **15**, 155-166.
- 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.
- Cairns, A. P., Duncan, M. K., Hinder, A. E., Taggart, A. J.** (2002) New onset systemic lupus erythematosus in a patient receiving etanercept for rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* **61**, 1031-1032.
- Caras, I. W., Davitz, M. A., Rhee, L., Weddell, G., Martin, D. W., Jr., Nussenzweig, V.** (1987) Cloning of decay-accelerating factor suggests novel use of splicing to generate two proteins. *Nature* **325**, 545-549.
- 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.
- Chevrier, D., Rasmussen, S. R., Guesdon, J. L.** (1993) PCR product quantification by non-radioactive hybridization procedures using an oligonucleotide covalently bound to microwells. *Mol.Cell Probes* **7**, 187-197.
- Christ, O., Matzku, S., Burger, C., Zoller, M.** (2001) Interleukin 2-antibody and tumor necrosis factor-antibody fusion proteins induce different antitumor immune responses in vivo. *Clin.Cancer Res.* **7**, 1385-1397.
- 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-

- Coley, W. B.** (1896) Further observations upon the treatment of malignant tumors with the toxins of erysipelas and *Bacillus prodigiosus* with a report of 160 cases. *Bull Johns Hopkins Hosp* **7**,
- 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.
- Declercq, W., Vandenabeele, P., Fiers, W.** (1995) Dimerization of chimeric erythropoietin/75 kDa tumour necrosis factor (TNF) receptors transduces TNF signals: necessity for the 75 kDa-TNF receptor transmembrane domain. *Cytokine* **7**, 701-709.
- Denesyuk, A. I., Zav'yalov, V. P., Denessiouk, K. A., Korpela, T.** (1998) Molecular models of two competitive inhibitors, IL-2delta2 and IL-2delta3, generated by alternative splicing of human interleukin-2. *Immunol.Lett.* **60**, 61-66.
- Deng, G. M., Zheng, L., Ka-Ming, C. F., Lenardo, M.** (2005) Amelioration of inflammatory arthritis by targeting the pre-ligand assembly domain of tumor necrosis factor receptors. *Nat.Med.* **11**, 1066-1072.
- Depuydt, B., van Loo, G., Vandenabeele, P., Declercq, W.** (2005) Induction of apoptosis by TNF receptor 2 in a T-cell hybridoma is FADD dependent and blocked by caspase-8 inhibitors. *J.Cell Sci.* **118**, 497-504.
- Ding, C., Cantor, C. R.** (2004) Quantitative analysis of nucleic acids--the last few years of progress. *J.Biochem.Mol.Biol.* **37**, 1-10.
- 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.
- Eigler, A., Sinha, B., Hartmann, G., Endres, S.** (1997) Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol.Today* **18**, 487-492.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T.** (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.
- Enayati, P. J., Papadakis, K. A.** (2005) Association of anti-tumor necrosis factor therapy with the development of multiple sclerosis. *J.Clin.Gastroenterol.* **39**, 303-306.
- 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.

- Goodwin, R. G., Anderson, D., Jerzy, R., Davis, T., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Smith, C. A.** (1991) Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor. *Mol.Cell Biol.* **11**, 3020-3026.
- 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.
- Grell, M., Zimmermann, G., Gottfried, E., Chen, C. M., Grunwald, U., Huang, D. C., Wu Lee, Y. H., Durkop, H., Engelmann, H., Scheurich, P., Wajant, H., Strasser, A.** (1999) Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J.* **18**, 3034-3043.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G. J.** (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-296.
- Hannon, G. J.** (2002) RNA interference. *Nature* **418**, 244-251.
- Hannon, G. J., Rossi, J. J.** (2004) Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* **431**, 371-378.
- Heller, R. A., Song, K., Fan, N., Chang, D. J.** (1992) The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity. *Cell* **70**, 47-56.
- Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H., Osawa, T.** (1990) Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J.Immunol.* **144**, 1425-1431.
- Holtmann, M. H., Douni, E., Schutz, M., Zeller, G., Mudter, J., Lehr, H. A., Gerspach, J., Scheurich, P., Galle, P. R., Kollias, G., Neurath, M. F.** (2002) Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo. *Eur.J.Immunol.* **32**, 3142-3151.

- 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>
- Idriss, H. T., Naismith, J. H.** (2000) TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc.Res.Tech.* **50**, 184-195.
- Itoh, N., Nagata, S.** (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J.Biol.Chem.* **268**, 10932-10937.
- Karin, M., Lin, A.** (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat.Immunol.* **3**, 221-227.
- Karppinen, J., Korhonen, T., Malmivaara, A., Paimela, L., Kyllonen, E., Lindgren, K. A., Rantanen, P., Tervonen, O., Niinimäki, J., Seitsalo, S., Hurri, H.** (2003) Tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody, infliximab, used to manage severe sciatica. *Spine* **28**, 750-753.
- Karrer, E. E., Lincoln, J. E., Hogenhout, S., Bennett, A. B., Bostock, R. M., Martineau, B., Lucas, W. J., Gilchrist, D. G., Alexander, D.** (1995) In situ isolation of mRNA from individual plant cells: creation of cell-specific cDNA libraries. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 3814-3818.
- Ketzinel, M., Kaempfer, R.** (1999) Cell-mediated suppression of human interleukin-2 gene expression at splicing of mRNA. *Immunol.Lett.* **68**, 161-166.
- Kim, E. Y., Teh, H. S.** (2001) TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. *J.Immunol.* **167**, 6812-6820.
- Kim, E. Y., Teh, H. S.** (2004) Critical role of TNF receptor type-2 (p75) as a costimulator for IL-2 induction and T cell survival: a functional link to CD28. *J.Immunol.* **173**, 4500-4509.
- Knebelmann, B., Forestier, L., Drouot, L., Quinones, S., Chuet, C., Benessy, F., Saus, J., Antignac, C.** (1995) Splice-mediated insertion of an Alu sequence in the COL4A3 mRNA causing autosomal recessive Alport syndrome. *Hum.Mol.Genet.* **4**, 675-679.
- Kodama, S., Davis, M., Faustman, D. L.** (2005) The therapeutic potential of tumor necrosis factor for autoimmune disease: a mechanistically based hypothesis. *Cell Mol.Life Sci.* **62**, 1850-1862.
- 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.
- Kollias, G., Kontoyiannis, D.** (2002) Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 315-321.

- 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.
- Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., Lu, S. D. (1988)** A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* **53**, 45-53.
- Krippner-Heidenreich, A., Tubing, F., Bryde, S., Willi, S., Zimmermann, G., Scheurich, P. (2002)** Control of receptor-induced signaling complex formation by the kinetics of ligand/receptor interaction. *J.Biol.Chem.* **277**, 44155-44163.
- 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.
- Leist, M., Gantner, F., Bohlinger, I., Germann, P. G., Tiegs, G., Wendel, A. (1994)** Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest. *J.Immunol.* **153**, 1778-1788.
- Leist, M., Gantner, F., Bohlinger, I., Tiegs, G., Germann, P. G., Wendel, A. (1995)** Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am.J.Pathol.* **146**, 1220-1234.
- Lejeune, F. J., Kroon, B. B., Di Filippo, F., Hoekstra, H. J., Santinami, M., Lienard, D., Eggermont, A. M. (2001)** Isolated limb perfusion: the European experience. *Surg.Oncol.Clin.N.Am.* **10**, 821-32, ix.
- Lekanne Deprez, R. H., Fijnvandraat, A. C., Ruijter, J. M., Moorman, A. F. (2002)** Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal.Biochem.* **307**, 63-69.
- 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.
- Liu, Y., Cheung, L. H., Marks, J. W., Rosenblum, M. G. (2004)** Recombinant single-chain antibody fusion construct targeting human melanoma cells and containing tumor necrosis factor. *Int.J.Cancer* **108**, 549-557.
- 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.
- Lugering, A., Schmidt, M., Lugering, N., Pauels, H. G., Domschke, W., Kucharzik, T.** (2001) Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology* **121**, 1145-1157.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., Kutay, U.** (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95-98.
- MacEwan, D. J.** (2002) TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *Br.J.Pharmacol.* **135**, 855-875.
- Männel, D. N., Echtenacher, B.** (2000) TNF in the inflammatory response. *Chem.Immunol.* **74**, 141-161.
- Männel, D. N., Moore, R. N., Mergenhagen, S. E.** (1980) Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). *Infect.Immun.* **30**, 523-530.
- 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.
- McDevitt, H., Munson, S., Ettinger, R., Wu, A.** (2002) Multiple roles for tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin alpha/beta in immunity and autoimmunity. *Arthritis Res.* **4 Suppl 3**, S141-S152.
- Mighell, A. J., Markham, A. F., Robinson, P. A.** (1997) Alu sequences. *FEBS Lett.* **417**, 1-5.
- Mittal, V.** (2004) Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat.Rev.Genet.* **5**, 355-365.
- 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.
- Moss, M. L., Jin, S. L., Becherer, J. D., Bickett, D. M., Burkhart, 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.

- Mueller, C., Corazza, N., Trachsel-Loseth, S., Eugster, H. P., Buhler-Jungo, M., Brunner, T., Imboden, M. A.** (1999) Noncleavable transmembrane mouse tumor necrosis factor- α (TNF α) mediates effects distinct from those of wild-type TNF α in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.* **274**, 38112-38118.
- Nedwin, G. E., Svedersky, L. P., Bringman, T. S., Palladino, M. A., Jr., Goeddel, D. V.** (1985) Effect of interleukin 2, interferon- γ , and mitogens on the production of tumor necrosis factors α and β . *J.Immunol.* **135**, 2492-2497.
- Nekrutenko, A., Li, W. H.** (2001) Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes. *Trends Genet.* **17**, 619-621.
- Onoa, B., Tinoco, I., Jr.** (2004) RNA folding and unfolding. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **14**, 374-379.
- Osborn, J.** (2000) A review of radioactive and non-radioactive-based techniques used in life science applications- Part I: Blotting techniques. *Life Science News* 1-4.
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Sachidanandam, R., Hannon, G. J.** (2004) Short hairpin activated gene silencing in mammalian cells. *Methods Mol.Biol.* **265**, 85-100.
- 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.
- Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B., Goeddel, D. V.** (1984) Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**, 724-729.
- 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.
- Puppo, F., Murdaca, G., Ghio, M., Indiveri, F.** (2005) Emerging biologic drugs for the treatment of rheumatoid arthritis. *Autoimmun.Rev.* **4**, 537-541.
- Roberts, L., McColl, G. J.** (2004) Tumour necrosis factor inhibitors: risks and benefits in patients with rheumatoid arthritis. *Intern.Med.J.* **34**, 687-693.
- Rosenblum, M. G., Horn, S. A., Cheung, L. H.** (2000) A novel recombinant fusion toxin targeting HER-2/NEU-over-expressing cells and containing human tumor necrosis factor. *Int.J.Cancer* **88**, 267-273.
- 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.
- Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., Goeddel, D. V.** (1994) A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **78**, 681-692.
- Rottman, J. B.** (2002) The ribonuclease protection assay: a powerful tool for the veterinary pathologist. *Vet.Pathol.* **39**, 2-9.
- Rubinson, D. A., Dillon, C. P., Kwiatkowski, A. V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Rooney, D. L., Ihrig, M. M., McManus, M. T., Gertler, F. B., Scott, M. L., Van Parijs, L.** (2003) A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat.Genet.* **33**, 401-406.
- Rudolph, D., Yeh, W. C., Wakeham, A., Rudolph, B., Nallainathan, D., Potter, J., Elia, A. J., Mak, T. W.** (2000) Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev.* **14**, 854-862.
- 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.
- Ryschkewitsch, C., Jensen, P., Hou, J., Fahle, G., Fischer, S., Major, E. O.** (2004) Comparison of PCR-southern hybridization and quantitative real-time PCR for the detection of JC and BK viral nucleotide sequences in urine and cerebrospinal fluid. *J.Virol.Methods* **121**, 217-221.
- Sambrook, J., Russel, D. W.** (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. *Molecular cloning: A laboratory manual 3rd Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY-
- Sandborn, W. J.** (2005) New concepts in anti-tumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease. *Rev.Gastroenterol.Disord.* **5**, 10-18.
- Scherübl, C.** (2004) Charakterisierung einer neuen Isoform des humanen p75TNF-Rezeptors.
- Scherübl, C., Schneider-Brachert, W., Schutze, S., Hehlhans, T., Mannel, D. N.** (2005) Colocalization of endogenous TNF with a functional intracellular splice form of human TNF receptor type 2. *J.Inflamm.(Lond)* **2**, 7-
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschrwender, 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.

- Schumann, J., Tiegs, G.** (1999) Pathophysiological mechanisms of TNF during intoxication with natural or man-made toxins. *Toxicology* **138**, 103-126.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P. D.** (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199-208.
- 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., Männel, D. N., Hehlhans, T.** (1998) Isolation and functional characterization of the mouse p75 TNF receptor promoter. *Genomics* **48**, 111-116.
- Seitz, C., Müller, P., Krieg, R. C., Männel, D. N., Hehlhans, T.** (2001) A Novel p75TNF Receptor Isoform Mediating NF κ 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.
- Shakoar, N., Michalska, M., Harris, C. A., Block, J. A.** (2002) Drug-induced systemic lupus erythematosus associated with etanercept therapy. *Lancet* **359**, 579-580.
- Sicotte, N. L., Voskuhl, R. R.** (2001) Onset of multiple sclerosis associated with anti-TNF therapy. *Neurology* **57**, 1885-1888.
- Singer, S. S., Männel, D. N., Hehlhans, 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.
- 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.
- Sommer, C., Schafers, M., Marziniak, M., Toyka, K. V.** (2001) Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy. *J.Peripher.Nerv.Syst.* **6**, 67-72.
- Sorek, R., Ast, G., Graur, D.** (2002) Alu-containing exons are alternatively spliced. *Genome Res.* **12**, 1060-1067.
- Spies, T., Bresnahan, M., Strominger, J. L.** (1989) Human major histocompatibility complex contains a minimum of 19 genes between the complement cluster and HLA-B. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 8955-8958.
- 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.
- 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., Pennica, D., Goeddel, D. V.** (1993b) 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.
- ten Hove, T., van Montfrans, C., Peppelenbosch, M. P., van Deventer, S. J.** (2002) Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* **50**, 206-211.
- Thanaraj, T. A., Clark, F., Muilu, J.** (2003) Conservation of human alternative splice events in mouse. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2544-2552.
- Vercammen, D., Vandenabeele, 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.
- Viale, G., Dell'Orto, P.** (1992) Non-radioactive nucleic acid probes: labelling and detection procedures. *Liver* **12**, 243-251.
- Vidaud, D., Vidaud, M., Bahnak, B. R., Siguret, V., Gispert, S. S., Laurian, Y., Meyer, D., Goossens, M., Lavergne, J. M.** (1993) Haemophilia B due to a de novo insertion of a human-specific Alu subfamily member within the coding region of the factor IX gene. *Eur.J.Hum.Genet.* **1**, 30-36.
- Wajant, H., Gerspach, J., Pfizenmaier, K.** (2005) Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 55-76.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P.** (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death.Differ.* **10**, 45-65.
- Wallach, D., Engelmann, H., Nophar, Y., Aderka, D., Kemper, O., Hornik, V., Holtmann, H., Brakebusch, C.** (1991) Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. *Agents Actions Suppl* **35**, 51-57.
- Wang, J., Al Lamki, R. S., Zhang, H., Kirkiles-Smith, N., Gaeta, M. L., Thiru, S., Poher, 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.
- Wang, T., Brown, M. J.** (1999) mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Anal.Biochem.* **269**, 198-201.
- Ware, C. F.** (2005) Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu.Rev.Immunol.* **23**, 787-819.

- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M. R., Brown, D. G., Brown, S. D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R. D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A. T., et al.** (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-562.
- Williams, B. R.** (1997) Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem.Soc.Trans.* **25**, 509-513.
- Williams, T. W., Granger, G. A.** (1968) Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species. *Nature* **219**, 1076-1077.
- Yi, P., Zhang, W., Zhai, Z., Miao, L., Wang, Y., Wu, M.** (2003) Bcl-rambo beta, a special splicing variant with an insertion of an Alu-like cassette, promotes etoposide- and Taxol-induced cell death. *FEBS Lett.* **534**, 61-68.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., Bartel, D. P.** (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33.
- Zav'yalov, V. P., Denesyuk, A. I., White, B., Yurovsky, V. V., Atamas, S. P., Korpela, T.** (1997) Molecular model of an alternative splice variant of human IL-4, IL-4 delta 2, a naturally occurring inhibitor of IL-4-stimulated T cell proliferation. *Immunol.Lett.* **58**, 149-152.
- Zavolan, M., Kondo, S., Schonbach, C., Adachi, J., Hume, D. A., Hayashizaki, Y., Gaasterland, T.** (2003) Impact of alternative initiation, splicing, and termination on the diversity of the mRNA transcripts encoded by the mouse transcriptome. *Genome Res.* **13**, 1290-1300.
- Zeng, Y., Wagner, E. J., Cullen, B. R.** (2002) Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol.Cell* **9**, 1327-1333.
- Zhou, B. R., Gumenscheimer, M., Freudenberg, M. A., Galanos, C.** (2005) Lethal effect and apoptotic DNA fragmentation in response of D-GalN-treated mice to bacterial LPS can be suppressed by pre-exposure to minute amount of bacterial LPS: dual role of TNF receptor 1. *World J.Gastroenterol.* **11**, 3398-3404.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Frau Prof. Dr. Daniela Männel für die Unterstützung und Förderung während der letzten drei Jahre. Die angeregten Diskussionen in den Mittwochseminaren und Journal Clubs haben nicht nur den wissenschaftlichen Blick auf die eigene Arbeit geschärft, sondern auch den Horizont darüber hinaus enorm erweitert.

Frau Prof. Dr. Claudia Steinem möchte ich für die Bereitschaft zur fakultätsinternen Vertretung der Arbeit danken, ohne die diese Promotion nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt in ganz besonderem Maße Herrn PD Dr. Thomas Langmann, sowie Bettina Hartl und Manfred Haas für die unglaubliche und unermüdliche Hilfe beim Etablieren und Interpretieren der quantitativen Real Time PCR.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlichst bei Frau Dr. Petra Hoffmann bedanken, die in vielerlei Hinsicht mein wissenschaftliches Arbeiten positiv beeinflusst hat.

Ein außerordentlich herzliches Dankeschön an Dorothea Weber-Steffens für die grenzenlose Unterstützung nicht nur in der Zellkultur, sowie an Silvia Seegers und Veronika Hochleitner für die gleichermaßen kompetente und freundschaftliche Einweihung in die Geheimnisse der Molekularbiologie.

Sabine Troppmann und Sigrid Appel gilt mein herzlicher Dank für die freundliche Aufnahme in „ihrem“ Labor, das mir einen ausgezeichneten Ausweich-Arbeitsplatz geboten hat, in dem so mancher graue Versuchstag aufgehellte wurde.

Lieben Dank an Kerstin Meier, Steffi Götz und Jutta Förster für die stete Unterstützung beim Sequenzieren.

Vielen Dank an Tina Böld, Dorothea Weber-Steffens, Dr. Bernd Echtenacher und Christian Dietrich, die Teile oder die ganze Arbeit Korrektur gelesen haben.

Nicht zu vergessen: Die einzige und wahre (m)icp-Gruppe! Lieben Dank an Dr. Christoph Scherübl und Monika Bäuml.

Meine tief empfundene Dankbarkeit gilt schließlich meinen Eltern, ohne deren jahrelange Unterstützung Vieles nicht möglich gewesen wäre. Diese Arbeit ist nicht minder ihr Verdienst!

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

.....
Andrea Hauser

