

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Universität Würzburg  
Abteilung für Molekulare Innere Medizin  
Leiter der Abteilung: Prof. Dr. Harald Wajant

# **Entwicklung und Charakterisierung von TNFR2-spezifischen Agonisten**

**Inaugural – Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von  
**Christina Geiger**  
aus Schweighofen

Würzburg, März 2017

---

**Eingereicht am:** .....

**Mitglieder der Promotionskommission:**

Referent: Prof. Dr. Harald Wajant (Med. Fakultät)

Koreferent: Prof. Dr. Christoph Otto

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag des Promotionskolloquiums:** 27.11.2017

**Doktorurkunde ausgehändigt am:** .....

Die Promovendin ist Zahnärztin.

---

Meinen Eltern und Großeltern,  
die mich unermüdlich unterstützt und motiviert haben.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation „Entwicklung und Charakterisierung von TNFR2-spezifischen Agonisten“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig mit Einhaltung der Regeln über gute wissenschaftliche Praxis und ohne Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung angefertigt, sowie keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,

Datum

Unterschrift (Christina Geiger)

## **Affidavit**

I hereby confirm that my dissertation entitled „Entwicklung und Charakterisierung von TNFR2-spezifischen Agonisten“ is the result of my own work without help or support from commercial consultants. All sources and materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg,

Date

Signature (Christina Geiger)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 10. Januar 2014 bis 31. Januar 2017 in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Harald Wajant angefertigt.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>IV</b>
<b>Affidavit.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Tumornekrosefaktor-Superfamilie .....	1
1.1.1 Die Rezeptoren der TNF-Superfamilie .....	2
1.1.1.1 Todesrezeptoren .....	3
1.1.1.2 TRAF-interagierende TNF-Rezeptoren .....	4
1.1.1.3 Decoy-Rezeptoren.....	5
1.1.2 Die Liganden der TNF-Superfamilie.....	6
1.2 Der Transkriptionsfaktor NFκB.....	8
1.2.1 Der klassische NFκB-Signalweg .....	10
1.2.2 Der alternative NFκB-Signalweg .....	11
1.3 TNF und seine Rezeptoren TNFR1 und TNFR2.....	14
1.3.1 TNF und dessen Interaktion mit TNFR2.....	14
1.3.2 TNFR2 stimuliert den alternativen NFκB-Signalweg .....	14
1.4 T-Lymphozyten .....	15
1.4.1 T-Helferzellen.....	15
1.4.2 Natürliche Killerzellen.....	16
1.4.3 Regulatorische T-Zellen .....	16
1.4.4 T-Zellen und Interleukin 2 .....	18
1.5 Ziel der Arbeit .....	18
<b>2 Material .....</b>	<b>20</b>
2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien.....	20
2.2 Zellen.....	21
2.2.1 Prokaryotische Zellen.....	21
2.2.2 Eukaryotische Zellen.....	22
2.2.3 Fusionsproteine und Plasmide .....	22

---

2.2.4	Antikörper.....	23
2.2.5	Enzyme .....	23
2.3	Verbrauchsmaterial und Geräte.....	24
2.4	Lösungen und Puffer .....	26
2.5	Kits.....	28
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.1	Klonierungen.....	29
3.1.1	Die Polymerase-Kettenreaktion.....	29
3.1.2	Gel-Aufreinigung von PCR-Produkten .....	30
3.1.3	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung .....	30
3.1.4	Ligation .....	31
3.1.5	Transformation der klonierten Vektoren in kompetente Zellen..	31
3.1.6	Animpfen für Plasmid-Minipräparation .....	32
3.1.7	Plasmid-Minipräparation .....	32
3.1.8	Kontrollverdau.....	32
3.1.9	Animpfen für Plasmid-Midipräparation .....	33
3.1.10	Plasmid-Midipräparation .....	33
3.1.11	Proben zur Sequenzierung vorbereiten.....	34
3.2	Arbeit mit eukaryotischen Zellen.....	34
3.2.1	Kultivierung adhärenter Zellen .....	34
3.2.2	Transiente Transfektion mittels Elektroporation .....	34
3.2.3	Transiente Transfektion mittels PEI .....	35
3.2.4	Isolation primärer Zellen.....	36
3.2.5	Kultivierung primärer Zellen .....	36
3.3	Proteinbiochemie.....	37
3.3.1	Westernblot.....	37
3.3.1.1	SDS-Page .....	37
3.3.1.2	Elektrotransfer von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran.....	38
3.3.1.3	Immundetektion.....	38
3.3.2	IL8 ELISA.....	39

3.3.3	Aufreinigung der Proteine .....	42
3.3.4	Silbergel .....	44
3.3.5	Homologe Kompletionsassays mit der Gaussia Princeps Luciferase und T-Zellen .....	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
4.1	Klonierung .....	46
4.2	Produktion der Konstrukte .....	52
4.3	Aufreinigung der produzierten Proteine .....	54
4.4	Funktionsüberprüfung der aufgereinigten Proteine.....	56
4.4.1	Charakterisierung der TNFR2-spezifischen TNF-Domäne mittels IL8-ELISA.....	56
4.4.2	Bindungsstudien.....	59
4.4.3	Evaluierung der IL2-Domäne mittels Bindungsstudie an IL2- Rezeptor-exprimierenden Zellen .....	59
4.4.4	Funktionalität der TNF80-Domäne der Fusionsproteine .....	61
4.4.5	Kompetition von TNF80(h)-Flag-IL2 mit TNF80-GpL .....	62
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>77</b>
8.1	DNA- und Aminosäuresequenzen der Fusionsproteine.....	77
8.1.1	scTNF80(mu)-Flag-IL2(mu).....	77
8.1.2	TNF80(mu)-Flag-IL2(mu) .....	78
8.1.3	TNF80(h)-Flag-IL2(h) .....	78
8.1.4	Gaussia-Flag-IL2(mu) .....	79
8.1.5	Gaussia-Flag-IL2(h) .....	79
	<b>Danksagung.....</b>	<b>80</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>81</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Todesrezeptoren der TNF-Superfamilie und ihre korrespondierenden Liganden .....	3
Abbildung 2:	Nicht-Todesrezeptoren der TNF-Superfamilie mit ihren korrespondierenden Liganden .....	5
Abbildung 3:	Klassischer versus alternativer NF $\kappa$ B-Signalweg.....	13
Abbildung 4:	schematische Darstellung von Membran- / Gel- / Whatmanpaperanordnung .....	38
Abbildung 5:	Zellaussaat in einer 96-Well-F-Bottom-Platte mit zwei verschiedenen Zelllinien.....	40
Abbildung 6:	Zellaussaat in einer 96-Well-F-Bottom-Platte mit einer einzigen Zelllinie .....	40
Abbildung 7:	Verdünnungsreihe mit einem zu testenden Konstrukt in einer 96 Well U-Bottom-Platte.....	41
Abbildung 8:	Schematischer Aufbau der in der Arbeit untersuchten Fusionsproteine .....	46
Abbildung 9:	Schematischer Prozessablauf zur Herstellung der benötigten Intermediatkonstrukte und Gelabbildungen zum Nachweis der durch PCR gewonnenen Amplicons.....	50
Abbildung 10:	Weiteres Vorgehen des Klonierungsprozesses nach Vorhandensein von Vektoren und Inserts sowie Gelabbildungen.....	51
Abbildung 11:	Westernblot-Analyse von a) TNF80(h)-Flag-IL2(h) und TNF80(mu)-Flag-IL2(mu) sowie von b) Fc-Flag-TNC-scTNF80(mu) und Fc(DANA)-Flag-TNC-scTNF80(mu) .....	52
Abbildung 12:	a) Westernblot-Analyse nach Aufreinigung der Fusionsproteine, beispielhaft dargestellt wurde TNF80(h)-Flag-IL2(h) .....	54
Abbildung 12:	b) Silberfärbung zur quantitativen und qualitativen Analyse der aufgereinigten Proteine.....	55



Abbildung 13: IL8-Induktion durch verschiedene TNF-Fusionsproteine vor und nach deren Aufreinigung .....	58
Abbildung 14: GpL-IL2-Kompetition mit IL2 und TNF80(h)-Flag-IL2(h). .....	60
Abbildung 15: Vergleich des GpL-Signals nach Zugabe von 50 ng/ml TNF80-Flag-GpL auf HT1080-Bcl2-Zellen und HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen .....	62
Abbildung 16: Die Funktionsfähigkeit der TNF80-Domäne innerhalb der generierten Fusionsproteine .....	63

## Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
APC	Antigen präsentierende Zelle
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
BAFFR	<i>B-cell activation factor of the tnf-family</i>
Bcl-3	<i>B-cell-lymphoma 3-encoded protein</i>
BCMA	<i>B-cell maturation antigen</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD27	T-cell activating antigen S152
CD40	<i>Cluster of differentiation 40-receptor</i>
CD40L	<i>T-B-cell-activating molecule</i>
CD95	TNFRSF6, <i>apoptosis-mediating surface antigen Fas</i>
CD95L	<i>Apoptosis-mediating surface antigen, Fas ligand</i>
cdc37-Protein	<i>Cell division cycle 37 homolog-protein</i>
ciAP	<i>Cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CIP	<i>Calf Intestine alkaline Phosphatase</i>
CRD	<i>Cysteine riche domain</i>
DC	<i>Cluster of Differentiation</i>
DcR1	Decoy-Rezeptor 1
DcR2	Decoy-Rezeptor 2
DcR3	Decoy-Rezeptor 3
DD	<i>Death domain</i>
DED	<i>Death effector domain</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	<i>Death receptor</i>
DR3	<i>Death receptor 3</i>
DR6	<i>Death receptor 6</i>
EDAR	<i>Ectodermal dysplasia receptor</i>
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N-N-tetraessigsäure

ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EP	Elektroporation
FADD	<i>Fas associated death domain protein</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FAP	<i>Fibroblast Activation Protein</i>
FCS	Fetal Calf Serum
Fn14	<i>fibroblast growth factor inducible 14</i>
FOXP3	Forkhead-Box-Protein-P3
g	Gramm
GITR	<i>Glucocorticoid-induced TNFR-related protein</i>
GpL	Gaussia Princeps Luciferase
h	Stunde
HSP90	<i>Heat shock protein-90</i>
hu	human
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IKK	I $\kappa$ B (Inhibitor von NF $\kappa$ B) Kinasekomplex
IKK $\alpha$	Inhibitor von NF $\kappa$ B-Kinase $\alpha$
IKK $\beta$	Inhibitor von NF $\kappa$ B-Kinase $\beta$
IL	Interleukin
I $\kappa$ B	inhibitorischen $\kappa$ B-Proteine
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Bakterienkulturmedium, Luria Bertani
LT $\beta$ R	Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptor
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
MHC-Komplex	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mu	Murin
NEMO	<i>NF-<math>\kappa</math>B-essential modifier</i>

NFκB	<i>Nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NIK	<i>NF-κB-inducing kinase</i>
NLS	<i>Nuclear localization sequence</i>
OX40	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4</i>
p50	NFκB1, Untereinheit p50
p52	NFκB2, Untereinheit p52
p56	<i>transcription factor p65</i>
p75-NGFR	<i>p75-nerve growth factor receptor</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEI	Polyethylenimine
PLAD	<i>Preligand assembly domain</i>
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>
RelB	<i>transcription factor RelB</i>
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RIP	<i>Receptor interacting protein</i>
RLU	<i>Relative Light Units</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	<i>Soluble</i>
sc	<i>Single chain</i>
SDS-Page	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sek	Sekunde
Tab	Tabelle
TACI	<i>Transmembran activator and clycophilin ligand interactor</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK1	<i>Transforming growth factor-β activated kinase</i>
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TCR	T-Zell-Rezeptor

TEMED	Tetramethylethyldiamin
TH	T-Helferzellen
TH1-Zellen	Typ1-T-Helferzellen
TH2-Zellen	Typ2-T-Helferzellen
TH3-Zellen	T-Helfer-Typ3-Zellen
THD	<i>TNF-homology-domain</i>
TIM	TRAF-interagierendes Motiv
TLA1	<i>Vascular endothelial growth inhibitor</i>
TNC	Tenascin-C
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFL	Tumornekrosefaktor-Ligand
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNFR1	<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>
TNFR2	<i>Tumor necrosis factor receptor 2</i>
TNFS	Tumornekrosefaktor-Superfamilie
T <sub>R</sub> 1	regulatorische T-Zellen Typ1
TRADD	<i>TNFR-associated death domain</i>
TRAF	<i>TNFR-associated factor</i>
TRAILR	<i>Tumornekrosis factor related apoptosis inducing ligand-receptor</i>
TRAILR1	<i>Tumornekrosis factor related apoptosis inducing ligand-receptor 1</i>
TRAILR2	<i>Tumornekrosis factor related apoptosis inducing ligand-receptor 2</i>
T <sub>regs</sub>	Regulatorische T-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TWEAK	<i>TNF-like weak inducer of apoptosis</i>
wt	Wildtyp

# 1 Einleitung

Bereits 1971 erklärte der amerikanische Präsident Richard Nixon in seiner Rede zur Lage der Nation den ‚Krieg gegen den Krebs‘. Dies belegt, dass sich die Wissenschaft schon über Jahrzehnte hinweg intensiv mit Forschung und klinischen Prüfungen im Bereich der Onkologie beschäftigt. (Lillehei, Liu et al. 1999)

Es ist Aufgabe des Immunsystems, den Körper vor Befall von Krankheitserregern und den damit einhergehenden Zell- und Gewebeschäden zu schützen. Bestehend aus verschiedenen Organen, Geweben und Zellen, erfüllt der Körper komplexe Mechanismen, die der Aufrechterhaltung von Funktion und Gesundheit dienen. Unter anderem spielen Proteine, Enzyme, Zytokine und Hormone, welche als Liganden und Rezeptoren agieren, eine wichtige Rolle für die Regulierung des Körpers.

Einer der vielen Bausteine des Körpers ist der Tumornekrosefaktor. Erstmals wurde er 1975 beschrieben, als man herausfand, dass er in Maus-Tumoren Nekrose induzierte und eine zytotoxische Wirkung auf die Tumorzellen hatte. (Carswell, Old et al. 1975) Daraufhin wurde der Tumornekrosefaktor testweise in der Tumorthherapie eingesetzt. Der erhoffte Erfolg blieb jedoch aus. (Bashyam 2007)

## 1.1 Die Tumornekrosefaktor-Superfamilie

Der Tumornekrosefaktor (TNF) spielt als pleiotropes Zytokin eine multifunktionelle Rolle im Immunsystem und ist an Prozessen wie Entzündungen, Infektionen und Fieber beteiligt. Liganden und Rezeptoren bilden zwei komplementäre Protein-Familien der Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNFS). Sie steuern Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie den programmierten Zelltod, die Apoptose. (Gaur and Aggarwal 2003, Wajant 2009) Die TNFS setzt sich aus 29 Rezeptoren (TNFR) und 19 Liganden (TNFL) zusammen. (Aggarwal 2003, Aggarwal, Gupta et al. 2012)

### 1.1.1 Die Rezeptoren der TNF-Superfamilie

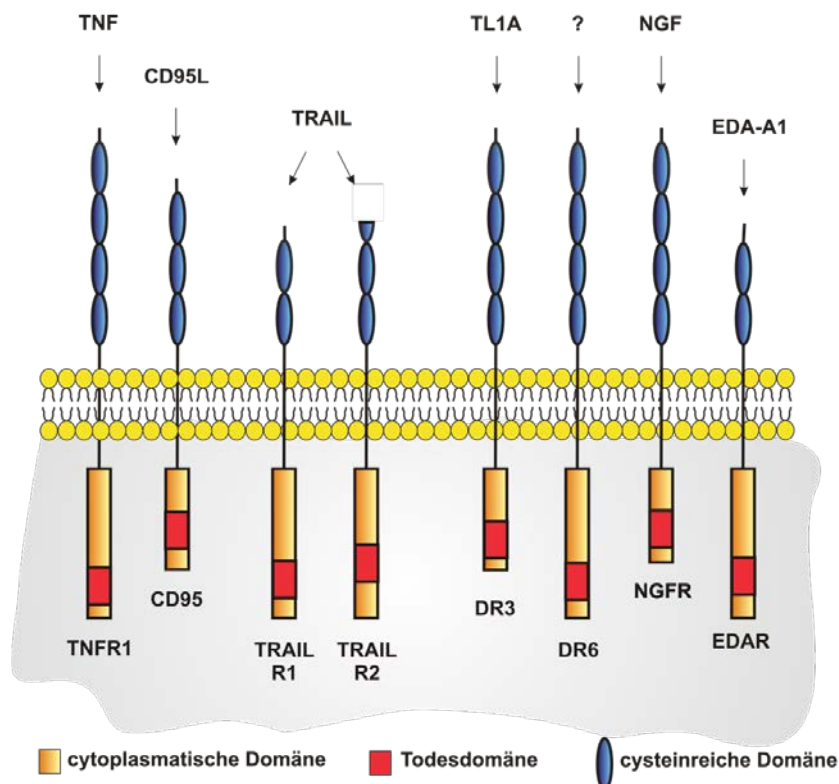
Ein Rezeptor ist ein einzelnes Protein oder ein Proteinkomplex, der innerhalb der Zelle bestimmte Signalwege aktivieren kann. Nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip kann ein Rezeptor seine korrespondierenden Liganden binden.

Die meisten TNF-Rezeptoren liegen strukturell als Typ-I-Transmembranproteine vor und verfügen über eine N-terminale extrazelluläre Domäne, die für die Ligandenbindung verantwortlich ist und eine C-terminale intrazelluläre Domäne, die intrazelluläre Signalwege zu stimulieren vermag. (Smith, Farrah et al. 1994, Locksley, Killeen et al. 2001, Bodmer, Schneider et al. 2002, Aggarwal 2003) Die Transmembrandomäne der TNF-Rezeptoren setzt sich aus 20 bis 30 Aminosäuren zusammen, bildet eine hydrophobe  $\alpha$ -Helix-Sekundärstruktur und durchquert einmal die Plasmamembran als *Singlepass*-Transmembranprotein. (Bodmer, Schneider et al. 2002) Den extrazellulären Teil der TNFR charakterisieren eine bis sechs cysteinreiche Domänen (*cysteine rich domain*, CRD), die ca. 40 Aminosäuren umfassen und typischerweise durch drei Cysteinbrücken miteinander verbunden sind. (Naismith and Sprang 1998, Bodmer, Schneider et al. 2002) CRDs sind verantwortlich für die Bindung der Rezeptoren (Chan, Chun et al. 2000) an die THD (TNF *homology domain*) der TNF-Liganden. (Smith, Farrah et al. 1994) Ein weiteres Kennzeichen von TNF-Rezeptoren ist die N-terminale PLAD (*preligand assembly domain*), welche die Bildung inaktiver Rezeptorkomplexe bedingt. (Chan 2000) Diese ligandenfreien TNFR-Komplexe binden dann die TNF-Liganden, was zur Reorganisation des Rezeptorkomplexes und anschließend zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege führt. Die Signaltransduktion erfolgt mit Hilfe zyttoplasmatischer Adaptermoleküle, wie z.B. TNF-Rezeptor assoziierte Faktoren (TRAFs) oder *death domain* (DD)-enthaltende Proteine. (Bradley and Pober 2001, Ha, Han et al. 2009)

Anhand ihrer funktionellen und strukturellen Gemeinsamkeiten können die Rezeptoren in drei Kategorien eingeteilt werden: In Todesrezeptoren, Nicht-Todesrezeptoren und in Decoy-Rezeptoren.

### 1.1.1.1 Todesrezeptoren

Bisher wurden acht Todesrezeptoren identifiziert, zu welchen TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*), TRAILR1 (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand-receptor 1*), TRAILR2 (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand-receptor 2*), DR3 (*death receptor 3*), DR6 (*death receptor 6*), p75-NGFR (*p75-nerve growth factor receptor*), EDAR (*ectodermal dysplasia receptor*) und CD95 (*cluster of differentiation 95*) zählen. (Wajant 2003) Die Todesrezeptoren weisen im C-terminalen Bereich eine konservierte Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die bereits erwähnte Todesdomäne (*death domain*, DD) auf. Diese ist 70-80 Aminosäuren lang und induziert mit Hilfe von spezifischen Proteasen (sogenannten Caspasen) oder durch Rekrutierung von DD-tragenden Adaptermolekülen Apoptose. (Ashkenazi and Dixit 1998, Fesik 2000, Bodmer, Schneider et al. 2002) Ihrem Namen entsprechend sind sie in der Lage Apoptose schnell und effizient zu induzieren. (Kumar, Herbert et al. 2005)



**Abbildung 1: Todesrezeptoren der TNF-Superfamilie und ihre korrespondierenden Liganden**  
 Details sind im Text beschrieben.

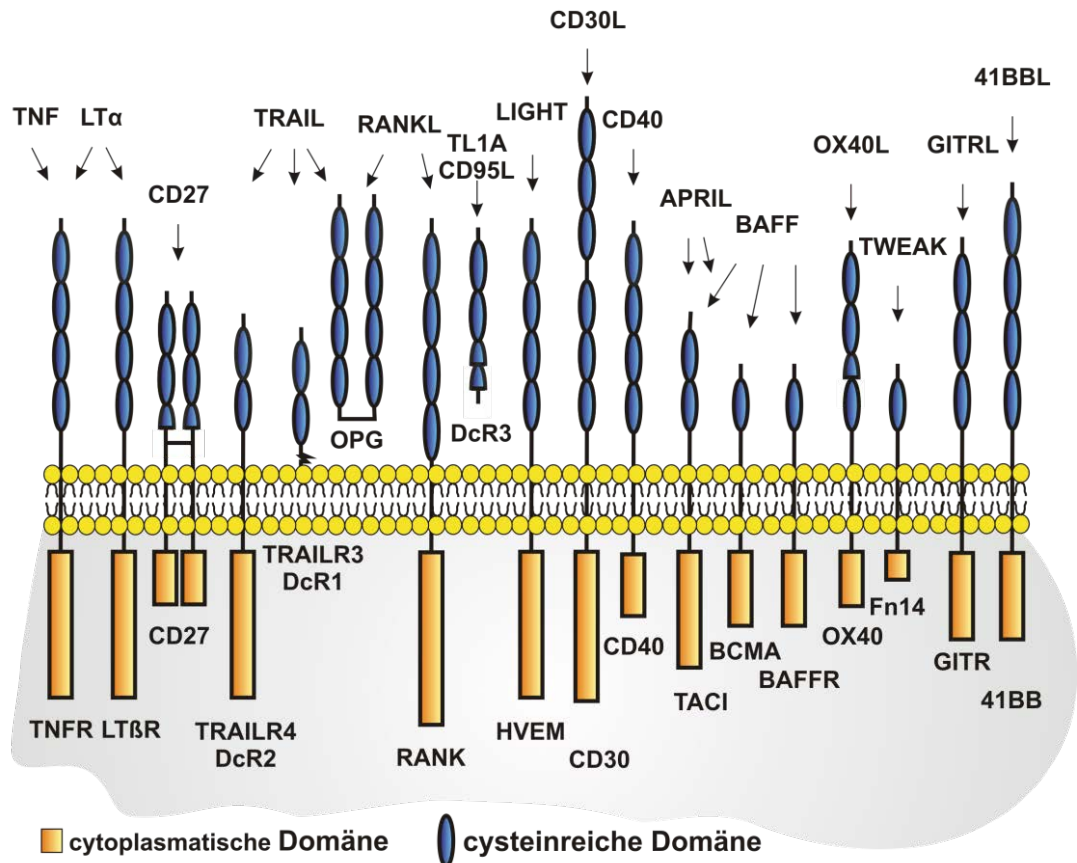


### 1.1.1.2 TRAF-interagierende TNF-Rezeptoren

Die TRAF (*TNFR associated factor*) -interagierenden TNF-Rezeptoren werden auch als Nicht-Todesrezeptoren bezeichnet und sind TNF-Rezeptoren ohne DD, die ein TRAF-interagierendes Motiv (TIM) in ihrer zytoplasmatischen Domäne besitzen. Die Stimulierung der Nicht-Todesrezeptoren erlaubt TRAF-Molekülen an die zytoplasmatische TIM-Domäne zu rekrutieren, was schließlich zur Aktivierung unterschiedlichster Signalkaskaden wie z.B. dem NF- $\kappa$ -B-Signalweg führt. Zur Gruppe der Nicht-Todesrezeptoren gehören z.B. CD27, 41BB, GITR und OX40. Diese sind an der Aktivierung von unterschiedlichen MAPK-Kaskaden (*mitogen-activated protein kinase*) und auch an der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren des NF $\kappa$ B-Systems (*nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) beteiligt. (Wajant, Grell et al. 1999, Locksley, Killeen et al. 2001) Ihre Funktionen sind sehr vielfältig. Während z.B. CD27, 41BB und OX40 direkt auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wirken und T-Zell-Funktionen kontrollieren (Croft 2003, Croft 2009), spielt CD40 eine wichtige Rolle bei der Kostimulation von antigenpräsentierenden Zellen wie z.B. dendritischen Zellen und B-Zellen und kann sowohl proapoptotische als auch antiapoptotische Signalwege beeinflussen. (Vonderheide 2007)

Weitere strukturelle Abweichungen zeigen z.B. der BCMA (*B-cell maturation antigen*), TACI (*transmembran activator and clycophilin ligand interactor*) und BAFFR (*B-cell activation factor of the tnf-family*), die im Gegensatz zu den anderen membranständigen Rezeptoren Typ-III-Transmembranproteine sind, da sie keine Signalpeptidsequenz aufweisen. (Bodmer, Schneider et al. 2002)

Eine Übersicht der Nicht-Todesrezeptoren mit korrespondierenden Liganden ist in Abbildung 2 gezeigt.



**Abbildung 2: Nicht-Todesrezeptoren der TNF-Superfamilie mit ihren korrespondierenden Liganden**  
 Details sind im Text beschrieben.

### 1.1.1.3 Decoy-Rezeptoren

Sogenannte Decoy-Rezeptoren (Köderrezeptoren) liegen entweder als lösliche Moleküle vor, oder sind über einer nicht funktionsfähigen Todesdomäne membranassoziiert. Sie dienen als Köderrezeptoren der Todes- und Nicht-Todesrezeptoren, indem sie mit diesen um Liganden konkurrieren oder inaktive heterotriomere Komplexe bilden. Dadurch sind sie in der Lage Liganden anderer TNF-Rezeptoren zu binden und zu sequestrieren. (S.T.Eichhorst 2013) Decoy-Rezeptoren tragen hierdurch unter anderem zum Schutz der Zellen vor ungewollter Zell-Zerstörung oder vor dem Zelltod durch Nachbarzellen bei. Beispielhaft sind die Oberflächenrezeptoren DcR1 (Decoy-Rezeptor 1) und DcR2 (Decoy-Rezeptor 2), die TRAIL in hoher Affinität binden, jedoch nicht die Fähigkeit besitzen Apoptose zu induzieren. Währenddessen wird die Fas-induzierte Apoptose durch

den DcR3 (Decoy-Rezeptor 3) inhibiert. (Kumar, Herbert et al. 2005) Lösliche Rezeptoren können außerdem durch proteolytische Prozesse oder durch alternatives Splicen entstehen.

### 1.1.2 Die Liganden der TNF-Superfamilie

Während die meisten Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie Typ-I Transmembranproteine sind, sind die Liganden der TNF-Superfamilie im Menschen (mit Ausnahme von TLA1 [*Vascular endothelial growth inhibitor*] und Lymphotoxin  $\alpha$ ) Typ-II Transmembranproteine, welche durch 18 Gene kodiert werden. (Bodmer, Schneider et al. 2002) Charakteristisch für die TNF-Liganden ist die extrazelluläre carboxyterminale „TNF-Homologiedomäne“ (*TNF homology domain, THD*), welche für die Rezeptorbindung verantwortlich ist und eine nicht kovalente Trimerisierung der Liganden ermöglicht. Die TNF-Liganden weisen eine Sequenzhomologie von 20-30% auf. (Bodmer, Schneider et al. 2002, Aggarwal 2003) Die THD besteht aus 150 Aminosäuren und bildet eine Form von zwei übereinander angeordneten  $\beta$ -Faltblättern, deren zusammengelagerte Struktur der antiparallelen tertiären Faltung einer Biskuitrolle (*jelly roll*) ähnelt. (Fesik 2000)

Die zwischen Extrazellulär- und Transmembrandomäne liegende *stalk*-Region, in variabler Länge und Struktur, besitzt eine Erkennungssequenz für unterschiedliche Proteasefamilien (z.B. Furin- oder Matrixmetalloproteasen). Somit können durch alternatives Splicen oder durch proteolytische Prozessierung innerhalb der *stalk*-Region lösliche Formen der TNF-Liganden generiert werden. (Locksley, Killeen et al. 2001, Bodmer, Schneider et al. 2002) TNF-Liganden können in löslicher, als auch in membranständiger Form an ihre korrespondierenden Rezeptoren binden, wobei die Liganden in beiden Fällen als Trimere vorliegen. Die biologische Aktivität von TNF-Rezeptoren variiert Typ-abhängig, je nachdem ob diese mit membrangebundenen TNF-Liganden oder mit löslichen TNF-Liganden interagieren. Zum einen gibt es die Möglichkeit, dass die membrangebundene als auch die lösliche TNF-Ligand-Variante an den korrespondierenden Rezeptor binden und dieser dadurch aktiviert wird (z.B. TNF an TNFR1). (Grell, Douni et

al. 1995) Weiterhin besteht aber auch die Möglichkeit, dass der membranständige Ligand an den korrespondierenden Rezeptor bindet und ihn aktiviert, während die lösliche Ligandenform nach Rezeptorbindung nur eine moderate biologische Aktivität auslöst (z.B. TNF an TNFR2, CD95L an CD95 oder TRAIL an TRAILR2). (Grell, Douni et al. 1995, Schneider, Holler et al. 1998, Wajant, Moosmayer et al. 2001) Studien zeigten jedoch, dass nicht aktive, lösliche TNF-Liganden durch Immobilisierung an der Zelloberfläche oder durch Oligomerisierung in eine Form umgewandelt werden können, die dieselbe Aktivität wie die membranständigen Liganden aufweist (Muller, Wyzgol et al. 2008, Wyzgol, Muller et al. 2009):

**Tabelle 1: Liganden der TNF-Superfamilie mit zugehörigen Todes- und Nicht-Todesrezeptoren**

Zusammenfassung der Liganden mit korrespondierenden Rezeptoren nach (Bodmer, Schneider et al. 2002)

<b>Liganden- Abkürzung</b>	<b>Vollständiger Name des Liganden</b>	<b>Abkürzung des korres- pondierenden Rezeptors</b>
4-1BBL	<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 9</i>	4-1BB
APRIL	<i>a proliferation-inducing ligand</i>	BCMA, TACI
BAFF	<i>B-cell-activating factor</i>	BCMA, TACI, BAFF-R
CD27L	<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 7</i>	CD27
CD30L	<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 8</i>	CD30
CD40L	<i>T-B-cell-activating molecule</i>	CD40
CD95L	<i>apoptosis-mediating surface antigen Fas ligand</i>	DcR3, CD95
EDA-A1	<i>ectodermal dysplasia protein 1</i>	EDAR
EDA-A2	<i>ectodermal dysplasia protein 2</i>	XEDAR

<b>Liganden- Abkürzung</b>	<b>Vollständiger Name des Liganden</b>	<b>Abkürzung des korres- pondierenden Rezeptors</b>
GITRL	<i>glucocorticoid-induced TNF-related ligand</i>	GITR
LIGHT	<i>herpes virus entry mediator ligand</i>	LTβR, HVEM, DcR3
LTα	<i>lymphotoxin alpha</i>	TNFR1, TNFR2, HVEM
LTα1β2	<i>lymphotoxin alpha 1/ beta 2</i>	LTβR
OX40L	<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 4</i>	OX40
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>	RANK, OPG
TL1A	<i>TNF ligand-related molecule 1</i>	DR3
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>	TNFR1, TNFR2
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>	TRAILR1-4, OPG
TWEAK	<i>TNF-related weak inducer of apoptosis</i>	Fn14

## 1.2 Der Transkriptionsfaktor NFκB

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die die Transkription, d.h. das Ablesen eines Gens und die anschließende Vervielfältigung als RNA-Molekül, als Aktivatoren oder Repressoren beeinflussen.

NFκB (*nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells*) ist eine Gruppe in allen Zellen vorkommender dimeren Transkriptionsfaktoren, die sehr viele unterschiedliche Aufgaben vermitteln kann, wie z.B. Zellproliferation, Apoptose, Zellreifung, Zelldifferenzierung und die Regulation einer Immunantwort. (Li and Verma 2002, Li and Lin 2008) Folglich wird NFκB in Zusammenhang mit etlichen Krankheitsbildern wie z.B. entzündungsassoziierten Krebserkrankungen, chronischem Leiden und Autoimmunerkrankungen gebracht. Hierdurch

wird der Erforschung von NFκB und seinen Zielgenen (z.B. TNF, Interleukin1, Interleukin6, *B-cell lymphoma protein 2* und die Cyclooxygenase 2) eine große Bedeutung zugeschrieben. (Ghosh, May et al. 1998, Li and Verma 2002, Dutta, Fan et al. 2006, Baud and Karin 2009) Wird der Transkriptionsfaktor NFκB über TNF aktiviert, führt dies zur IL8-Produktion, was folglich als NFκB *read out* z.B. beim IL8-ELISA dienen kann.

NFκB bilden sich als Dimere aus fünf Proteinen, deren gemeinsames Merkmal eine 300 Aminosäuren lange Rel-Homologie-Domäne (RHD) ist: NFκB1 (p50), NFκB2 (p52), RelA (p65), RelB und c-Rel. (Moynagh 2005, Hayden and Ghosh 2008) In unterschiedlichen Kombinationen können jeweils zwei Untereinheiten Dimere bilden. NFκB1 codiert ein 105 kDa schweres Protein (p105), welches nach Spaltung zu einem 50 kDa schweren Protein (p50) wird. NFκB2 codiert ein 100 kDa schweres Protein (p100) und verfügt über p100, das zu einem aktiven p52 prozessiert werden kann. (Bonizzi and Karin 2004) Ohne Stimulation interagieren in den Zellen inhibitorischen κB-Proteine (IκB-Proteine) mit den NFκB-Homo- und Heterodimeren. Charakteristisch für die IκB-Proteine sind die *ankyrin repeats*, die die Bindung zu den NFκB-Transkriptionsfaktoren ermöglichen. Die für die NFκB-Regulation essentielle IκB-Familie setzt sich aus IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε und Bcl-3 (*B-cell-lymphoma 3-encoded protein*) zusammen. IκB-Proteine maskieren die Kernlokalisationssequenz (*nuclear localization sequence; NLS*) der NFκB-Dimere und halten sie hierdurch im Zytoplasma zurück. (Moynagh 2005) Die Regulation von NFκBs erfordert einen aktiven Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma, wobei die NLS eine essentielle Funktion hat.

NFκB kann durch viele verschiedene Stimuli aktiviert werden, was hauptsächlich der Adaption der Zelle an Stresssituationen dient. Dementsprechend wirken Zytokine wie z.B. TNF oder Interleukin1 (IL1) sowie Bakterien und Viren stimulierend auf NFκB. Typische Aktivierungsauslöser sind neben den membranständigen Rezeptoren auch intrazelluläre Stressoren wie UV-Strahlung oder DNA-Schäden. (Karin and Ben-Neriah 2000) Die Aktivierung von NFκB-Dimeren kann entweder über den klassischen oder den alternativen Signalweg erfolgen. (Bonizzi and Karin 2004)

### 1.2.1 Der klassische NFκB-Signalweg

Der klassische NFκB-Signalweg ist an der Kontrolle von Entzündungen beteiligt. Außerdem dient er der Regulierung von Zellüberleben und Zellproliferation. (Demchenko and Kuehl 2010)

Die Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges führt mit Hilfe von IκB-Kinasen zur Phosphorylierung und Degradierung von IκBs. Dies wiederum führt zum Import von NFκB in den Zellkern, wo es an die DNA bindet und hierdurch die Gentranskription aktiviert. (Bonizzi and Karin 2004)

Bindet TNF an TNFR1, so wird der klassische NFκB-Signalweg wie in Abbildung 3 dargestellt, aktiviert. Die Rezeptormoleküle lagern sich zu Trimeren zusammen, woraufhin das Adapterprotein TRADD (*TNFR-associated death domain*) und die DD enthaltende Kinase RIP (*receptor interacting protein*) an die intrazelluläre Todesdomäne des TNFR1 binden. Anschließend bindet TRADD TRAF2 (*TNF associated factor*) oder nach Freisetzung ins Zytoplasma FADD (*Fas-associated death domain*). Über die TRAF2-Bindung wirken TRAF2-assoziierte E3-Ligasen cIAP1 und cIAP2 und RIP1 aktivierend auf TAK1 (*transforming growth factor-β activated kinase*) und MEKK3 (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*). Darauf folgend kommt es zur Rekrutierung des IKK-Komplexes, wobei RIP die katalytischen Untereinheiten des IκB-Kinase-Komplexes (IKK) über MEKK3 aktiviert. (Yang, Lin et al. 2001) Dieser aktive IKK-Komplex ist ein Serin/Threonin-Kinase-Komplex, bestehend aus IKKα, IKKβ, dem regulatorischen Teil IKKγ, der auch NEMO (*NF-κB-essential modifier*) genannt wird, einem HSP90-Homodimer (*heat shock protein-90*) und einem HSP90-assoziierten cdc37-Protein (*cell division cycle 37 homolog-protein*). (Chen, Cao et al. 2002) Es kommt zur Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und schließlich zum Abbau von IκBs durch das Proteasom, was die Demaskierung des NLS von NFκBs und zu deren Translokation in den Zellkern zur Folge hat. (Hacker and Karin 2006)

Binden TRADD und RIP sekundär an FADD, so führt dies zur Aktivierung des Apoptose-Signalweges. An die Todeseffektordomäne (*death effector domain; DED*) von FADD bindet schließlich die Procaspase 8, welche ebenfalls eine DED

enthält. Autokatalytisch aktiviert diese sich zur reifen heterotetrameren Caspase 8, was Apoptose induziert.

### 1.2.2 Der alternative NFκB-Signalweg

Der alternative NFκB-Signalweg spielt eine wichtige Rolle für die Organentwicklung, die lymphatische Entwicklung und die B-Zell-Reifung. (Demchenko and Kuehl 2010, Wajant and Scheurich 2011)

Die Komponenten, welche für die Aktivierung des alternativen NFκB-Signalweges zuständig sind, unterscheiden sich signifikant von denen des klassischen NFκB-Signalweges, da sie in der Lage sein müssen die p100-Prozessierung zu stimulieren. (Sun 2011) Bindet z.B. der Ligand TWEAK (*TNF-like weak inducer of apoptosis*) an Fn14 (*fibroblast growth factor inducible 14*), einem 102-Aminosäuren langen membranständigen Rezeptor der TNF-Familie, so führt dies zur Aktivierung des alternativen NFκB-Signalweges. (Winkles 2008) Ebenso sind CD40 (*cluster of differentiation 40-receptor*) (Coope, Atkinson et al. 2002), TNFR2, LTβR (Lymphotoxin-β-Rezeptor) (Dejardin, Droin et al. 2002), RANK (*receptor activator of nuclear factor kappa-B*) und BAFFR (*B-cell activating factor*) (Claudio, Brown et al. 2002) in der Lage den alternativen NFκB-Signalweg zu stimulieren. (Dejardin 2006) Infolge dessen kommt es zur Rekrutierung und oft auch zur Degradation von TRAF2-Molekülen und der mit TRAF-assoziierten E3-Ligasen cIAP1 und cIAP2. Da letztere die Kinase NIK (*NFκB-inducing kinase*) für die Degradation durch das Proteasom markieren, führt dies zur Akkumulation von NIK, welche wiederum die Kinase IKKα aktiviert, die schließlich die Serinreste S866 und S870 von p100 phosphoryliert. (Sun 2011) Auf diese Weise werden aus dem Vorläufermolekül p100 *ankyrin repeats* durch Proteasen abgespalten und das aktive p52-Molekül entsteht. (Fusco, Savinova et al. 2008) Einen Komplex bildend mit RelB, gelangt p52 als p52/RelB-Heterodimer in den Zellkern um Gene zu aktivieren, die mit der Entwicklung unter anderem von lymphatischen Organen im Zusammenhang stehen.

Deutlich differierend ist die Kinetik des alternativen NFκB-Signalweges zu der des klassischen NFκB-Signalweges: Während der klassische NFκB-Signalweg



aufgrund einer beschleunigten, von der IKK $\beta$ -Aktivierung abhängigen Mobilisation, schnell und kurzlebig aktiv ist, erfolgt die Stimulierung des alternativen NF $\kappa$ B-Signalweges langsam, abhängig von der Proteinbiosynthese, aber anhaltend. (W.N.Khan 2009)

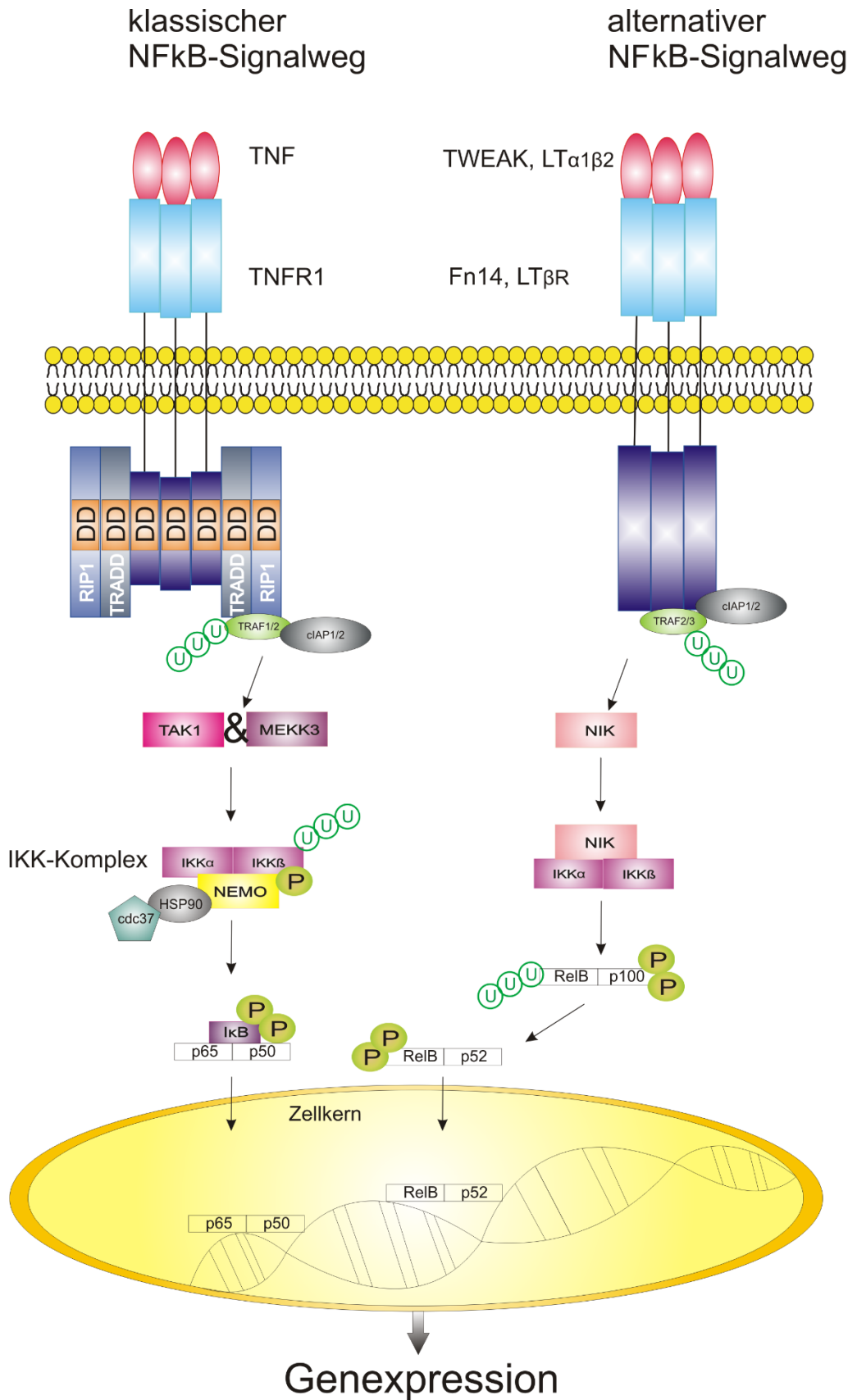


Abbildung 3: Klassischer versus alternativer NFκB-Signalweg

### **1.3 TNF und seine Rezeptoren TNFR1 und TNFR2**

Das proinflammatorische Zytokin TNF reguliert Zelleffekte natürlicherweise mit Hilfe von TNFR1 und TNFR2, die beide zur TNF-Rezeptor-Superfamilie gehören. TNFR1 (55 kDa), der eine Todesdomäne besitzt, ist ubiquitär auf den unterschiedlichen Zelltypen exprimiert, während TNFR2 (75kDa), der keine Todesdomäne besitzt, ausschließlich auf Zellen des Immunsystems, Endothelzellen und Nervenzellen vorkommt. (Heller and Kronke 1994, Aggarwal, Gupta et al. 2012)

Um die TNF-Rezeptoren spezifisch aktivieren zu können, entwickelte man TNF-Mutanten wie z.B. TNF80 als Mutationsvariante von TNF, welche ausschließlich an TNFR2 bindet und TNF60, das spezifisch an TNFR1 bindet. Die Zahl 80 bzw. 60 beschreibt den Umstand der Größe der Rezeptoren.

Wie unter 1.1.2. bereits erwähnt, kommt TNF sowohl in membrangebundener, als auch in löslicher Form vor. Während TNF in membrangebundener Form in der Lage ist durch TNFR1, als auch durch TNFR2 ausgelöste Signalwege zu aktivieren, kann die lösliche, trimere Form des TNF ausschließlich TNFR1 aktivieren und zeigt wenig Einfluss auf die Stimulierung von TNFR2. (Grell 1995)

#### **1.3.1 TNF und dessen Interaktion mit TNFR2**

Sobald TNFR2 mittels TNF aktiviert wird, ist es in der Lage die Proliferation von Myofibroblasten zu stimulieren (Theiss, Simmons et al. 2005) sowie das Wachstum von Epithelzellen und den im Pankreas vorkommenden Langerhans-Zellen zu beeinflussen. (Takayama, Yokozeki et al. 1999, Corredor, Yan et al. 2003) Weiterhin kann TNF über TNFR2 zur Expansion von T<sub>regs</sub> (regulatorische T-Zellen) führen. (Chopra, Riedel et al. 2013)

TNFR2 interagiert direkt mit TRAF2 und kann TRAF1 via TRAF2 rekrutieren. (Wajant, Grell et al. 1999, Bradley and Pober 2001, Ha, Han et al. 2009)

#### **1.3.2 TNFR2 stimuliert den alternativen NFκB-Signalweg**

Während die Wissenschaft früher davon ausging, dass der alternative NFκB-Signalweg nur über bestimmte Rezeptoren wie z. B. Fn14, BAFF-R, CD27, LTβR,

CD40 und TNFR2 (Coope, Atkinson et al. 2002, Scheidereit 2006, Sun Shao-Cong 2008, Rauert, Wicovsky et al. 2010) auszulösen ist, konnten Forscher zeigen, dass TNF auch über TNFR1 indirekt auf den alternativen Signalweg einwirken kann indem es p100 über den klassischen NFκB-Signalweg hochreguliert. (Ramakrishnan, Wang et al. 2004)

## 1.4 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten (T-Zellen) sind gemeinsam mit den B-Lymphozyten für die erworbene Immunabwehr des Körpers verantwortlich. Als Teil der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) stellen sie gemeinsam mit den roten Blutkörperchen und den Thrombozyten die zelluläre Abwehr dar. Der Begriff „T“-Zellen deutet auf den Reifungsort, nämlich den Thymus hin, während „B“-Zellen im Knochen (*bone*) heranreifen. Aufgabe der T-Zellen ist, eindringende Fremdstoffe wie Infektionserreger, aber auch pathologisch veränderte Zellen wie z.B. Tumorzellen zu erkennen und daraufhin zu eliminieren. T-Zellen verfügen über einen sogenannten T-Zell-Rezeptor (TCR), welcher Antigene über Antigen-präsentierende Zellen (APC) identifiziert. Über charakterisierende Oberflächenmoleküle wie den *Cluster of differentiations* wird eine feste Vernetzung zwischen T-Zelle und APC ermöglicht. Aufgabenspezifisch können T-Zellen in drei Untergruppen unterteilt werden: T-Helferzellen, natürliche Killerzellen und regulatorische T-Zellen.

### 1.4.1 T-Helferzellen

T-Helferzellen sind unterteilbar in Typ1-T-Helferzellen (TH1) und in Typ2-T-Helferzellen (TH2), die beide durch das CD4-Oberflächenantigen (*Cluster of Differentiation 4*) gekennzeichnet sind. Aus den Vorläuferzellen (TH0) entwickeln sich nach IL12-Einwirkung (Interleukin12) TH1-Zellen, die in der zellvermittelten Immunität eine bedeutende Rolle spielen, während sich TH0-Zellen nach Einwirkung von IL4 (Interleukin4) zu TH2-Zellen ausbilden, welche die humorale Antwort steuern. (Berghoff 2011)

Die Aktivierung von T-Helferzellen erfolgt durch Bindung eines TCR an eine APC. Makrophagen z.B. zählen zu den APC. Sie sind Teil der angeborenen Immunabwehr und gehören zu den Fresszellen des Körpers. Mikroorganismen werden von Makrophagen erkannt und phagozytiert. Nach intrazellulärer Zerkleinerung des Erregers werden Anteile an die Makrophagenoberfläche transportiert, um das Antigen hier mit Hilfe eines MHC-II-Komplexes (*Major Histocompatibility Complex*) den Zellen der erworbenen Abwehr zu präsentieren. Nach Aktivierung der T-Helferzellen signalisieren sie dem Phagozyten die infizierte Zelle zu zerstören und sekretieren IL2 (Interleukin2), was zu Differenzierung und Proliferation weiterer T-Zellen führt. Des Weiteren fördert eine IL2-Sekretion auch die Reifung von B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen, weshalb IL2 unter anderem T-Zell-Wachstumsfaktor (*T-cell growth factor*) genannt wird.

#### **1.4.2 Natürliche Killerzellen**

Wie auch die T-Helferzellen stellen die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) eine Untergruppe der T-Lymphozyten dar. Sie zählen zu Zellen des angeborenen Immunsystems und verfügen im Gegensatz zu T-Helferzellen über keinen Antigen-spezifischen Rezeptor. Die Aufgabe der NK-Zellen besteht in der Kontrolle viraler Infektionen und von Tumorwachstum, indem sie Tumorzellen, virusinfizierte Zellen sowie andere pathologisch veränderte Zellen erkennen und vernichten. Zytokine wie IL2, IL12, IL15, IL18, IL21 und Interferon Typ1 tragen einen entscheidenden Teil zur Reifung, Aktivierung und zum Überleben der NK-Zellen bei. (Zwirner and Domaica 2010)

#### **1.4.3 Regulatorische T-Zellen**

Regulatorische T-Zellen ( $T_{regs}$ ) tragen die Verantwortung für die Regulierung der Immunantwort und das Gleichgewicht des Immunsystems. (Vignali, Collison et al. 2008) Im Normalzustand können sie überschießende Reaktionen des Immunsystems unterdrücken und somit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (z.B. Diabetes Typ1), oder auch chronisch entzündlichen Erkrankungen (wie z.B. Asthma) vorbeugen. Eine gestörte Funktion oder eine erhöhte Anzahl der  $T_{regs}$  führt zu verminderter Immunität, wodurch z.B. das Tumorwachstum präferiert

werden kann. (Cools, Ponsaerts et al. 2007, Vignali, Collison et al. 2008) Eine verminderte Anzahl an T<sub>regs</sub> kann das Entstehen von Autoimmunerkrankungen begünstigen. Des Weiteren beeinflussen T<sub>regs</sub> die Toleranz des Körpers gegenüber Transplantaten, Infektionskrankheiten und Allergien. (Dasgupta and Saxena 2012) Verschiedene Subpopulationen von T<sub>regs</sub> wurden bisher entdeckt, die basierend auf der Expressierung von spezifischen Markern auf der Zelloberfläche, an der Zytokinproduktion und Funktionsmechanismus unterschieden werden. (Cools, Ponsaerts et al. 2007) Das sind zum Einen im Thymus entstehende CD4<sup>+</sup>-CD25<sup>+</sup>-T<sub>regs</sub>, die charakteristisch den Transkriptionsfaktor FOXP3 (Forkhead-Box-Protein-P3) exprimieren und über immunsuppressive Eigenschaften verfügen. Zum Anderen beweisen Studien die Existenz von Antigen-induzierten, anpassungsfähigen regulatorischen T-Zellen von Typ 1 (TR1-Zellen), die durch Expression von immunsupprimierenden Zytokinen wie das Interleukin10 (IL10) oder den *transforming growth factor-beta* (TGF-β) identifizierbar sind. (Cools, Ponsaerts et al. 2007) Charakteristisch für die Antigen-induzierten T<sub>regs</sub> ist die Expression des Oberflächenmoleküls CD4, wodurch sie als CD4<sup>+</sup> beschrieben werden. Erkennbar ist diese Subpopulation somit durch die typische, außerordentlich hohe Sekretion von IL10, einer moderaten Sekretion von IL5, IFN-γ (Interferon-γ), TGF-β und aufgrund der Tatsache, dass sie IL2- und IL4-negativ sind. (Roncarolo, Bacchetta et al. 2001, Roncarolo, Gregori et al. 2006, Cools, Ponsaerts et al. 2007)

Eine weitere zu differenzierende Untergruppe der regulatorischen T-Zellen sind die T-Helfer-Typ3-Zellen (TH3), welche eine außerordentlich hohe TGF-β-Produktion aufweisen. (Weiner 2001, Faria and Weiner 2006) Orale Toleranz nennt man ein Phänomen, was besagt, dass eine Sekretion von immunsupprimierenden Zytokinen wie TGF-β, IL4 und IL10 nur nach oraler, nicht nach systemischer Antigenzufuhr erfolgt und hierdurch eine gezielte Unterdrückung systemischer Immunantworten erfolgt. (Weiner, Friedman et al. 1994)

#### 1.4.4 T-Zellen und Interleukin 2

Interleukin 2 ist als Peptidhormon, bestehend aus einer einzelnen Polypeptidkette aus 133 Aminosäuren, der großen Familie der Interleukine zugehörig und wird von aktiven T-Zellen produziert. (Land 2006) IL2 bindet spezifisch an einen aus drei Einheiten ( $\alpha$ -, $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit) bestehenden IL2-Rezeptor, welcher hauptsächlich auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird. Während die  $\beta$ - (CD122) und  $\gamma$ - Untereinheit (CD132) konstant auf der T-Zelloberfläche vorhanden sind, wird die  $\alpha$ -Untereinheit (CD25) erst aktiviert, nachdem die betroffene T-Zelle durch ein Antigen aktiviert wurde. Sind alle drei Untereinheiten des IL2-Rezeptors auf der Membran der T-Zelle aktiv, so steigt die Bindungsaffinität für IL2. Diese Bindung ist Auslöser vieler Mechanismen, die zur Immunantwort gehören. Hierzu zählt z.B. - wie zuvor schon erwähnt - die Proliferation und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten, die Proliferation von NK-Zellen und die Stimulation der Zytotoxizität von Makrophagen. (Siegel, Sharon et al. 1987) Des Weiteren wird durch IL2 die Produktion von TNF, Interferonen und anderen Interleukinen angeregt.

Bereits seit 1984 wird Interleukin 2 als Medikament für die Krebsimmuntherapie getestet. Bei Nierenzellkarzinomen, sowie malignen Melanomen konnte ein erfolgreicher Therapieeinsatz des Aldesleukins nachgewiesen werden, da Zellen des Immunsystems aktiviert werden, welche in der Lage sind die Tumorzellen zu vernichten.

#### 1.5 Ziel der Arbeit

Damit lösliches TNF auch TNFR2 aktiviert, entwickelte man in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin in Würzburg eine kovalent verknüpfte, nonamere Form von TNF, die *single-chain*-TNF-TNC-Form. TNC ist eine Trimerisierungsform mit deren Hilfe drei als *single-chain*-kodierte TNF-Protomere zu einem Nonamer verknüpft werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch diese Oligomerisierung zwar die Bindungsaffinität für TNFR2 kaum steigt, dass es aber zu einer starken TNFR2-Aktivierung kommt. (Rauert, Wicovsky et al. 2010)

Weiterhin fand die Arbeitsgemeinschaft der Inneren Molekularen Medizin in Zusammenarbeit mit der AG von Professor Andreas Beilhack (medizinische Klinik II) heraus, dass diese auf TNFR2 aktiv wirkenden *single-chain*-TNF-TNC-Form in Mäusen die Proliferation von T<sub>regs</sub> anregen.

Die Bindungsspezifität von TNF an TNFR2 wurde durch die TNF-Mutante TNF80 (p80) erreicht, welches ausschließlich an TNFR2 bindet und somit TNFR1 nach TNF-Stimulation nicht stimuliert wird.

Ziel meiner Arbeit war es, sowohl die *single-chain*-TNF-TNC-Form weiterzuentwickeln, als auch ein Kombinationskonstrukt mit TNF80 und IL2 zu generieren.



## 2 Material

### 2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und deren Hersteller**

Chemikalien, Reagenzien	Firma, Herkunft
1 kb DNA-Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
ABTS Di-Ammonium	Roche, Mannheim, Deutschland
ABTS-Puffer	Roche, Mannheim, Deutschland
Acrylamid (30%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Anti-FLAG M2 Affinity Gel Freezer-Safe	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
0,1M DTT (Dithiothreitol)	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PAA, Pasching, Österreich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	J.T.Baker, Leipzig, Deutschland
Ethanol	J.T.Baker, Leipzig, Deutschland
Flag-Peptid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glycerol	Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt, Deutschland

Chemikalien, Reagenzien	Firma, Herkunft
IL2 (Interleukin 2)	Novartis Pharma Schweiz AG
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma, Deudeshofen, Deutschland
Methanol	J.T.Baker, Leipzig, Deutschland
Midori Green Advance	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Milchpulver	Sigma, Deideshofen, Deutschland
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma, Deideshofen, Deutschland
Pepton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Prestained Protein Marker (Broad Range)	New England, Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Proteinstandard Flag-TNF (mut60)	AG Wajant, Würzburg, Deutschland
RPMI-1640 Medium	PAA, Pasching, Österreich
Silbergelmarker (Low Molekular Weight)	GE Healthcare, Garching, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deideshofen, Deutschland
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA Lösung (10x)	PAA, Pasching, Österreich
TWEEN-20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

## 2.2 Zellen

### 2.2.1 Prokaryotische Zellen

NEB 5-alpha kompetente *E.coli* wurden von der Firma New England BioLabs aus Frankfurt bezogen.

### 2.2.2 Eukaryotische Zellen

Die in dieser Dissertationsarbeit verwendeten Zelllinien waren in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin bereits vorhanden. Hierzu gehören HEK293-Zellen, HT1080-Bcl2-Zellen und HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen, welche adhärent wachsende Tumorzelllinien waren. Des Weiteren wurden aus Spenderblut isolierte T-Zellen als Suspensionszellen gehalten.

**Tabelle 3: Eukaryotische Zellen und deren Herkunft**

Zellen	Beschreibung
HEK293	humane, embryonale Nierenzelllinien
PBMC	( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> ) isoliert aus Spenderblut
HT1080-Bcl2	humane Fibrosarkomzellen (stabil transfiziert mit Bcl2)
HT1080-Bcl2-TNFR2	humane Fibrosarkomzellen (stabil transfiziert mit Bcl2 und TNFR2)

PBMC-Zellen wurden aus humanem Spenderblut isoliert (siehe Kapitel 3.2.4.) und zunächst mit anti-CD3 mAb OKT3 (100 ng/ml) stimuliert, welches jedoch nach zwei Tagen wieder abgewaschen wurde. Zudem benötigten T-Zellen zur Proliferation alle 48 h IL2 (400 U/ml). Das Spenderblut wurde aus dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie, Universitätsklinikum Würzburg (Oberdürrbacher Str.6, 97080 Würzburg) bezogen.

### 2.2.3 Fusionsproteine und Plasmide

Die Fusionsproteine TNF80(mu)-Flag-IL2(mu), TNF80(h)-Flag-IL2(h), scTNF80(mu)-Flag-IL2(mu) wurden in der Arbeitsgruppe Wajant (AG Wajant) in Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern kloniert. Zur Plasmid-Amplifikation wurden kompetente *E.coli* verwendet. Die Fusionsproteine wurden anschließend (wie unter 4.2. beschrieben) in HEK293-Zellen produziert.

Die beiden *single-chain*-Konstrukte Fc-Flag-TNC-sc(mu)TNF80 und Fc(DANA)-2xFlag-TNC-sc(mu)TNF80 wurden von Mitarbeitern der AG Wajant kloniert und zur Expression in HEK293-Zellen zur Verfügung gestellt.

Die Sequenzen der klonierten und produzierten Fusionsproteine sind im Anhang unter 8.1. aufgeführt.

#### 2.2.4 Antikörper

**Tabelle 4: Verwendete Antikörper**

Antikörper	Firma, Herkunft
Monoclonal ANTI-FLAG® M2 Maus IgG	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

#### 2.2.5 Enzyme

**Tabelle 5: Verwendete Enzyme**

Enzyme	Firma, Herkunft
T4-Ligase (rapid)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Alle zum Klonieren verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Fermentas GmbH aus St. Leon-Rot, Deutschland bezogen.

## 2.3 Verbrauchsmaterial und Geräte

**Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Geräte**

<b>Verbrauchsmaterialien, Geräte</b>	<b>Firma, Herkunft</b>
Begasungsbrutschrank Heraeus Cell Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Blotkammer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
<b>Verbrauchsmaterialien, Geräte</b>	<b>Firma, Herkunft</b>
Blotting-Papier 195 g/m <sup>2</sup>	A.Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Chromatographiesäule	BioRad, München, Deutschland
Dialyseschläuche („Visking“, MWCO 15 kDa)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Elektroporator Equibio Easyject Plus	PeqLab, Erlangen, Deutschland
ELISA-Platten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppi) 1,5 ml; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Gel-Dokumentations-System	Intas, Göttingen, Deutschland
Gellaufkammern SDS-PAGE	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Großer Zentrifugenrotor JA-14	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Heizblock	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Heraeus Megafuge 1.OR Centrifuge	Thermo Scientific, Rockford, USA
Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Scientific, Rockford, USA
Hood	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl, Deutschland
Inkubator	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Kleiner Zentrifugenrotor JA-25,5	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
LI-COR Odyssey® Infrared Imager	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Luminometer/ELISA-Reader Lucy 2	Anthos Labtec, Krefeld, Deutschland

<b>Verbrauchsmaterialien, Geräte</b>	<b>Firma, Herkunft</b>
Magnetrührer IKAMAG	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer 0,1 mm Tiefe;0,0025 m <sup>2</sup>	Marienfeld GmbH&Co, Lauda-Königshofen, Deutschland
Nitrocellulosemembran, 0,2 µm Porengröße	Whatman, Dassel, Deutschland
Plastikpasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Plastikpipetten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Schüttler GFL 2ß13	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Thermocycler ( Flex Cycler)	Analytic Jena, Jena, Deutschland
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifuge OPTIMA-L70	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Vortex	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Waage	Kern EW, Balingen, Deutschland
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	SPL Life Sciences Inc., Pocheon-Si, Korea
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

## 2.4 Lösungen und Puffer

**Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Puffer**

Lösung, Puffer	Zusammensetzung
4x Probenpuffer	10 % Glycerin 0,1 M Tris 1 % SDS 0,1 M DTT (Dithiothreitol) Bromphenolblau
Assay Diluent	1x PBS 10 % FCS
Blotpuffer	0,025 M Tris 0,192 M Glycin 20 % Methanol pH 8,3
ELISA Coating Buffer	0.1 M Carbonat pH 9,5
Laufpuffer	50 mM Tris 380 mM Glycin 4 mM SDS pH 8,3
LB-Medium ( <i>Lysogeny Broth Medium</i> )	für 1 Liter: 10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl
PBS ( <i>Phosphat Buffered Saline</i> )	20 mM Natriumphosphat 0,7 % NaCl pH 7,2
PBS-Tween	PBS 0,05 % TWEEN-20

Lösung, Puffer	Zusammensetzung
PBS-T-Milch	PBS 0,05 % TWEEN-20 5 % Magermilch
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	0,5 M Tris 0,015 M SDS pH 6,8 (mit HCL eingestellt)
SOC-Medium ( <i>Super Optimal Broth with Catabolite Repression</i> )	0,5 % Hefeextrakt 2 % Vegetable Peptone 20 mM Glucose 2,5 mM KCL 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 10 mM NaCl
TAE-Puffer	2 M Tris 1 M Essigsäure 0,1 M EDTA pH 8,3
TBS ( <i>Tris Buffered Saline</i> )	0,02 M Tris 8% NaCl pH 7,6
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M Tris 0,015 M SDS pH 8,8 (eingestellt mit HCL)



## 2.5 Kits

**Tabelle 8: Verwendete Kits**

<b>Kits</b>	<b>Hersteller</b>
Gaussia Luciferase Assay Kit	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
OptEIA IL8-ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PageSilver™ Silver Staining Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Pure Yield Plasmid Miniprep/Midiprep System	Promega, Mannheim, Deutschland

## 3 Methoden

### 3.1 Klonierungen

Zunächst wurden verschiedene Konstrukte für die vorliegende Dissertationsarbeit kloniert: TNF80(mu)-Flag, TNF80(h)-Flag, scTNF80(mu)-Flag, TNF80(mu)-Flag-IL2(mu), TNF80(h)-Flag-IL2(h), scTNF80(mu)-Flag-IL2(mu), Gaussia-Flag-IL2(mu) und Gaussia-Flag-IL2(h). Hierfür wurde der pCR3-Expressionsvektor sowie das über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR, siehe 3.1.1.) gewonnene Insert mit entsprechenden Restriktionsenzymen (Tab.5) verdaut und anschließend ligiert. Die vollständigen DNA- und Aminosäuresequenzen der klonierten Fusionsproteine sind im Anhang unter 8.1. aufgeführt.

#### 3.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA (Desoxyribonukleinsäure), welche in einem Thermocycler durchgeführt wird. Der Vervielfältigungsprozess findet in mehreren Zyklen statt, wobei jeder Zyklus in drei Phasen unterteilt werden kann: Die Denaturierung, d.h. Auftrennung des DNA-Doppelstranges, anschließend folgt die Primerhybridisierung, hierbei lagert sich der Primer an die DNA an und zuletzt die Phase der Elongation, also die Verlängerung der DNA.

Für die PCR wurden folgende Reagenzien verwendet: 1 µl DNA in einer 1:100 Verdünnung, 3 µl MgSO<sub>4</sub> [25 mM], 1,5 µl *forward*-Primer, 1,5 µl *reward*-Primer, 5 µl dNTPs [2mM], 5 µl 10x *Buffer for Kot Hot Start DNA-Polymerase* [200U] und 32 µl H<sub>2</sub>O. Zuletzt wurde 1 µl Polymerase, hinzugefügt. Weiterhin wurde der PCR-Ansatz in den Thermocycler (Analytic Jena, Flex Cycler) gegeben, in welchem das PCR-Programm in folgenden Schritten ablief: Für die initiale Denaturierung wurde eine Zeit von zwei Minuten bei einer Temperatur von 95°C eingestellt, während das Annealing in 50 sek. bei 50°C stattfand. Der finale Elongationsschritt erfolgte in 30 sek bei 70°C. Einprogrammiert wurden 25 PCR-Zyklen.

### 3.1.2 Gel-Aufreinigung von PCR-Produkten

Um das PCR-Produkt für weitere Klonierungsschritte verwenden zu können, war zunächst wichtig, dass mit Hilfe eines Agarosegels kontrolliert wurde, ob die Klone positiv waren, welche anschließend aufgereinigt wurden. Hierfür musste ein 1% Agarosegel (0,5 g Agarose in 50 ml TAE) hergestellt werden, worauf die Proben aufgetragen und schließlich elektrophoretisch aufgetrennt wurden. 8,5 µl DNA-Marker (50µg) wurde in eine extra Tasche pipettiert, woraufhin das Agarosegel 10-15 min bei 100V in TAE-Puffer lief. Nachdem das Gel mit Hilfe eines Gel-Dokumentations-Systems (Intas) betrachtet und beurteilt wurde, konnten die Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und zusammen mit 400 µl NT-Puffer in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß (Eppi) gegeben werden. Im Heizblock bei 42°C wurde das Gel aufgelöst. Nun konnte die aufgelöste DNA in einen Filter mit *Collection Tubes* pipettiert und bei 11000 rpm abzentrifugiert (Heraeus Pico 17 Centrifuge) werden. Anschließend wurden 680 µl Waschpuffer in den Säulenfilter gegeben und das Eppendorf-Reaktionsgefäß erneut bei 11000 rpm, 10 sek. zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und der Filter mit dem *Collection Tube* zum vollständigen Trocknen noch einmal 2 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Letztendlich wurde die Säule auf ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesteckt. Konzentrationsabhängig, d.h. abhängig von der Bandendicke, die unter UV-Licht zu sehen war, wurden zur Elution des PCR-Produktes 15-40 µl NE-Elutions-Puffer [5mM] hinzugefügt woraufhin das Eppendorf-Reaktionsgefäß erneut bei 11000 rpm und 30 sek. lang zentrifugiert wurde.

### 3.1.3 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Nach der Gel-Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte der Restriktionsverdau und die Dehosphorylierung des Vektors. Hierdurch wurden die mittels PCR hergestellten Konstrukte mit Hilfe von spezifischen Restriktionsenzymen an genau definierten Schnittschnellen gespalten. Zur Sicherstellung, dass das Insert nur in der gewünschten Orientierung in den Vektor ligiert wurde, nutzte man für beide DNA-Enden von Vektor und Insert jeweils unterschiedliche Restriktionsenzyme. An den 5'-Enden blieben nach dem Restriktionsverdau Phosphatreste zurück,

die für eine Ligation notwendig sind. Bei Vektoren wurden diese durch Dephosphorylierung entfernt, um zu verhindern, dass sich zwei zueinander kompatible Enden eines Vektorfragmentes mit sich selbst ligieren.

Für den Restriktionsverdau wurde ein 50 µl Ansatz hergestellt, bestehend aus: 5 µl Puffer, 5 µl DNA, 38 µl H<sub>2</sub>O, und jeweils 1 µl der beiden Restriktionsenzyme. Der Verdau wurde eine Stunde in einem 37°C Wasserbad inkubiert, bevor 1 µl CIP (*calf intestine alkaline phosphatase*) zum Dephosphorylieren der DNA-Fragmente hinzugefügt wurde.

#### **3.1.4 Ligation**

Ligation wird die Verknüpfung zweier DNA-Segmente bezeichnet. Hierbei ist ein durch Restriktionsenzyme geschnittener Vektor vorhanden, in welchen ein Insert ligiert wird.

Um den Vektor mit dem Insert zu ligieren wurden 4 µl *5x Rapid-Ligation-Buffer*, 1 µl Vektor, 3 µl Insert, 1 µl T4-DNA-Ligase [5 U/µl], sowie 11 µl destilliertes Wasser in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammengeführt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ligationsansatz konnte nach der Inkubationszeit direkt zur Transformation der klonierten Vektoren in kompetente Zellen verwendet werden.

#### **3.1.5 Transformation der klonierten Vektoren in kompetente Zellen**

Die Transformation bezeichnet die Übertragung von DNA in kompetente Bakterienzellen.

Für die Transformation der klonierten Vektoren, wurden 20 µl kompetente *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. Zusammen mit 2 µl Ligationsansatz wurden sie 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 45 sek. bei 42°C in den Heizblock gestellt. Nach zwei weiteren Minuten auf Eis wurde 250 µl SOC-Medium hinzugefügt und für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C in

den Inkubator gestellt, damit einzelne Ampicillin-resistente Klone anwachsen konnten, die das gewünschte Konstrukt enthalten.

### **3.1.6 Animpfen für Plasmid-Minipräparation**

Die Mini-Präparation bezweckt eine Isolierung von Plasmiden aus Bakterien. Einzelne Klone der am Vortag durchgeführten Transformation, wurden am nächsten Tag mit einer Pipettenspitze von den LB-Ampicillin-Agarplatten „gepickt“ und zusammen mit 2 ml Medium in ein 15 ml Falcon gegeben. Hiernach wurden die Falcons mit den Klonen über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

### **3.1.7 Plasmid-Minipräparation**

Am Folgetag wurde die Übernachtskultur in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden 100 µl RNase versetzter S1-Puffer hinzugefügt. Nach Resuspension der Pellets durch Vortexen, wurden 100 µl S2-Puffer dazugegeben. Nach 5-maligem Invertieren wurde S3-Puffer, hinzugefügt und erneut invertiert. Die Minis wurden anschließend 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Währenddessen wurden schon 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 300 µl Isopropanol vorbereitet, in welche der Überstand nach dem Zentrifugieren überführt wurde. Nach ausgiebigem Schütteln, wurden die Eppendorf-Gefäße 5 min in die Kühlzentrifuge (Hettich-Zentrifuge Mikro 200 R) gestellt und bei 4°C und 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand konnte abgesaugt werden. Als Waschschrift wurden 300 µl 70 % Ethanol hinzugegeben, bevor die Eppendorf-Gefäße erneut 5 min zentrifugierten. Nachdem der Überstand anschließend abgesaugt wurde, konnte das verbleibende Pellet bei 42° C und offenem Deckel auf dem Heizblock getrocknet werden. Nachfolgend wurde das DNA-Pellet in 20-50 µl Wasser gelöst.

### **3.1.8 Kontrollverdau**

Zur Überprüfung der durchgeführten Klonierung, wurde ein Kontrollverdau mit zwei Restriktionsenzymen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 20 µl-Ansätzen (bestehend aus 2 µl 10xPuffer, jeweils 0,5 µl der beiden Enzyme, 3 µl DNA aus

der Mini-Präparation und 14 µl destilliertem Wasser) hergestellt. Auf ein Agarosegel wurde dann jede Probe aufgetragen, um festzustellen, welcher Klon positiv ist und somit zur Midi-Präparation genutzt werden konnte.

### 3.1.9 Animpfen für Plasmid-Midipräparation

15-20 µl der Mini-Kultur, die beim Kontrollverdau positiv waren, wurden zusammen mit 30 ml 5xLB-Medium, 120 ml destilliertem Wasser und 150 µl Ampicillin (1:1000) in einen Erlenmeyerkolben gegeben und über Nacht bei 37°C im Inkubator geschüttelt.

### 3.1.10 Plasmid-Midipräparation

Nachdem die Bakterienkulturen, welche die positiv klonierte DNA enthielten, über Nacht im Schüttler bei 37° im Inkubator angewachsen war, konnten sie am Folgetag in einen Kunststoffkolben überführt werden. Nun wurden sie bei 5000 rpm 10 min abzentrifugiert (Beckman Coulter JA-14). Der entstandene Überstand wurde dekantiert und die Pellets mit 6 ml Resuspensionspuffer gelöst. Im Anschluss wurde der Inhalt in ein schmäleres Kunststoffröhrchen überführt und 6 ml Lysis-Puffer hinzugegeben. Nach darauffolgendem Invertieren wurden 10 ml Neutralisationspuffer beigemischt, erneut invertiert und bei 10000 rpm 10 min zentrifugiert (Beckman Coulter JA-25,5). Um den Überstand in das Vakuumsauggerät (Vac-Man®, Promega) zu überführen, wurde der Kolbeninhalt mit Hilfe von Vakuum zunächst durch verschiedene Filter in den *Vac-Man* eingesaugt. Während ein oberer, blauer Säulenfilter jegliche Zellreste abhält, bleibt im darunter liegenden, weißen Säulenfilter die DNA zurück. Nachdem der komplette Überstand gefiltert wurde, erfolgte die Entfernung des blauen Säulenfilters. In den weißen Säulenfilter wurde 5 ml *Endotoxin removal* Puffer hinzugefügt. Durch Vakuum wurde das *Endotoxin removal* Puffer ebenfalls abgesaugt und dann 20 ml Waschpuffer hinzugefügt, welches ebenfalls mittels Vakuum durch den weißen Säulenfilter hindurch gezogen wurde. Schlussendlich wurde die DNA mit 400 µl destilliertem Wasser eluiert und die DNA-Konzentration mit Hilfe von einem Spektralphotometer in einer 1:100 Verdünnung gemessen.

### **3.1.11 Proben zur Sequenzierung vorbereiten**

Zur Kontrolle wurden 20 µl [100 ng/µl] der neu klonierten DNA zum Sequenzieren mit Hilfe spezifischer Primer zu GATC Biotech verschickt. Die Identität des isolierten Plasmids konnte durch die Sequenzierung eindeutig analysiert und kontrolliert werden.

## **3.2 Arbeit mit eukaryotischen Zellen**

### **3.2.1 Kultivierung adhärenter Zellen**

Adhärente HEK293-Zellen wurden in RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS (fetales hitzeinaktiviertes Kälberserum) in Zellkulturflaschen bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C im Inkubator kultiviert. Vor Gebrauch wurde das FCS 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Bevor die HEK293-Zellen gesplittet, das heißt ausgedünnt werden konnten, wurden sie unter dem Mikroskop auf Kontamination überprüft. Außerdem musste die Morphologie und die Dichte betrachtet und beurteilt werden. Um die adhären-ten Zellen zu ernten, also von der Zellkulturflasche zu lösen, wurden diese trypsin-iert, das heißt 10 min mit 3 ml 1xTrypsin/EDTA inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde weiter in Kultur gehalten. Von jeder Zelllinie wurden stets mehrere Aliquots stets weggefroren, damit jederzeit ein Backup der Zellen vorhanden war. Hierfür wurden die Restzellen 4 min bei 1200 rpm abzentrifugiert, um sie anschließend in 1 ml Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO) aufzunehmen und bei -80°C in Einfrierröhrchen zu lagern.

Neben HEK293-Zellen wurden HT1080-Bcl2-Zellen und HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen gehalten, welche gleichermaßen behandelt und kultiviert wurden.

### **3.2.2 Transiente Transfektion mittels Elektroporation**

Zur Vorbereitung für eine Elektroporation wurden HEK293-Zellen auf 15 cm Schalen (Greiner) ausgesät. Nachdem die Zellen konfluent gewachsen waren, konnten sie mit Hilfe von 3 ml 1xTrypsin/EDTA nach 10 minütiger Einwirkung geerntet werden. Die Zellen wurden in 7 ml RPMI-1640 Medium aufgenommen

und bei 1200 rpm 4 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml RPMI-1640 Medium mit 10% FCS und 1% Pen/Strep aufgenommen und zusammen mit 40 µg der Plasmid-DNA in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 4 mm) überführt. Die Elektroporation fand bei 250 V, 1800 µF und maximalem Widerstand im Elektroporator (Equibio EasyjecT Plus) statt, wodurch die Zellmembran vorübergehend permeabel war und somit die DNA von den Zellen aufgenommen werden konnte. Der Küvetteninhalt wurde zurück auf eine Zellkulturplatte gegeben, in der die HEK293-Zellen in RPMI-1640 Medium mit 2 % FCS und 1% Pen/Strep eine Woche unter Standardbedingungen bei 37°C und 5 %CO<sub>2</sub> im Inkubator gehalten wurden. Da die verwendeten Plasmide unter unsterilen Bedingungen kloniert wurden, sind die HEK293-Zellen nach der Elektroporation mit 1% Pen/Strep in RPMI-1640 Medium zu halten. Währenddessen sollten die HEK293-Zellen das gewünschte Fusionsprotein produzieren und in den Zellüberstand abgeben. Nach sieben Tagen wurde der Überstand abgenommen, um Zellreste zu entfernen, bei 4600 rpm 10 min abzentrifugiert (Hettich Zentrifugen, Rotanta 460R) und im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.

### **3.2.3 Transiente Transfektion mittels PEI**

Es wurden 15 cm Zellkulturplatten, die konfluent mit adhärenenten HEK293-Zellen bewachsen waren für die Transfektion verwendet. Dann konnte ein 2 ml Transfektionsansatz in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße vorbereitet werden: 12 µg DNA wurde in serumfreies RPMI-1640 Medium pipettiert, PEI wurde im Verhältnis 1:3 (ergo 36 µg) hinzugegeben. Der Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert, während das auf den vollbewachsenen Zellkulturschalen befindliche RPMI-1640 Medium mit 10% FCS in serumfreies RPMI-1640 Medium mit 1% Pen/Strep ausgetauscht wurde. Tropfenweise wurde nun der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben, die über Nacht in den Inkubator gestellt wurden. Am nächsten Morgen sollte ein erneuter Mediumwechsel durchgeführt werden, sodass die Zellen eine Woche in RPMI-1640 Medium mit 2% FCS und 1 % Pen/Strep unter standardisierten Bedingungen im Inkubator (5% CO<sub>2</sub>, 37 ° C) verweilen konnten. Währenddessen sollten die HEK293-Zellen wie schon unter 4.2.2. beschrieben, das gewünschte Fusionsprotein produzieren und in den Zellüberstand abgeben.



Nach sieben Tagen wurde der Überstand abgenommen, bei 4600 rpm 10 min abzentrifugiert, um Zellreste zu entfernen und im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.

### **3.2.4 Isolation primärer Zellen**

Vom Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie, Universitätsklinikum Würzburg (Oberdürrbacherstraße 6, 97080 Würzburg) wurde das zur PBMC-Aufreinigung verwendete Blut in Form von „Zapfen“ bezogen. In einem Zapfen befanden sich ca. 8 ml Spenderblut, welches mit Zellen angereichert war. Um die PBMCs, das heißt die mononukleären Zellen des peripheren Blutes aus dem Spenderblut zu isolieren, wurde das Blut mit 50 % PBS gemischt und darauffolgend langsam, ohne jegliche Verwirbelung, in ein zweites Falcon mit vorgelegter Ficoll-Lösung, einem Gemisch aus synthetisch hergestelltem Copolymer aus Saccharose, Epichlorhydrin und Wasser, überführt. Danach wurde es 15 min bei 1800 rpm, ohne Bremse, bei RT zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.OR Centrifuge). Dies hatte zur Folge, dass sich die Blutbestandteile unterschiedlicher Dichte in einzelnen Schichten verschieden anordnen konnten. Während sich die Erythrozyten absetzten, befanden sich die PBMCs als sogenannter „Buffy Coat“ zwischen dem Plasma und der Ficoll-Lösung. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde die Leukozytenschicht abgenommen und in ein neues Falcon übertragen, in welchem die peripheren Blutlymphozyten dreimal mit 2 mM EDTA und PBS gewaschen wurden.

### **3.2.5 Kultivierung primärer Zellen**

Zunächst wurden die frisch isolierten PBMC-Zellen 24-48 h in RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 200 U/ml IL2 und 100 ng/ml anti CD3 mAb aufgenommen. Kultiviert wurden primäre Zellen standardgemäß im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die aktivierten Lymphozyten wurden nach 24 bis

48 h zweimal in PBS gewaschen und das Zellpellet anschließend erneut für 24 h in RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS, 1 % Pen/Strep und 200 U/ml IL2 gelöst. Hiernach waren die Zellen bereit zur Nutzung für Experimente.

### 3.3 Proteinbiochemie

#### 3.3.1 Westernblot

##### 3.3.1.1 SDS-Page

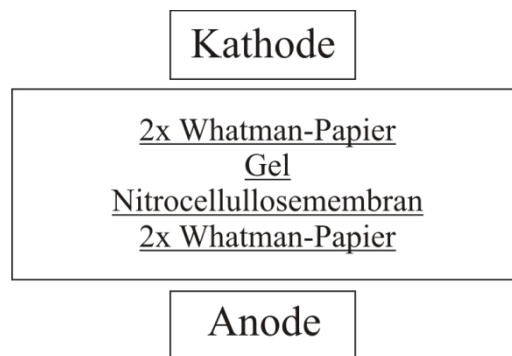
Zum Nachweis und zur Mengenbestimmung der produzierten Proteine wurden die Proteinproben über Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page), welches aus einem Trenn- und einem Sammelgel besteht, nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das Trenngel (12,5 %), zusammengesetzt aus einer Trenngellösung (pro Gel: 4,4 ml 30 % Acrylamid, 2,75 ml Trenngelpuffer, 3,9 ml Wasser, 187 µl 10 % APS, 15,4 µl TEMED) wurde zuerst in die Westernblot Apparatur gegeben und zum Vermeiden von Blasenbildung, mit Isopropanol beschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde es mit Sammelgel (6 %), bestehend aus einer Sammelgellösung (pro Gel: 1,4 ml 30 % Acrylamid, 1,75 ml Sammelgelpuffer, 3,8 ml H<sub>2</sub>O, 84 µl 10 % APS, 7 µl TEMED) überschichtet. Noch während der flüssigen Phase des Sammelgels wurde direkt ein Geltaschenkamm eingesetzt. Zur besseren Übersicht der Geltaschen, in die die Proteinproben hinein pipettiert wurden, erfolgte eine Färbung des Sammelgels mit 5 % Bromphenolblau.

Die Proteinproben (20 µl) wurden mit 7 µl des 4 x Probenpuffer (10 % Glycerin, 0,1 M Tris pH 8, 0,1 % SDS, 0,1 M DTT, Bromphenolblau) gemischt, zur Denaturierung 3 min bei 95°C im Heizblock gekocht und anschließend 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Pro Gel wurde eine Tasche mit 7 µl eines Molekulargewichtsstandards (Prestained Protein Marker/ Broad Range, New England Biolabs) befüllt. Die Proteinkonzentration wurde mit einem definierten Proteinstandard Flag-TNF(mut60) (15 ng, 30 ng und 60 ng) bestimmt. Die elektrophoretische Auftrennung dauerte etwa 100 min und fand bei 120 V in SDS-Laufpuffer (50 mM Tris, 380 mM Glycin, 4 mM SDS, pH 8,3) statt.

### 3.3.1.2 Elektrotransfer von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran

Nach Auftrennung der Proteine durch Gelelektrophorese wurden die negativ geladenen Proteine vom Gel auf eine, der Anode aufliegenden, Nitrocellulosemembran übertragen. Hierfür wurden die *Whatmanpaper*, sowie die Nitrocellulosemembran zunächst in Blotpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; pH 8,3) getränkt und dann in folgender Reihenfolge geschichtet: Anliegend an der Kathode befanden sich zwei *Whatmanpaper*, anschließend das mit Proteinen beladene Gel, die Nitrocellulosemembran und zwischen Nitrocellulosemembran und Anode waren wiederum zwei *Whatmanpaper* zu platzieren. (siehe Abb. 4)



**Abbildung 4:** schematische Darstellung von Membran- / Gel- / Whatmanpaperanordnung

Das Blotting in der Nass-Blot-Kammer erfolgte bei RT, 90 V und 400 mA innerhalb von 2,5 h in Blotpuffer.

### 3.3.1.3 Immundetektion

Mit Hilfe von PBST-Milch (1xPBS; 0,5 % (w/v) Magermilchpulver; (v/v) Tween-20) wurden zunächst, durch einstündiges Schwenken bei Raumtemperatur auf dem Schüttler, die unspezifischen Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran blockiert. Anschließend wurde die Membran 3x jeweils 15 min in PBS-T gewaschen, bevor sie über Nacht auf dem Schüttler bei 4°C, mit dem Primär-Antikörper (Anti-Flag-M2, 1:2000 in PBS-T und 0,025 % Natriumazid) inkubiert wurde.

Dieser sollte spezifisch an die FLAG-Tags der nachzuweisenden Proteine binden. Am Folgetag wurde die Membran wiederum 3x15 min in PBS-T gewaschen bevor der fluoreszenzgekoppelte Sekundär-Antikörper (*anti-mouse-antibody* Licor 800, 1:100000 in PBS-T) 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert wurde. Während der Primär-Antikörper abhängig von dem nachzuweisenden Protein ist, richtet sich die Wahl des Sekundär-Antikörpers spezifisch nach dem Primär-Antikörper. Letztendlich folgte ein quantitativer Nachweis der Proteine durch das LICOR Odyssey®-System (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA)

### 3.3.2 IL8 ELISA

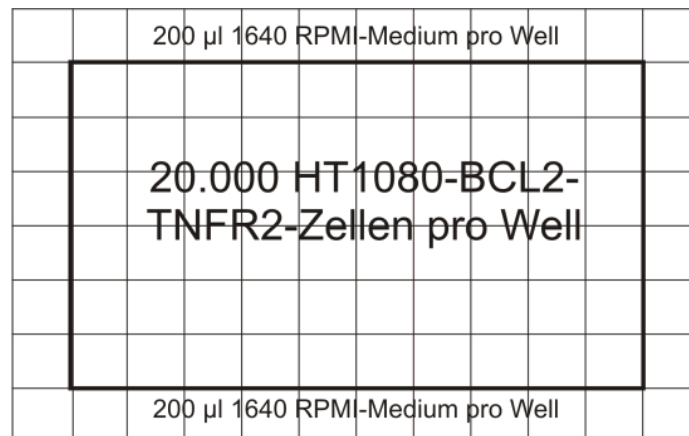
Durch die Bindung der verwendeten Konstrukte (Fc-Flag-TNC-sc(mu)TNF80; Fc(DANA)-2xFlag-TNC-sc(mu)TNF80; TNF80(mu)-Flag-IL2(mu); TNF80(h)-Flag-IL2(h)) an TNFR2-Rezeptoren, welche sich an den HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen befinden, wurde eine IL8-Produktion stimuliert, die schließlich mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits nach Angaben des Herstellers wie folgt nachgewiesen wurde:

20 x 10<sup>3</sup> Zellen pro Well (Dreifachwerte) wurden in einer 96 Well-Flachbodenplatte (*F-Bottom*), in einem Volumen von 100 µl pro Well ausgesät. Je nach Versuchsansatz wurden eine oder zwei Zellsorten (HT1080-Bcl2- und HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen) ausgesät. (Abb. 5) Über Nacht wurden diese unter standardisierten Bedingungen im Inkubator kultiviert. Hiernach erfolgte ein Mediumwechsel um die Hintergrundaktivität von konstitutiv produziertem IL8 zu minimieren.



**Abbildung 5: Zellaussaat in einer 96-Well-F-Bottom-Platte mit zwei verschiedenen Zelllinien**

Anordnung der zwei verschiedenen Zelllinien HT1080-Bcl2-TNFR2 und HT1080-Bcl2. Während die HT1080-Bcl2-Zellen als Negativkontrolle fungieren, zeigte sich stets die Funktionalität des Fusionsproteins durch IL8-Produktion nach dessen Bindung an die TNFR2-Domäne der HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen. Die 36 Wells am Rande der Platte wurden zum Schutz vor Verdunstung mit 200 µl RPMI-1640 Medium gefüllt, wodurch wurde die Stabilität der Konzentration gewährleistet war.



**Abbildung 6: Zellaussaat in einer 96-Well-F-Bottom-Platte mit einer einzigen Zelllinie**

Die zweite angewandte Option des ELISA-Ansatzes war, nur eine Zelllinie auszusäen, nämlich 20.000 HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen pro Well. Diese Möglichkeit wurde angewandt, wenn geprüft wurde, ob eine Oligomerisierung mit dem M2-Antikörper einen Unterschied zu dem Teil der Platte zeigt, welchem kein M2-Antikörper hinzugefügt wurde. Wiederum wurden die Randwells mit 200 µl RPMI-1640 Medium befüllt und die Zellen unter standardisierten Bedingungen über Nacht im Inkubator gehalten.

Am zweiten Versuchstag wurde für jedes zu testende Konstrukt in einer 96 Well-U-Bottom Platte, eine Verdünnungsreihe mit einer Anfangskonzentration von 1000 ng/ml in 1:5 Schritten hergestellt.

Standard [0,5 ng]	Standard [1 ng]	Standard [2 ng]
1000 ng des zu testenden Konstruktes	Standard [2 ng]	
200 ng des zu testenden Konstruktes	Standard [1 ng]	
40 ng des zu testenden Konstruktes	Standard [0,5 ng]	
8 ng des zu testenden Konstruktes		
1,6 ng des zu testenden Konstruktes		
0,32 ng des zu testenden Konstruktes		
0,064 ng des zu testenden Konstruktes		
1640 RPMI-Medium		
	M2 [1:1000]	
	1640 RPMI Medium	
	1640 RPMI Medium	Überstandskontrolle [1 µg/ml]

**Abbildung 7: Verdünnungsreihe mit einem zu testenden Konstrukt in einer 96 Well U-Bottom-Platte**

Während sich in der ersten Reihe die Standards in unterschiedlichen Konzentrationen (2 ng/ml, 1 ng/ml und 0,5 ng/ml) befanden, wurde in die zweite Reihe 1000 ng/ml des zu testenden Konstruktes gegeben. In 1:5 Schritten wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, das heißt, während die Anfangskonzentration des Konstruktes 1000 ng/ml betrug, befanden sich in der dritten Reihe 200 ng/ml, in der vierten Reihe 40 ng/ml usw. Indessen wurde das Gesamtvolumen pro Well konstant beibehalten. Während in der 10. Reihe M2-Antikörper [1:1000] ohne Konstrukt hinzugegeben wurde, blieb die 9. und 11. Reihe leer, wurde also mit RPMI-1640 Medium befüllt. Nutzte man ein aufgereinigtes Protein zur IL8 ELISA Messung, wurde stets in der 12. Reihe zusätzlich eine Überstandskontrolle desgleichen Proteins in einer Konzentration von 1000 ng/ml dazugegeben.

Der IL8 ELISA wurde in verschiedenen Ansätzen durchgeführt, wobei darauf zu achten war, dass stets zwei Variablen vorhanden waren: Die erste Möglichkeit war, dass zwei unterschiedliche Zelllinien am Vortag ausplattiert wurden, z.B. 30 Wells HT1080-Bcl2-Zellen und 30 Wells HT1080-Bcl2 TNFR2-Zellen. Somit stellte die Zellpopulation ohne TNFR2 die Negativkontrolle dar (siehe Abb.5). Die zweite Möglichkeit war, dass am Tag des Ausplattierens 60 Wells mit HT1080-Bcl2-TNFR2- Zellen ausgesät wurden und die Variable über M2-Quervernetzung (30 Wells mit- und 30 Wells ohne Quervernetzung) hergestellt wurde (siehe

Abb.6). Die M2-Quervernetzung der Fusionsproteine sollte durch die Oligomerisierung zur Folge haben, dass die Proteinaktivität verstärkt und dadurch eine erhöhte IL8-Produktion induziert wurde. Hierfür wurden die Liganden vor Herstellung der Verdünnungsreihe 30 min mit dem Flag-spezifischen M2-Antikörper (1 µg/ml) bei RT inkubiert.

Von den hergestellten Verdünnungsreihen wurden jeweils 100 µl pro Well auf die Zellen, deren bisheriges Medium abgesaugt wurde, übertragen und diese nun wiederum über Nacht im Inkubator gehalten.

Am gleichen Tag wurden 96-Well ELISA-Platten mit einem Capture-Antikörper (bestehend aus Capture Antikörper anti IL-8 (1:250 in *Coating Buffer*) *gecoated*. Pro Well wurden 50 µl Capture Ansatz in 96-Well-ELISA-Platten pipettiert und diese über Nacht im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Am darauffolgenden Tag wurden die ELISA-Platten dreimal mit jeweils 200 µl/Well PBS-T gewaschen und anschließend 1 h bei RT mit 200 µl pro Well Assay Diluent (1% FCS in PBS) geblockt. Anschließend wurden die Platten viermal, mit 200 µl pro Well PBS-T, gewaschen und 80 µl der Zellüberstände der stimulierten Zellen, sowie des Standards auf die ELISA-Platte übertragen. Nach zweistündiger Inkubation bei RT, wurde erneut mit PBS-T gewaschen. Danach wurden 50 µl *Working Detektor* pro Well 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss an siebenmaliges Waschen mit PBS-T, wurden 100 µl Substrat-Puffer Reagent pro Well hinzugegeben. Durch Messung mit Hilfe des *ELISA-Readers* konnte nun die IL-8-Produktion in *Light Units* bei einer Wellenlänge von 405 nm angegeben werden.

### **3.3.3 Aufreinigung der Proteine**

Die Aufreinigung erfolgte über eine bestimmte Aminosäuresequenz, den im Protein enthaltenen Flag-Tag. Unaufgereinigter Zellüberstand wurde in einen Behälter gegeben, welcher nach unten hin an eine Säule angeschlossen war, in der sich Anti-Flag-Beads befanden, die durch Bindung an das gewünschte Protein das-selbige herausfilterten. Unterhalb der Säule konnte der restliche Überstand heraustropfen. Anti-FLAG M2 *Affinity Gel* der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

wurde verwendet, damit das aufzureinigende Protein daran bindet und folglich nicht mit dem restlichen Überstand durch die Säule tropfen konnte. Primär wurden die Anti-Flag-M2-Beads mehrfach mit TBS gewaschen um das Glycerol zu entfernen. Anschließend wurden die Beads, in TBS gelöst und auf die Chromatographiesäule gegeben. Dabei war zu beachten, dass 1 ml Anti-Flag-M2-Beads 600 µg Protein binden. Zusammen mit 0,15 M NaCl wurden die Proteinüberstände auf die Säule gegeben und auf eine Tropfgeschwindigkeit von 200 µl/min eingestellt. Bei 4°C konnte die Säule, während regelmäßiger Kontrollen der Fließgeschwindigkeit, laufen gelassen werden. Sobald der komplette Überstand durchgelaufen war, wurde die Chromatographiesäule mit zweifachem Säulenvolumen TBS gewaschen, um die ungebundenen Überstandsreste zu entfernen. Dies ergab den *wash 1*. Für die Elution musste ein dreifaches Säulenvolumen von Flag-Peptid, in TBS [100 µg/ml] gelöst, hinzugegeben werden. Mit Hilfe des Flag-Peptides konnten nun die gebundenen Flag-Fusionsproteine, bei einer Tropfgeschwindigkeit von einem Tropfen pro 30 Sekunden eluiert werden. Daraufhin folgte ein zweiter Waschschrift der Säule mit TBS, hieraus ergab sich *wash 2*.

Nach erfolgter Elution, sowie den beiden Waschsritten, wurden die Agarosebeads mit TBS gewaschen und in ein 50 ml Falcon überführt. Gelagert wurden die Beads in einer Glycerol-/TBS-Lösung (50% Glycerol in TBS und 0,2% Natriumacid) bei -20°C.

Zur Verminderung von Salzen und dem Flag-Peptid nach dem Eluieren, wurden die Eluate schließlich zweimal gegen PBS bei 4°C dialysiert und im Anschluss steril filtriert.

Zur quantitativen Bestimmung der aufgereinigten Proteine wurden diese anschließend auf einen Westernblot aufgetragen, während die darauffolgende Anfertigung eines Silbergels zusätzlich auch der qualitativen Analyse der Reinheit der Proteine diente.



### 3.3.4 Silbergel

Neben der quantitativen Analyse der aufgereinigten Proteine, welche im Vergleich zur Westernblot-Analyse mit Hilfe eines Silbergels viel sensitiver ist, wurde durch Silberfärbung zusätzlich zur Konzentration auch die Reinheit der Eluate sichtbar. Wie für den Westernblot, wurden die Eluate, mit hinzugefügtem 4 x La-depuffer zunächst auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Proteinmarker, sowie Silbergelmarker wurden ebenfalls aufgetragen und durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgte bei RT, auf dem Schüttler, die Benetzung des Gels mit den Reagenzien des Silver Stain Kits (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot).

Zuerst wurde das Gel zweimal 5 min mit destilliertem und autoklaviertem Wasser gewaschen, daraufhin zweimal mit einer Fixierlösung (bestehend aus destilliertem Wasser, 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure) benetzt. Nach erneut zweimaligem Waschen mit destilliertem und autoklaviertem Wasser wurde das Gel 1 min mit einer *Sensitizer Working Solution* (bestehend aus 50 µl *Sensitizer*, sowie 25 ml destilliertem Wasser) behandelt und wiederum zweimal 5 min mit autoklaviertem und destilliertem Wasser gewaschen. Die *Stain Working Solution* (500 µl *Enhancer* und 25 ml *Silver Stain*) sollte 30 min auf das Gel einwirken. Darauffolgend wurde das Gel zweimal 20 sek. mit destilliertem und autoklaviertem Wasser gewaschen und die *Developer Working Solution* (500 µl *Enhancer*, 25 ml *Stain Developer*) zu dem Gel hinzugegeben. Das Gel wurde damit so lange geschwenkt, bis die Banden des Silbergelmarkers sichtbar wurden. 5 % Essiglösung stoppte die Färbung, bevor das Gel bis zur abschließenden Dokumentation in destilliertem Wasser aufbewahrt wurde.

### 3.3.5 Homologe Kompetitionsassays mit der *Gaussia Princeps* Luciferase und T-Zellen

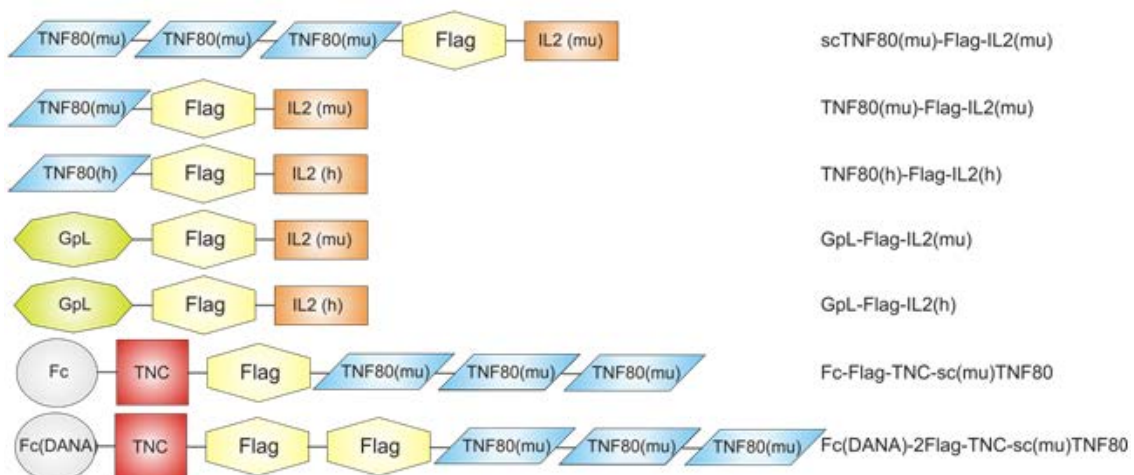
Um die Bindungsfähigkeit von Konstrukten zu testen wurden *Gaussia Princeps* Luciferase-Assays (GpL-Assays) durchgeführt. Hierfür wurden T-Zellen verwendet, welche einen IL2-Rezeptor exprimierten. Somit war eine Bindungsaffinität zu den klonierten Fusionsproteinen mit der IL2-Domäne garantiert, wenn das IL2

funktionsfähig war. Voraussetzung für den Assay war das Isolieren und Kultivieren von PBMC-Zellen, wie unter 3.2.4. und 3.2.5. beschrieben. War unter dem Mikroskop eine ausreichende Anzahl abzuschätzen, wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die genau Anzahl an Zellen bestimmt. Anschließend wurden die Zellen gleichmäßig auf verschiedene Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Nach Aufteilung in verschiedene Untergruppen wurde zu einer Gruppe als Negativkontrolle ausschließlich Medium hinzugegeben, während die andere Gruppe mit dem zu testenden Konstrukt stimuliert wurden, welches während einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis die Möglichkeit hatte über den IL2-Rezeptor an die T-Zellen zu binden. Hiernach wurde eine Verdünnungsreihe eines kompetierenden GpL-IL2- Konstrukt auf die Zellen gegeben. Wiederum wurden die T-Zellen 30 min auf Eis inkubiert wonach mehrere Waschschrte mit PBS folgten. Schließlich wurde das GpL-Signal gemessen, wodurch die Bindungsfähigkeit der IL2-Domäne ersichtlich wurde. Um einen vergleichbaren Referenzwert für die GpL-Messung zu erhalten, war das Ansetzen eines GpL-Standards (Puffer: Substrat in einer 100:1-Verdünnung) notwendig.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klonierung

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden zunächst TNF-Varianten kloniert, die spezifisch mit TNFR2 (=p80) interagieren und mit zusätzlichen funktionellen Domänen wie IL2 oder der konstanten Domäne der schweren Antikörperkette des humanen IgG1 (Fc) versehen wurden. So wurden Konstrukte generiert, die für scTNF80(mu)-Flag-IL2(mu), TNF80(mu)-Flag-IL2(mu), TNF80(h)-Flag-IL2(h), GpL-Flag-IL2(mu) und GpL-Flag-IL2(h) kodieren (siehe Abb. 8). Das in diesen Konstrukten enthaltene Flag-Epitop und die teilweise eingesetzte *Gaussia Princeps* Luciferase (GpL)-Domäne ermöglichten die spätere Reinigung bzw. Detektion und Quantifizierung der genannten Proteine.



**Abbildung 8:** Schematischer Aufbau der in der Arbeit untersuchten Fusionsproteine

Die Struktur der aufgeführten TNF-Fusionsproteine, setzt sich zusammen aus unterschiedlichen Domänen wie z.B. TNF80(mu), TNF80(h), IL2(mu), IL2(h), einem Flag-Epitop (D-Y-K-D-D-D-K), GpL, der Tenascin-C-Domäne des Huhns (TNC) und einer Fc-Domäne. Die Deklaration „DANA“ beschreibt eine eingeführte Mutation in der Fc-Domäne, die die Bindung an Fcγ-Rezeptoren limitiert.

Das scTNF80(mu)-Flag-IL2(mu)-Konstrukt besteht aus drei hintereinander klonierten löslichen murin TNFR2-spezifischen Protomeren des murinen TNFs, was

durch die Bezeichnung *single chain (sc)* beschrieben wird, einem Flag-Epitop und murinem IL2. TNF80(mu)-Flag-IL2(mu) umfasst die konventionelle, lösliche TNFR2-spezifische Form des murinen TNF-Moleküls (TNF80(mu)), einen Flag-Tag und wiederum murines IL2. TNF80(h)-Flag-IL2(h) ist analog zu TNF80(mu)-Flag-IL2(mu) aus den entsprechenden humanen Molekülen aufgebaut. GpL-Flag-IL2(mu) bzw. GpL-Flag-IL2(h) bestehen aus einer N-terminalen GpL-Reporterdomäne, die über einen Flag-Tag mit IL2(h) bzw. IL2(mu) verknüpft ist.

**Tabelle 9: Die Parentalvektoren und Inserts, welche zum Klonieren der TNF-Fusionsproteine verwendet wurden**

	<b>TNF-Ligand variante</b>	<b>Parentalvektor</b>	<b>Vektorverdau</b>	<b>Insert</b>	<b>Insertverdau</b>	<b>Template</b>	<b>Primer</b>
<b>1</b>	<b>TNF80(mu)-Flag-pCR3</b>	TRAILR2-Flag-pCR3	Hind3, Xba1+ CIP	Leader+ Flag+ TNF80(mu) ohne STOP	Hind3, Xba1	TNF80(mu)-Flag- pCR3	T7, TNF80(mu)-Kpn1-Xba1-rwd
<b>2</b>	<b>TNF80(h)-Flag-pCR3</b>	TRAILR2-Flag-pCR3	Kpn1, Xba1+ CIP	Leader+ Flag+ TNF80(h) ohne STOP	Hind3, Xba1	TNF80(h)-Flag-pCR3	T7, TNF80(h)-Kpn1-Xba1-rwd
<b>3</b>	<b>scTNF80(mu)-Flag-pCR3 (STOP)</b>	TRAILR2-Flag-pCR3	EcoR1, Xba1+ CIP	Leader+Flag+ scTNF80(mu) mit STOP	EcoR1, Xba1		
<b>4</b>	<b>TNF80(mu)-Flag-IL2(mu)</b>	TNF80(mu)-Flag(ohne Stop)	Kpn1, Xba1 + CIP	IL2(mu)	Kpn1, Xba1	murine cDNA (T-Zellen)	Mfe1, Xba1
<b>5</b>	<b>TNF80(h)-Flag-IL2(h)</b>	TNF80(h)-Flag-pCR3	Kpn1, Xba1 + CIP	Leader+Flag+ TNF80(h)+ IL2(h)	Kpn1, Xba1	humane cDNA (T-Zellen)	IL2h-Kpn1-linker-fwd, IL2h-Nhe1-2xSTOP-rwd
<b>6</b>	<b>scTNF80(mu)-Flag-IL2(mu)</b>	scTNF80(mu)-Flag-pCR3	Kpn1, Xba1+ CIP	Leader+Flag+ scTNF80(mu)+ IL2(mu)	Kpn1, Xba1	murine cDNA (T-Zellen)	IL2(mu)-Kpn1-linker-fwd. IL2(mu)-Xba1-STOPrwd
<b>7</b>	<b>Gaussia-Flag-IL2(h)</b>	Gaussia-Flag	EcoR1, Xba1 + CIP	Leader+Gaussia+ Flag-IL2(h)	Mfe1, Xba1	Insert als synthetisches Gen	
<b>8</b>	<b>Gaussia-Flag-IL2(mu)</b>	Gaussia-Flag-CD40L-pCR3	EcoR1, Xba1 + CIP	Leader+Gaussia+ Flag-IL2(mu)	Mfe1, Xba1	Insert als synthetisches Gen	

Neben den genannten selbst klonierten Konstrukten, wurden zwei weitere Konstrukte (Fc-Flag-TNC-scTNF80(mu) und Fc(DANA)-2xFlag-TNC-scTNF80(mu)) verwendet, die bereits in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin vorlagen.

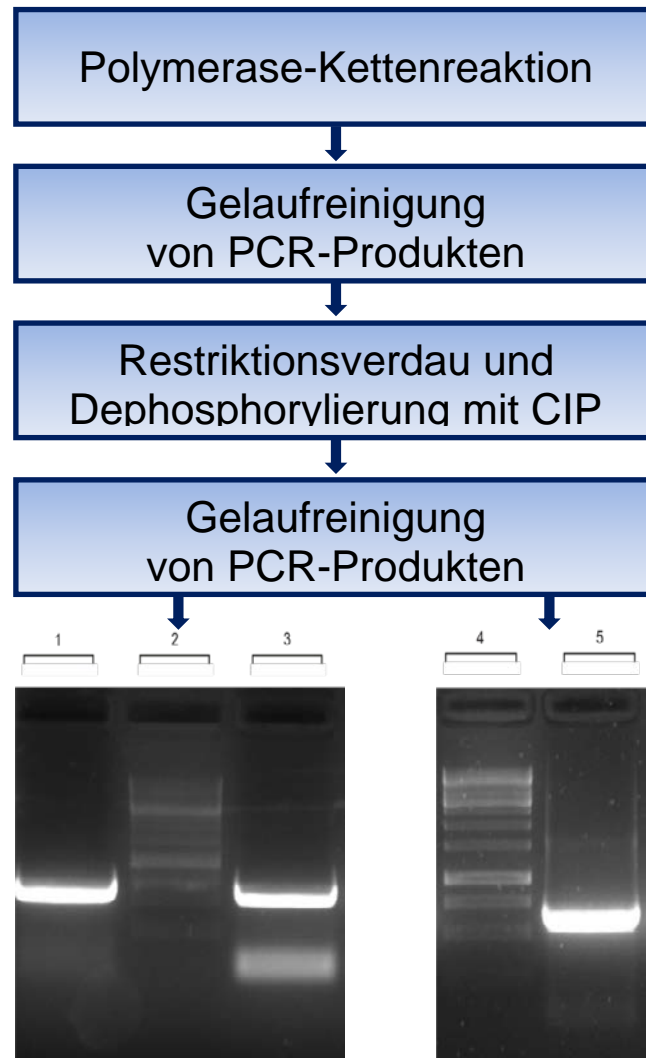
Das Fc-Flag-TNC-scTNF80(mu)-Konstrukt besteht aus einer Fc-Domäne, die Dimer bildet, der TNC-Domäne, die trimerisiert, aus einer scTNF80(mu)-Domäne und einem Flag-Peptid. Aufgrund der gekoppelten Fc- und TNC-Domänen bildet das Konstrukt hexamere scTNF80(mu)-Moleküle und enthält somit 18 TNF-Protomere. Bei Fc(DANA)-2xFlag-TNC-scTNF80(mu) handelt es sich weiterhin um eine Variante mit Mutationen in der Fc-Domäne, die die Bindung an Fcγ-Rezeptoren hemmen. Zunächst wurden drei Plasmid-Intermediate (TNF80(mu)-Flag-ohneSTOP, TNF80(h)-Flag-ohneSTOP, sowie scTNF80(mu)-Flag-ohneSTOP) generiert, in welche anschließend das IL2 in humaner bzw. muriner Gensequenz inseriert wurde. Zur Klonierung der genannten Vorkonstrukte wurde der Vektor TRAILR2-Flag-pCR3 mit den Restriktionsenzymen Hind-III und Xba-I verdaut, sodass die TRAILR2-Flag kodierende DNA-Sequenz entfernt werden konnte. Der Vektor wurde dann mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) dephosphoryliert. Parallel erfolgte durch PCR die Herstellung aus zwei verschiedenen Amplicons mit Hilfe der Plasmide Flag-TNF80(mu) und Flag-TNF80(h), als Template für Leader-Flag-TNF80(mu)-ohneSTOP und zum anderen Leader-Flag-TNF80(h)-ohneSTOP. Beide Amplicons wurden hiernach, genau wie die Vektoren mit Hind-III und Xba-I verdaut, so dass sie mit dem pCR3-Vektor ligiert werden konnten und die oben genannten Konstrukte entstanden.

Im nächsten Klonierungsschritt wurden in diese intermediären Vektoren die synthetischen IL2(mu)- und IL2(h)-Gene inseriert.

Für Analysezwecke und um die Funktionalität einer N-terminalen IL2-Domäne detektieren zu können, wurden die beiden synthetischen IL2-Gene außerdem mit einem *Gaussia princeps*-Luciferase-Flag-(GpL-Flag) Konstrukt fusioniert, sodass GpL-Flag-IL2(h) und GpL-Flag-IL2(mu) kodierende Vektoren entstanden (Tab.9).

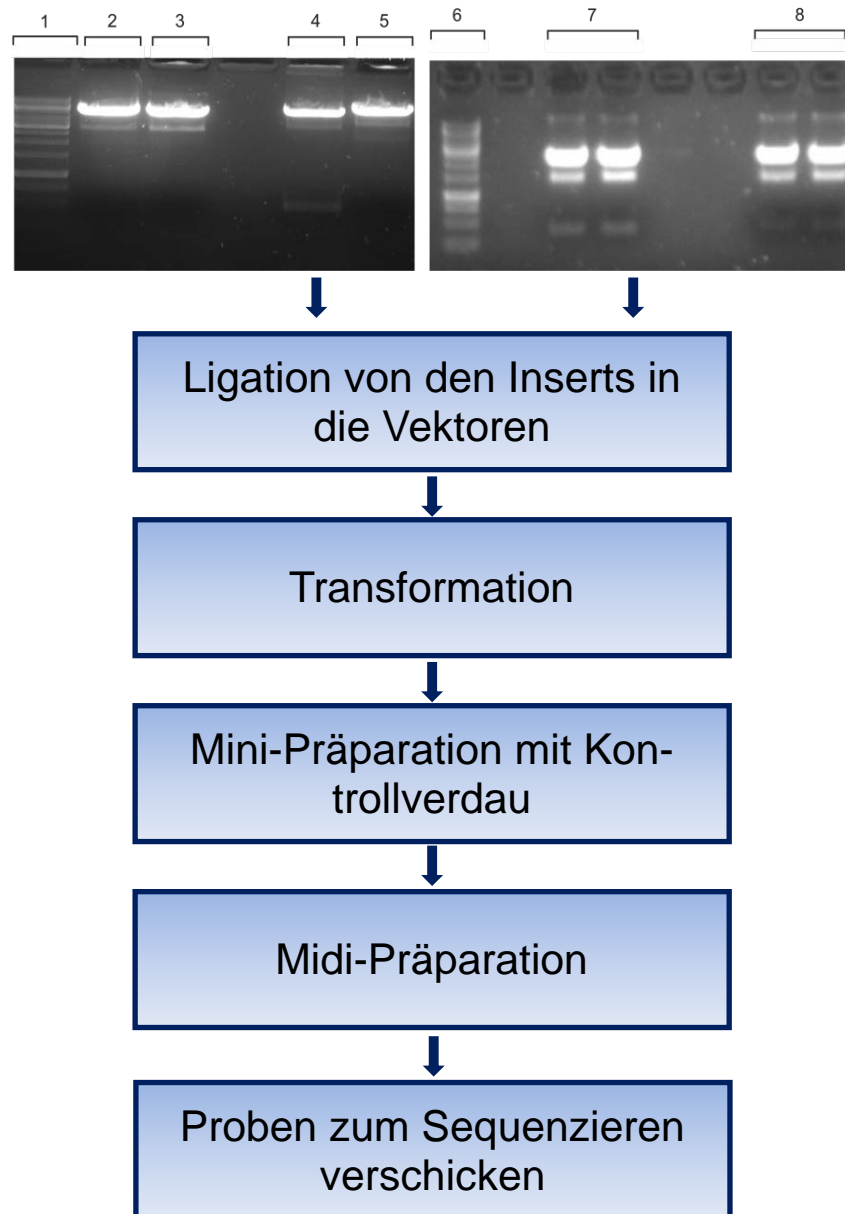
Die *Gaussia princeps Luciferase* (GpL) stammt von dem im Meer lebenden Ruderfuß *Gaussia princeps*. In der Forschung wird dieses Enzym häufig verwendet,

da es aufgrund seiner hohen Aktivität sehr gut als Reporterprotein ist. Die *Gaus-sia princeps* Luciferase katalysiert Photooxidantien (durch Licht ausgelöste Oxidationen).



**Abbildung 9:** Schematischer Prozessablauf zur Herstellung der benötigten Intermediatkonstrukte und Gelabbildungen zum Nachweis der durch PCR gewonnenen Amplicons

Spur 1: Flag-TNF80(mu); Spur 2: DNA-Leiter; Spur 3: Flag-TNF80(h);  
Spur 4: DNA-Leiter; Spur 5: Flag-scTNF80(mu).



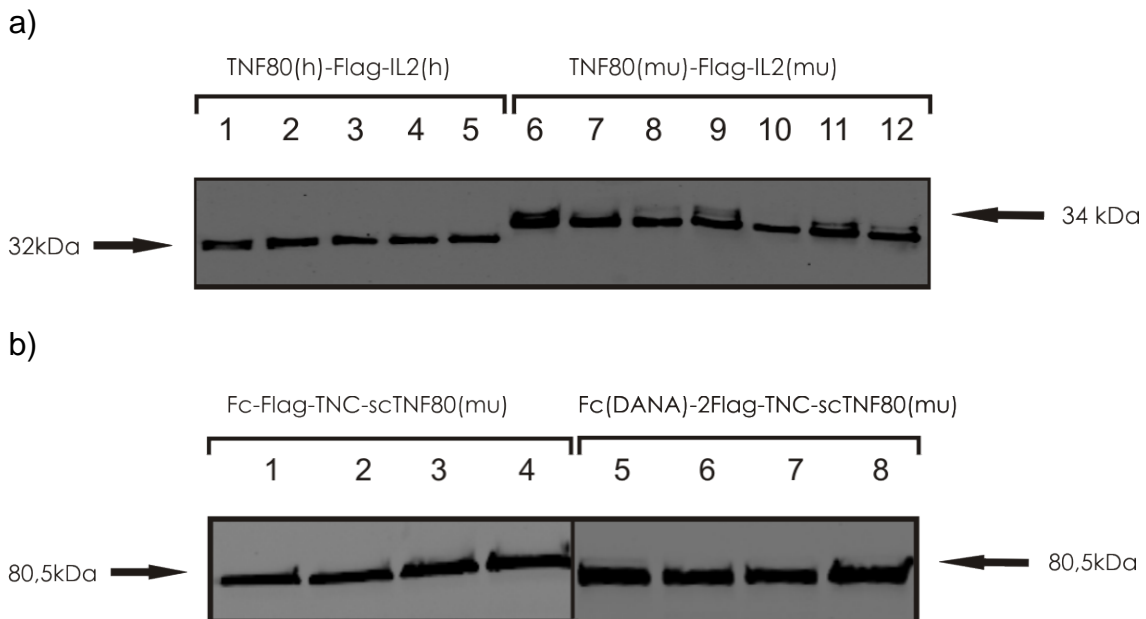
**Abbildung 10: Weiteres Vorgehen des Klonierungsprozesses nach Vorhandensein von Vektoren und Inserts sowie Gelabbildungen**

Abbildungen der mit dem Gel-Dokumentationsgerät visualisierten Vektoren [Spur 2-5], sowie Inserts [Spur 7-8], die anschließend miteinander ligiert wurden. Vektoren: Spur 1: DNA-Marker; Spur 2: Flag-TNF80(mu); Spur 3: Flag-TNF80(h); Spur 4: GpL-Flag-CD40L; Spur 5: Flag-scTNF80(mu); Inserts: Spur 6: DNA-Marker; Spur 7: IL2(h); Spur 8: IL2(mu).



## 4.2 Produktion der Konstrukte

Die verschiedenen Konstrukte wurden durch Transfektion (durch EP oder PEI) von HEK293-Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden produziert. Nach 7 Tagen wurde der Überstand abgenommen, in 50 ml Falcons abzentrifugiert um Zellreste zu entfernen und mittels SDS-Page und anschließender Westernblot-Detektion die darin enthaltenen Konstrukte mittels einem Flag-Standardprotein quantitativ bestimmt (siehe Tab.10).



**Abbildung 11: Westernblot-Analyse von a) TNF80(h)-Flag-IL2(h) und TNF80(mu)-Flag-IL2(mu) sowie von b) Fc-Flag-TNC-scTNF80(mu) und Fc(DANA)-Flag-TNC-scTNF80(mu)**

Aufgetragen wurden auf ein SDS-Gel jeweils 20  $\mu$ l Überstand pro Spur verschiedener unabhängiger Produktionen (1a-5a, 6a-12a bzw. 1b-4b und 5b-8b). Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde mittels Westernblot und einem Standardprotein die Konzentration des Proteins bestimmt.

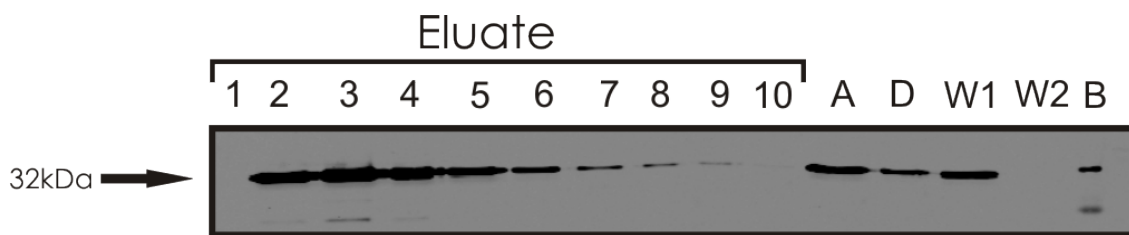
**Tabelle 10: Konzentrationsbestimmung der produzierten Proteine.**

<b>Spur / Protein</b>	<b>Menge (µg)</b>	<b>Konzentration (µg/ml)</b>
1a-TNF80(h)-Flag-IL2(h)	15,5	0,8
2a-TNF80(h)-Flag-IL2(h)	15,0	0,7
3a-TNF80(h)-Flag-IL2(h)	13,0	0,7
4a-TNF80(h)-Flag-IL2(h)	22,2	1,1
5a-TNF80(h)-Flag-IL2(h)	25,2	1,3
6a-TNF80(mu)-Flag-IL2(mu)	62,1	3,1
7a-TNF80(mu)-Flag-IL2(mu)	44,2	2,2
8a-TNF80(mu)-Flag-IL2(mu)	36,4	1,8
9a-TNF80(mu)-Flag-IL2(mu)	40,3	2,0
10a-TNF80(mu)-Flag-IL2(mu)	15,8	0,8
11a-TNF80(mu)-Flag-IL2(mu)	54,2	2,7
12a-TNF80(mu)-Flag-IL2(mu)	41,5	2,1
1b- Fc-Flag-TNC-scTNF80(mu)	37,4	0,8
2b- Fc-Flag-TNC-scTNF80(mu)	40,5	0,9
3b- Fc-Flag-TNC-scTNF80(mu)	47,7	1,1
4b- Fc-Flag-TNC-scTNF80(mu)	74,7	1,6
5b- Fc(DANA)-2Flag-TNC-scTNF80(mu)	38,3	0,8
6b- Fc(DANA)-2Flag-TNC-scTNF80(mu)	35,1	0,8
7b- Fc(DANA)-2Flag-TNC-scTNF80(mu)	30,2	0,7
8b- Fc(DANA)-2Flag-TNC-scTNF80(mu)	49,5	1,1

### 4.3 Aufreinigung der produzierten Proteine

Die verschiedenen Flag-getaggten Proteine wurden anschließend gepoolt und auf die Funktionalität ihrer TNF-Domäne hin geprüft, welche sich stets als hochaktiv herausstellte. Getestet wurde hierzu die Fähigkeit der Proteine in HT1080-TNFR2-Zellen die Produktion von IL8 zu induzieren. Dann wurden manche Proteine mittels Affinitätschromatographie an anti-Flag-Agarose gereinigt. Mit Hilfe von SDS-Page und Silberfärbung wurden die aufgereinigten Proteine analysiert (siehe Abb. 12a und 12b). Hierdurch zeigte sich der Reinigungserfolg und dass die Proteine nach der Aufreinigung nicht degradiert vorlagen und somit für darauffolgende Experimente verwendbar waren.

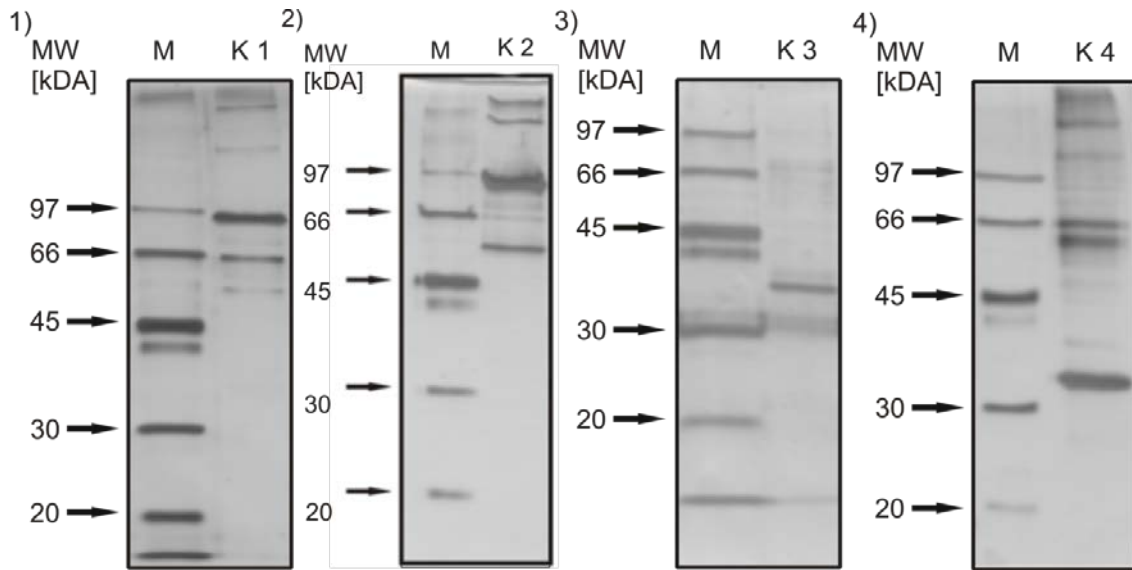
a)



**Abbildung 12: a) Westernblot-Analyse nach Aufreinigung der Fusionsproteine, beispielhaft dargestellt wurde TNF80(h)-Flag-IL2(h)**

Die Fusionsproteine wurden mit HEK293-Zellen produziert und anschließend über eine M2-Agarosesäule aufgereinigt. Die aufgereinigten Proteine wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und mittels Westernblotting und dem anti-Flag M2 mAb und dem mit AP-konjugierten anti-mIgG detektiert. Von links nach rechts: Eluate (1-10) [1:10 Verdünnung, 20  $\mu$ l], Ausgangsprobe 20  $\mu$ l (A), Durchlauf 20  $\mu$ l (D), Waschfraktion 1 und 2 jeweils 20  $\mu$ l (W1, W2).

b)



**Abbildung 12: b) Silberfärbung zur quantitativen und qualitativen Analyse der aufgereinigten Proteine**

1) Fc(DANA)-2Flag-TNC-scTNF80(mu); 2) Fc-Flag-TNC-scTNF80(mu); 3) TNF80(mu)-Flag-IL2(mu); 4) TNF80(h)-Flag-IL2(h). Nach Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der Westernblot-Analyse, wurden jeweils 100 ng/ml des Proteins auf ein SDS-Gel aufgetragen, um durch Visualisierung mittels Silberfärbung die Quantität, sowie die Qualität der aufgereinigten Fusionsproteine zu überprüfen.

Die Summe des Molekulargewichtes der Einzelbestandteile<sup>1</sup> der Fusionsproteine entsprach im Wesentlichen der Größe der sichtbaren Banden im Silbergel. Entsprechend zeigte sich in der Silbergefärbung für Fc(DANA)-2xFlag-TNC-scTNF80(mu) eine Bande bei ca. 80 kDa und für Fc-Flag-TNC-scTNF80(mu) ebenfalls bei 80 kDa. Während sich bei TNF80(h)-Flag-IL2(h) und TNF80(mu)-Flag-IL2(mu) eine Bande bei 33 kDa abzeichnete. Teilweise zeigten sich auch kleinere und größere Banden, die durch Degradation oder durch nicht reduzierte Multimere entstanden sein könnten. In Abb.12b 3) und 4) sind zusätzlich zur erwarteten Bande jedoch noch zwei schmalere Banden auf Höhe von 60 kDa und 90 kDa zu sehen. Es kann davon ausgegangen werden, dass dies die Di- und Trimerisierung des Konstruktes darstellt.

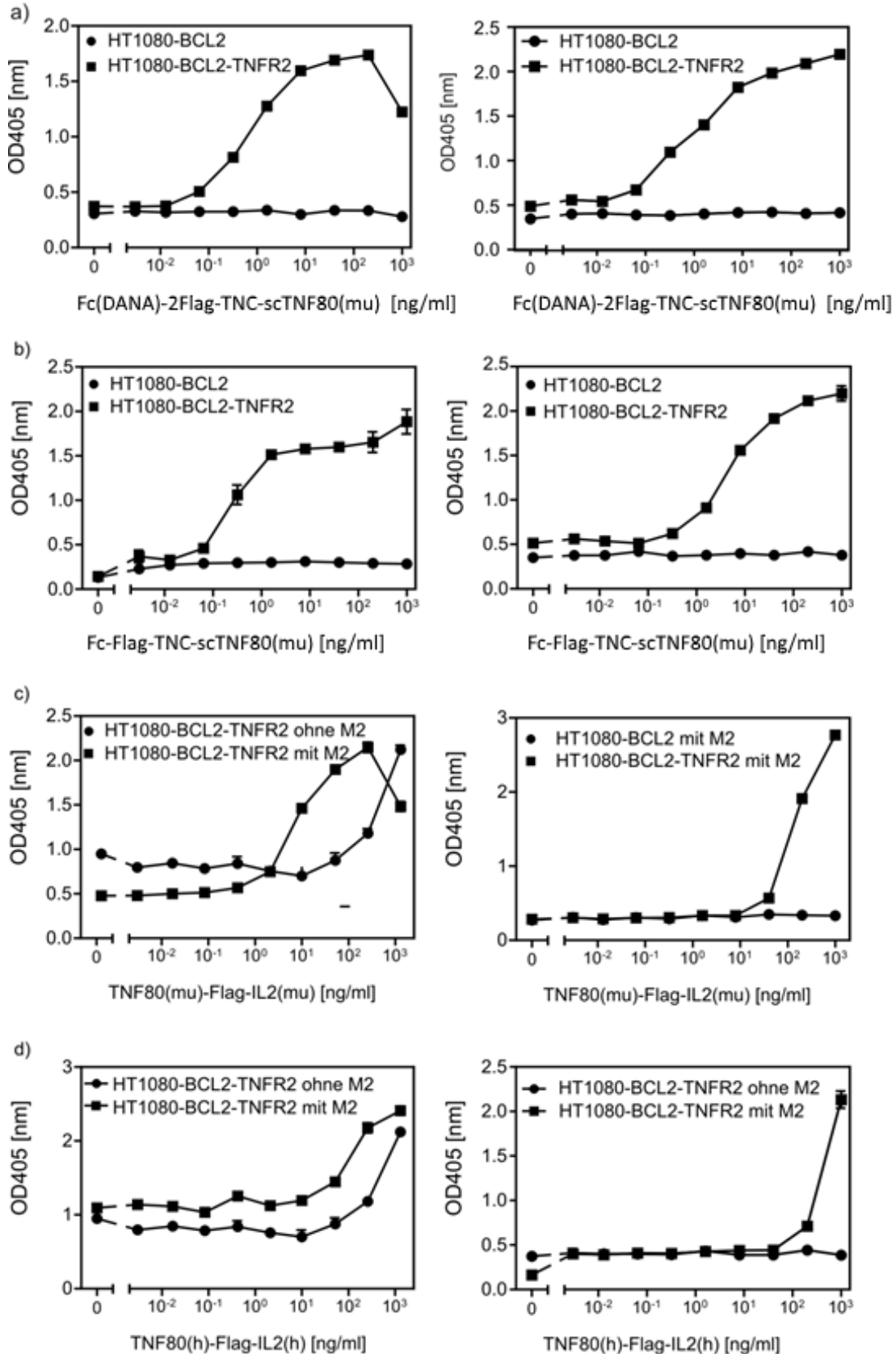
<sup>1</sup> Einzelne Domänen und deren Molekulargewicht:  
TNF80 = 17 kDa; Flag = 1 kDa; TNC = 3,5 kDa; Fc = 25 kDa, IL2 = 15,4 kDa

## **4.4 Funktionsüberprüfung der aufgereinigten Proteine**

### **4.4.1 Charakterisierung der TNFR2-spezifischen TNF-Domäne mittels IL8-ELISA**

Nachdem die klonierten Konstrukte produziert und aufgereinigt waren, wurde verifiziert, ob jede einzelne Domäne der Konstrukte funktionsfähig ist. Die Funktionalität des Flag-Tags wurde bereits dadurch bestätigt, dass die Aufreinigung mittels anti-Flag-Agarose sehr gut funktionierte. Weiterhin kann eine IL8-Konzentrationsmessung mittels ELISA die Funktionalität der TNF-Domäne der Konstrukte aufzeigen, da eine funktionsfähige TNF80-Domäne, den NFκB-Signalweg in HT1080-TNFR2-Zellen TNFR2-vermittelt aktiviert, was zur gesteigerten IL8-Sekretion führt. Somit dient die IL8-Induktion als Nachweis für die Aktivierung des NFκB-Systems. Um auszuschließen, dass durch die Aufreinigung der Konstrukte deren Funktionalität beeinträchtigt wurde, erfolgte zum direkten Vergleich parallel eine IL8-ELISA-Messung von Überständen von Zellen, die mit Überständen der jeweils aufgereinigten Fusionsproteine stimuliert wurden. (siehe Abb. 13):

## Überstände der Fusionsproteine vor Aufreinigung nach Aufreinigung



**Abbildung 13: IL8-Induktion durch verschiedene TNF-Fusionsproteine vor und nach deren Aufreinigung**

Wie unter 3.4.3. beschrieben, wurde der Versuch mit den Fc(DANA)-2Flag-TNC-scTNF80(mu) (Abb.13a) und Fc-Flag-TNC-scTNF80(mu)-Konstrukten (Abb. 13b) mit zwei verschiedenen Zelllinien (HT1080-Bcl2-Zellen und HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen) durchgeführt. Stimuliert wurde mit jeweils steigender Konzentration der zu testenden Konstrukte. Die TNF80(mu)-Flag-IL2(mu) (Abb.13c) und TNF80(h)-Flag-IL2(h)-Konstrukte (Abb. 13d) wurden mit oder ohne M2-Antikörper in steigenden Konzentrationen auf die Zellen gegeben und stimulierten nur HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen.

In Abb. 13 a und b ist eine deutliche Aktivitätsdifferenz zwischen HT1080- und HT1080-TNFR2-Zellen erkennbar. Wie zu erwarten war, entstand bei den HT1080-Bcl2-Zellen, die keinen TNFR2-Rezeptor exprimieren kein IL8-Signal, wodurch diese Zellen als Negativkontrolle dienten. Wurden die TNFR2-spezifischen *single-chain*-Konstrukte auf HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen gegeben, so ging bei beiden Konstrukten mit steigender Konzentration ein steigendes IL8-Signal einher. Die beiden *single-chain*-Konstrukte Fc(DANA)-2Flag-TNC-scTNF80(mu) (siehe Abb. 13 a) und Fc-Flag-TNC-scTNF80(mu) (siehe Abb. 13 b) wiesen keine nennenswerten Unterschiede auf, was die IL8-Messung vor und nach der Aufreinigung betrifft. Dies spricht dafür, dass sie die Aufreinigung unbeschadet überstanden hatten.

Die TNF80(mu)-Flag-IL2(mu)- und TNF80(h)-Flag-IL2(h)-Konstrukte wurden jeweils mit der gleichen Zelllinie, jedoch einmal mit und einmal ohne M2-Quervernetzung getestet. Die M2-Quervernetzung führt zur Oligomerisierung der Konstrukte, wodurch eine höhere IL8-Produktionsaktivität erwartet wird.

Die IL8-Produktion des murinen Konstruktes vor Aufreinigung (Abb. 13 c) war auf HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen ohne M2-Quervernetzung zwar zunächst höher im Vergleich zu den nichtquervernetzten Zellen, jedoch begann die IL8-Produktionsaktivität der Zellen erst bei deutlich höherer Konstruktkonzentration verglichen mit den M2-quervernetzten Zellen. Unterdessen war beim humanen TNF80-Flag-IL2-Konstrukt vor Aufreinigung (Abb. 13 d) eine konstant höhere IL8-Produktion der HT1080-Bcl2-Zellen mit M2-Quervernetzung sichtbar. Dahingegen

war jedoch auffallend, dass die monomeren Konstrukte nach der Aufreinigung (Abb. 13 c und d) im Vergleich zu vor der Aufreinigung - wie zu erwarten war - eine deutliche Steigerung in der IL-8-Produktion zeigten, sobald eine Oligomerisierung durch M2-Quervernetzung vorlag.

Schlussendlich zeigten die Versuche jedoch deutlich, dass die Proteinaufreinigung keine relevante Aktivitätsveränderung der Fusionsproteine zur Folge hatte.

#### **4.4.2 Bindungsstudien**

#### **4.4.3 Evaluierung der IL2-Domäne mittels Bindungsstudie an IL2-Rezeptor-exprimierenden Zellen**

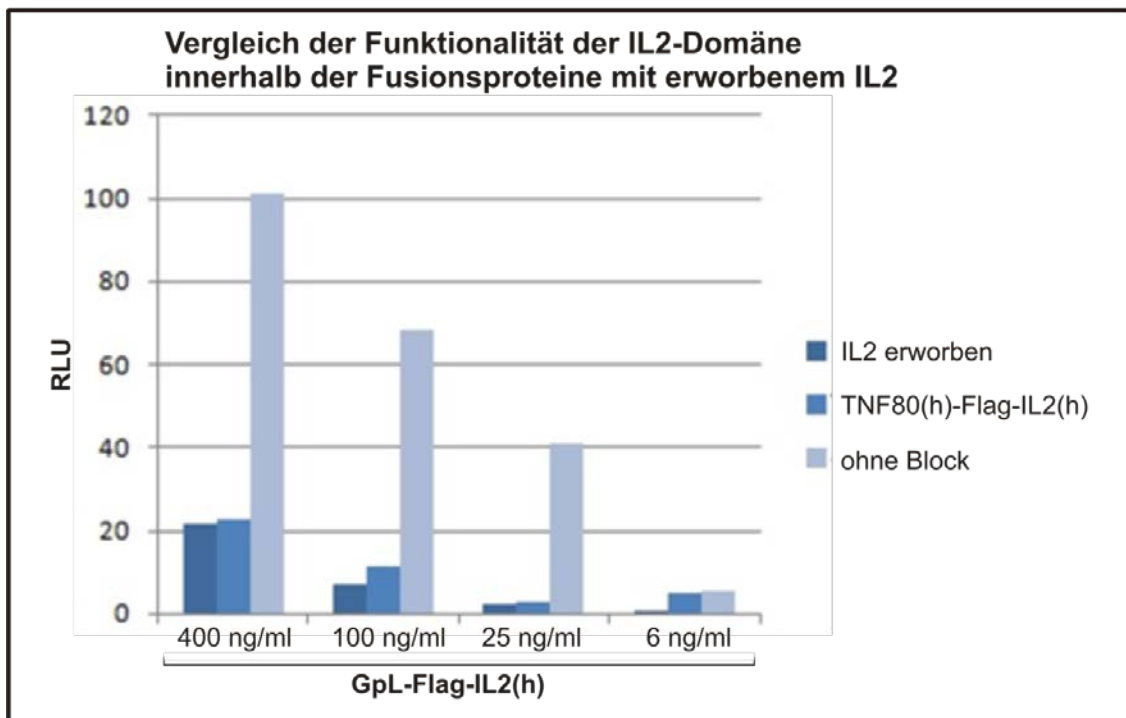
Da jede Domäne der generierten Konstrukte funktionsfähig sein musste, galt es weiterhin den IL2-Teil der klonierten Konstrukte zu testen, was durch Bindungsstudien geschah. Wie unter 4.1. beschrieben wurden speziell hierfür zwei weitere Konstrukte, die neben der IL2-Domäne auch die *Gaussia Princeps Luciferase* (GpL) beinhalten, kloniert: GpL-Flag-IL2(h) und GpL-Flag-IL2(mu) sind über die GpL-Domäne sehr sensibel detektierbar. Somit konnte durch Competition zwischen dem GpL-Flag-IL2-Konstrukt und TNF80(h)-Flag-IL2(h) letztendlich auf die Funktionsfähigkeit der IL2-Domäne innerhalb des Fusionsproteins geschlossen werden.

Hierzu wurden  $8,5 \times 10^6$  humane T-Zellen in drei Gruppen gleichmäßig auf Eppendorf-Gefäße verteilt. Gruppe 1 wurde mit konventionellem IL2 behandelt, Gruppe 2 wurde mit TNF80(h)-Flag-IL2(h) vorstimuliert während die dritte Fraktion ohne Block belassen wurde. Nach einer Inkubationszeit auf Eis wurde GpL-Flag-IL2(h) in einer Titrationsreihe hinzugegeben. Anschließend erfolgte wiederum eine Inkubationszeit auf Eis, bevor die Zellen mit PBS gewaschen und eine GpL-Messung auf die verbliebene zellgebundene GpL-Aktivität durchgeführt wurde.

Das Ergebnis der GpL-Messung zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen T-Zellen mit zuvor geblocktem IL2-Rezeptor (Gruppe 1 und 2) zu T-Zellen mit freien IL2-Bindungsstellen (Gruppe 3) für GpL-Flag-IL2 (siehe Abb. 14). Anhand



der niedrigen GpL-Signale der Proben, auf die zunächst TNF80(h)Flag-IL2(h) oder IL2 gegeben wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass in diesen Fällen die IL2-Bindungsstellen der T-Zellen besetzt wurden und somit keine GpL-Flag-IL2(h)-Bindung an die T-Zellen zustande gekommen ist. Da TNF80(h)-Flag-IL2(h) die Bindung von GpLFlag-IL2(h) ähnlich gut verhinderte wie IL2, ist davon auszugehen, dass die IL2-Domäne innerhalb der TNF80(h)-Flag-IL2(h) funktionsfähig ist.



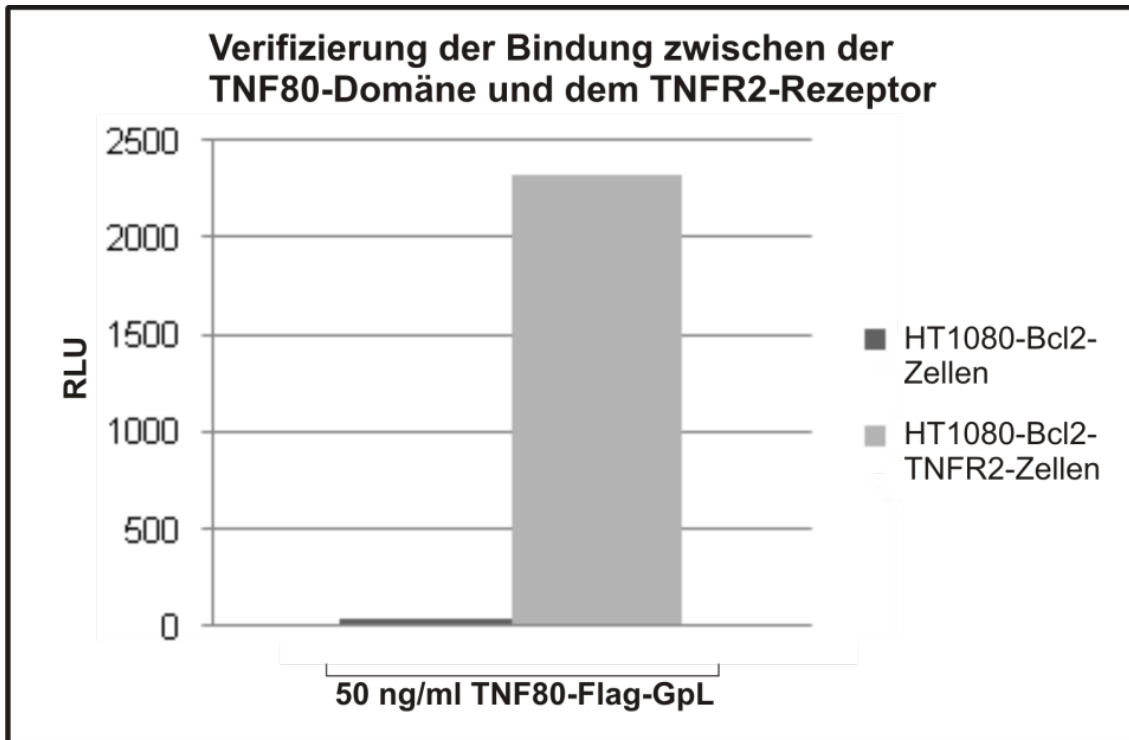
**Abbildung 14: GpL-IL2-Kompetition mit IL2 und TNF80(h)-Flag-IL2(h)**

Zellen ohne Block, das heißt, welche nicht mit TNF80(h)-Flag-IL2(h) oder IL2 vorinkubiert wurden, weisen eine deutliche erhöhte spezifische Bindung von GpL-IL2 auf. Während das erworbene IL2 und das klonierte TNF80(h)-Flag-IL2(h) die IL2-Bindungsstellen der Zellen blockierten, ergab sich für das IL2 innerhalb des GpL-IL2-Konstruktes keine Möglichkeit mehr an die Zellen zu binden, wodurch ein geringeres GpL-Signal zu messen war.

#### **4.4.4 Funktionalität der TNF80-Domäne der Fusionsproteine**

Wie vorherige Bindungsstudien zeigten, stellte sich die IL2-Domäne als funktionell heraus. Weiterhin wurden Bindungsstudien auch verwendet um die Bindungsaktivität der TNF80-Domäne an den TNFR2-Rezeptor, welche durch IL8-Assays bereits überprüft wurde, unabhängig hiervon zu verifizieren. Des Weiteren wurde dadurch die Bindungsspezifität der TNF80-Domäne an den TNFR2-Rezeptor bewiesen.

Hierfür wurde das GpL-Signal von HT180-Bcl2-Zellen und HT1080-TNFR2-Zellen verglichen, die mit einem bereits geprüften TNFR2-spezifischen TNF80-Flag-GpL-Konstrukt inkubiert wurden (siehe Abb.15). Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied des GpL-Signals zwischen diesen beiden Zelllinien nach Inkubation mit TNF80-Flag-GpL und abwaschen des ungebundenen Fusionsproteins. Da das hinzugegebene TNF80-Flag-GpL-Konstrukt an HT1080-Bcl2-Zellen aufgrund des fehlenden TNFR2-Rezeptors nicht binden konnte, wurde dies als Negativkontrolle verwendet. Das zwar geringere, aber dennoch vorhandene messbare GpL-Signal der HT1080-Bcl2-Zellen zeigt deren unspezifische Bindung des Konstrukts. Indessen deutete das deutlich höher messbare GpL-Signal der HT1080-Bcl2-TNR2-Zellen auf eine spezifische Bindung des TNF80-Flag-GpL-Konstruktes hin und bestätigt somit die grundsätzliche Funktionalität der TNF80-Domäne.

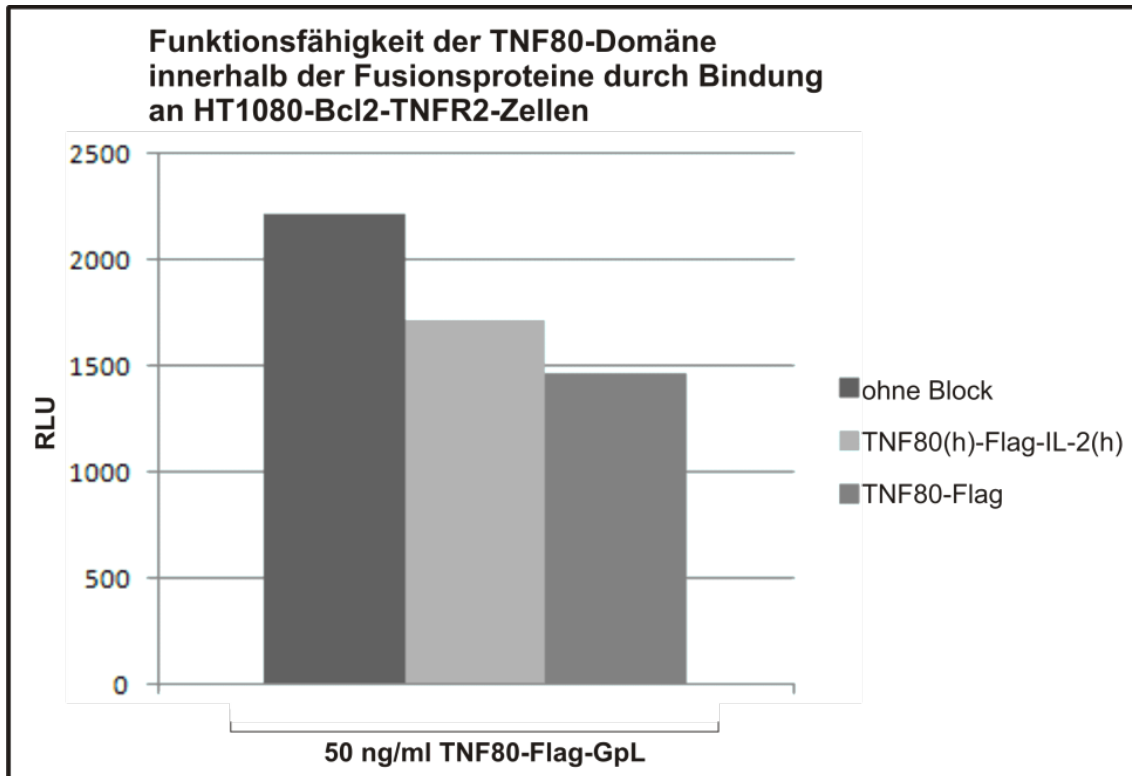


**Abbildung 15: Vergleich des GpL-Signals nach Zugabe von 50 ng/ml TNF80-Flag-GpL auf HT1080-Bcl2-Zellen und HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen**

Hierfür wurden 300000 Zellen/Well der HT1080-Bcl2-Zellen und HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen ausgesät, am Folgetag mit 50 ng/ml TNF80-Flag-GpL stimuliert und mit Hilfe eines GpL-Standards gemessen.

#### 4.4.5 Konkurrenz von TNF80(h)-Flag-IL2 mit TNF80-GpL

Die TNF80-Bindung an den TNFR2-Rezeptor wurde anhand der Bindung an HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen in Abb.15 aufgezeigt. Um die Bindungsaffinität der TNF80-Domäne innerhalb der generierten Fusionsproteine zu testen, wurde ein Wettbewerbsassay (wie unter 3.3.5. beschrieben) durchgeführt. Hierfür wurden HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen ausgesät und anschließend mit dem zu testenden Konstrukt TNF80-Flag-IL2(h) und zum Vergleich TNF80-Flag sowie mit einer konstanten Konzentration TNF80-Flag-GpL inkubiert (siehe Abb. 16). Da die Fraktion, die ohne Block belassen wurde, deutlich höheren RLU-Werte aufwies als die Fraktionen, die mit TNF80(h)-Flag-IL2(h) oder der Kompetitor-Positivkontrolle TNF80-Flag behandelt wurde, wurde die Bindungsfähigkeit der TNF80-Domäne innerhalb der Fusionsproteine bestätigt.



**Abbildung 16: Die Funktionsfähigkeit der TNF80-Domäne innerhalb der generierten Fusionsproteine**

Die HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen wurden in einer 24 Well-Platte ausgesät und in drei Fraktionen unterteilt. Die 1. Gruppe wurde zunächst ohne Block belassen, während die 2. und 3. Gruppe mit den angegebenen TNF80-Konstrukten behandelt wurden. Zudem wurde zu allen drei Gruppen 50 ng/ml TNF80-Flag-GpL hinzugegeben. Nach etwa 1,5 h Inkubation bei 37°C wurde die Gaussia-Messung durchgeführt.

## 5 Diskussion

Ziel der Arbeit war die Klonierung und funktionelle Charakterisierung von löslichen rekombinanten TNFR2-spezifischen TNF-Fusionsproteinen.

Kloniert und analysiert wurden einerseits TNF-Fusionsproteine mit IL2 und andererseits mit der schweren konstanten Antikörperkette des humanen IgG1 (Fc). Insbesondere wurde der Effekt der Oligomerisierung dieser TNF-Ligand-Varianten auf deren TNFR2 aktivierende Aktivität erforscht und verglichen. Um die TNFR2-Spezifität zu erhalten, wurde eine bekannte TNFR2-spezifische Mutante des TNFs für die Arbeiten verwendet.

TNF ist ein Zytokin, das eine multifunktionelle Rolle im Immunsystem spielt und unter anderem an Entzündungsprozessen beteiligt ist. TNF kann sowohl in löslicher, als auch in membrangebundener Form vorkommen und bindet natürlicherweise an die Rezeptoren TNFR1 und TNFR2. Während membrangebundenes TNF TNFR1 und TNFR2 bindet und beide auch aktiviert, kann lösliches TNF zwar ebenso an beide Rezeptoren binden, jedoch nur TNFR1 optimal stimulieren. (Grell, Douni et al. 1995, Grell, Wajant et al. 1998) TNFR1 wird ubiquitär auf den körpereigenen Zellen exprimiert. TNFR2 befindet sich ausschließlich auf Endothelzellen, Nervenzellen und Zellen des Immunsystems. (Heller and Kronke 1994, Aggarwal, Gupta et al. 2012) Eine Aktivierung von TNFR1 führt verstärkt zu Inflammation, was im Kontext einer Sepsis für den Menschen lebensbedrohliche Folgen haben kann. (Chopra, Lang et al. 2013) Bindet TNF hingegen an TNFR2 hat dies unter anderem eine Stimulierung regulatorischer T-Zellen zur Folge, was therapeutisch gut zu nutzen wäre, wenn gleichzeitig die Möglichkeit besteht, die TNFR1-Wirkungskette zu verhindern. Hierfür ist eine spezifische Bindung von TNF an TNFR2 notwendig, welche durch die TNF-Mutante TNF80 (p80) erreicht werden kann (Loetscher, Stueber et al. 1993, Rauert, Wicovsky et al. 2010), die auch in dieser Arbeit verwendet wurde.

Zur klinischen Nutzung im Sinne einer Injektion, ist man auf die lösliche Variante des TNFs angewiesen. Damit lösliches TNF auch den TNFR2 aktiviert, entwi-

ckelte man in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin in Würzburg ein non-ameres TNF80-Konstrukt, TNC-*single-chain*-TNF80. Da das *single chain* TNF80 (Krippner-Heidenreich, Grunwald et al. 2008) bereits drei TNF-Protomere enthält und die TNC-Domäne die Trimerisierung von Proteinen vermittelt, liegt TNF innerhalb des TNC-*single-chain*-TNF80-Konstruktes letztendlich als Nonamer vor. (Rauert, Wicovsky et al. 2010) Weiterhin wurde gezeigt, dass oligomere lösliche TNF-Trimere, die durch Zugabe eines quervernetzten Antikörpers gebildet wurden, im Gegensatz zu löslichen Trimeren ähnlich gut wie Membran-TNF den TNFR2 aktivieren. (Grell, Douni et al. 1995, Schneider, Holler et al. 1998) Das nonamere TNC-*single-chain*-TNF80 wirkt daher auch ohne zusätzliche Oligomerisierung als lösliches Konstrukt sehr gut stimulierend auf den TNFR2. Des Weiteren zeigte die Arbeitsgruppe der Molekularen Inneren Medizin in Zusammenarbeit mit der AG Beilhack, dass auf den TNFR2 aktivierend wirkende murine Variante des TNC-*single-chain*-TNF80-Konstrukts die Proliferation von T<sub>regs</sub> in Mäusen anregt. (Chen, Baumel et al. 2007, Chopra, Lang et al. 2013)

Da neben TNFR2 auch der IL2-Rezeptor hoch auf T<sub>regs</sub> exprimiert wird, erfolgte im Zuge dieser Dissertation eine Verknüpfung von TNF80-Fusionsproteinen mit IL2, um eine spezifischere Stimulation von T<sub>regs</sub> zur Therapie von Autoimmunerkrankungen zu erreichen. Weiterhin erhofft man sich durch eine spezifische Bindung eines Fc-Fusionsproteins von TNF80 an T<sub>regs</sub> einen verstärkten antitumoralen Effekt durch Zerstörung der T<sub>regs</sub> mittels ADCC zu erreichen.

Die Wirkung des IL2 durch Aktivierung von Abwehrzellen des Immunsystems in der Tumorthherapie wurde bereits wissenschaftlich nachgewiesen: Eine Inkubation von Lymphozyten mit IL2 führt sowohl in der Anwendung bei Mäusen, als auch beim Menschen zur Entwicklung von Zellen, die Tumorgewebe zerstören. Die toxische Wirkung auf Tumorzellen ist abhängig von der Inkubationszeit, sowie der Dosierung des Interleukins. Beim Menschen wurde der anti-tumorale Effekt von IL2 bisher zur Therapie von Nierenzellkarzinomen, fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen, sowie Melanomen klinisch zum Einsatz gebracht. (Kolitz and Mertelsmann 1991, E. Huland 1993)

Eine systemische intravenöse Gabe von IL2 in bewirkungswirksamer Dosis führt zu sehr starken Nebenwirkungen wie Flüssigkeitsretentionen oder erhöhter kardiopulmonaler Belastung, die schnell lebensbedrohlich werden können. Außerdem entsteht durch systemische Verabreichung von IL2 aufgrund der kurzen Serumverweildauer ein rapider Wirkstoffverlust, was einen geringeren therapeutischen Effekt zur Folge hat. (E. Huland 1993)

Die hoch dosierte, lokale Applikation von IL2 wäre deutlich wirkungsvoller und würde zugleich weniger Nebenwirkungen aufweisen. Einen spezifischeren lokalen Wirkungseffekt erhofft man sich in dieser Arbeit durch gleichzeitige Adressierung des TNFR2 und IL2R auf T<sub>regs</sub> und generierte daher TNF80-IL2-Fusionsproteine.

Die löslichen TNF80-Ligandvarianten wurden hierzu so weiterentwickelt, dass sie eine hohe Selektivität auf regulatorische T-Zellen aufweisen und diese somit vermehrt zur Proliferation anregen. Dies wäre therapeutisch zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen gut nutzbar, da hierbei eine Unterzahl von T<sub>regs</sub> vorzufinden ist.

Aus diesem Grunde wurden die Kombinationskonstrukte scTNF80(mu)-Flag-IL2(mu), TNF80(mu)-Flag-IL2(mu), TNF80(h)-Flag-IL2(h) kloniert, die zusätzlich zum TNFR2 auch auf den T<sub>regs</sub> hoch exprimierten IL2R binden. Beide Rezeptoren, sowohl der IL2R und der TNFR2 werden zwar auch auf anderen Zellen exprimiert, dennoch erhoffte man sich, dass durch ein Kcotargeting weniger Nebenwirkungen auf TNFR2-only- und IL2R-only-Zellen entstehen, da vermehrt und spezifischer Zellen, die beide Rezeptoren gleichzeitig aufweisen, aktiviert werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass aufgrund von zwei Bindungsstellen durch zwei Rezeptoren eine längere Retention des Wirkstoffes an den Zellen besteht, was das Verhältnis von zellulärer Wirkung zur Serumhalbwertszeit verbessern könnte.

Nach Klonierung von den TNFR2-spezifischen oligomeren TNF-Konstrukten scTNF80(mu)-Flag-IL2(mu), TNF80(mu)-Flag-IL2(mu) und TNF80(h)-Flag-IL2(h) wurden diese auf Funktionalität geprüft.

Eine Aktivierung von TNF-Rezeptoren kann zum einen durch Antikörper, zum anderen aber auch durch lösliche TNF-Ligand-Varianten erzielt werden. (El-Mesery, Trebing et al. 2013) Im Fall der vorliegenden Konstruktfusion TNF80-IL2 kann davon ausgegangen, dass IL2 mit dem TNF80-IL2-Konstrukt konkurriert, was die Bindung an den IL2-R betrifft. Somit könnte die Möglichkeit bestehen, die Aktivität der TNF80-Domäne von TNF80-IL2 am TNFR2 durch Immobilisierung aufgrund der Bindung an den IL2-Rezeptor zu erhöhen. Dadurch erscheint das Fusionsprotein wie ein membrangebundenes TNF-Konstrukt, wodurch es eine schnellere und bessere Wirkung zur Folge hätte.

Des Weiteren gibt es bestimmte therapeutische Situationen, in denen man  $T_{regs}$  bevorzugt inhibieren oder zerstören möchte, was z.B. im Fall einer Tumorerkrankung zutrifft. Hierbei versucht sich der Tumor mit Hilfe regulatorischer T-Zellen vor der Bekämpfung des Immunsystems zu schützen, was man zu verhindern versucht. Dies könnte mit Hilfe eines TNFR2-bindenden Fc-Moleküls gelingen, das als Imitierung eines Antikörperfragmentes ADCC (*antibody dependent cellular cytotoxicity*) auslösen soll.

Infolge dieser Überlegung wurden in der Arbeitsgruppe der Molekularen Inneren Medizin TNF80-Fusionsproteine mit einem Fc-Fragment verknüpft.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die TNF80-Ligandvarianten Fc-Flag-TNC-scTNF80(mu) und Fc(DANA)-2xFlag-TNC-scTNF80(mu) charakterisiert und auf Funktionalität überprüft.

Die Unterscheidung der genannten Konstrukte liegt in Bindungsaktivität an die Fc $\gamma$ -Rezeptoren, welche durch die Deklaration „DANA“, die eine Mutation in der Fc-Domäne aufweist, oder die „will-Typ“- Variante, die natürlich vorkommende Aktivität gekennzeichnet ist. Mittels IL8-ELISA, sowie durchgeführten Bindungsstudien konnte belegt werden, dass die in dieser Arbeit klonierten TNF80-Fc-Konstrukte funktionsfähig sind. Künftige Arbeiten müssen nun zeigen, ob dieses Konstrukt ADCC im Tier auslöst.

Zukünftig wird weiterhin zu klären sein, ob TNF80(h)-Flag-IL2(h) bzw TNF80(mu)-Flag-IL2(mu) die IL8-Produktion stimuliert, nachdem sein IL2-Teil an



den IL2-Rezeptor gebunden hat. Dies würde darauf hinweisen, dass hierdurch die Aktivität des Konstruktes erreicht worden wäre. Dies wäre zum Beispiel mit Hilfe von Assays in Kokultur mit TNFR2-exprimierenden Zellen und T-Zellen denkbar.

## 6 Zusammenfassung

Liganden und Rezeptoren des Körpers spielen eine multifaktorielle Rolle in der Regulierung zellulärer Prozesse des Körpers. Der Tumornekrosefaktor (TNF), ein proinflammatorisches Zytokin, bindet natürlicherweise an zwei Rezeptoren, den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) oder den TNFR-Rezeptor 2 (TNFR2) und kann durch Aktivierung vielfältiger Signalwege unterschiedliche Zelleffekte im Körper auslösen. Während TNF in membrangebundener Form vorkommend TNFR1 sowie TNFR2 optimal stimulieren kann, ist lösliches TNF in der Lage zwar an beide Rezeptoren zu binden, natürlicherweise jedoch nur den TNFR1 zu stimulieren. Da eine unkontrollierte Bindung bzw. Aktivierung von beiden Rezeptoren schwere unerwünschte Nebenwirkungen wie Inflammationen haben kann, wurden zur konkreten Aktivierung der einzelnen Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 spezifische TNF-Mutanten, wie TNF80 zur Bindung an TNFR2 und TNF60 zur Bindung an TNFR1 konstruiert. Durch die TNF-Mutante TNF80 gelingt es die TNFR2 Wirkungskette zu aktivieren, während die TNFR1-Stimulation verhindert wird. Die Aktivierung des TNFR2-Rezeptors hat eine Stimulierung von regulatorischen T-Zellen ( $T_{\text{regs}}$ ) zur Folge.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden einerseits die TNF-TNC-Formen weiterentwickelt, indem die konstante Domäne der schweren Antikörperkette des humanen IgG1 (Fc) hinzukloniert wurde. Hier wurde primär der Effekt der Oligomerisierung mit der aktivierenden Wirkung auf TNFR2 erforscht. Weiterhin wird jedoch durch die Bindungsspezifität des Fc-Fusionsproteins von TNF80 an  $T_{\text{regs}}$  eine antitumorale Wirkung ausgelöst, indem durch das ausgelöste ADCC die  $T_{\text{regs}}$  zerstört werden.

Andererseits wurden Kombinationskonstrukte von TNF80 und IL2 kloniert um die Bindungsspezifität des Fusionsproteins auf TNFR2, ebenso wie den IL2-Rezeptor welcher auf regulatorischen T-Zellen hoch exprimiert wird, herzustellen.

Die spezifische Stimulation von  $T_{\text{regs}}$  würde der Therapie von Autoimmunerkrankungen dienen.

In der Abteilung für Molekulare Innere Medizin in Würzburg wurde eine kovalent verknüpfte, nonamere Form von TNF, nämlich eine *single-chain*-TNF-TNC-Form hergestellt, sodass auch die Aktivierung von TNFR2 durch lösliches TNF möglich ist, was zur klinischen Anwendung (durch Injektionen) notwendig ist.

Nach Klonierung und Produktion der Konstrukte in HEK293-Zellen erfolgte deren Aufreinigung und Quantifizierung. Letztendlich wurde mittels Bindungsstudien die Funktionalität der aufgereinigten Fusionsproteine überprüft.

Zukünftige Studien müssen nun aufklären, ob die IL8-Produktion durch TNF80(h)-Flag-IL2(h) bzw. TNF80(mu)-Flag-IL2(mu) stimuliert wird, nachdem der IL2-Teil der Konstrukte den IL2-Rezeptor gebunden hat.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **3**(9): 745-756.
- Aggarwal, B. B., S. C. Gupta and J. H. Kim (2012). "Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey." Blood **119**(3): 651-665.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-1308.
- Bashyam, H. (2007). "Uncovering the dark side of TNF." J Exp Med **204**(9): 2013.
- Baud, V. and M. Karin (2009). "Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls." Nat Rev Drug Discov **8**(1): 33-40.
- Berghoff, W. (2011). Differenzierung von T-Helferzellen in Typ 1 und Typ 2 entsprechend deren funktioneller Eigenschaften: 7.
- Bodmer, J. L., P. Schneider and J. Tschopp (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." Trends Biochem Sci **27**(1): 19-26.
- Bonizzi, G. and M. Karin (2004). "The two NF-kappa B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." Trends in Immunology **25**(6): 280-288.
- Bradley, J. R. and J. S. Pober (2001). "Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)." Oncogene **20**(44): 6482-6491.
- Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore and B. Williamson (1975). "Endotoxin-Induced Serum Factor That Causes Necrosis of Tumors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **72**(9): 3666-3670.
- Chan, F. K. (2000). "The pre-ligand binding assembly domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function." Ann Rheum Dis **59** **Suppl 1**: i50-53.
- Chan, F. K., H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui and M. J. Lenardo (2000). "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling." Science **288**(5475): 2351-2354.
- Chen, G., P. Cao and D. V. Goeddel (2002). "TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90." Mol Cell **9**(2): 401-410.
- Chen, X., M. Baumel, D. N. Mannel, O. M. Howard and J. J. Oppenheim (2007). "Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells." J Immunol **179**(1): 154-161.
- Chopra, M., I. Lang, S. Salzmann, C. Pachel, S. Kraus, C. A. Bauerlein, C. Brede, A. L. Garrote, K. Mattenheimer, M. Ritz, S. Schwinn, C. Graf, V. Schafer, S. Frantz, H. Einsele, H. Wajant and A. Beilhack (2013). "Tumor necrosis factor induces tumor promoting and anti-tumoral effects on pancreatic cancer via TNFR1." PLoS One **8**(9): e75737.

- Chopra, M., S. S. Riedel, M. Biehl, S. Krieger, V. von Krosigk, C. A. Bauerlein, C. Brede, A. L. Jordan Garrote, S. Kraus, V. Schafer, M. Ritz, K. Mattenheimer, A. Degla, A. Mottok, H. Einsele, H. Wajant and A. Beilhack (2013). "Tumor necrosis factor receptor 2-dependent homeostasis of regulatory T cells as a player in TNF-induced experimental metastasis." Carcinogenesis **34**(6): 1296-1303.
- Claudio, E., K. Brown, S. Park, H. Wang and U. Siebenlist (2002). "BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells." Nat Immunol **3**(10): 958-965.
- Cools, N., P. Ponsaerts, V. F. I. Van Tendeloo and Z. N. Berneman (2007). "Regulatory T cells and human disease." Clinical & Developmental Immunology.
- Coope, H. J., P. G. Atkinson, B. Huhse, M. Belich, J. Janzen, M. J. Holman, G. G. Klaus, L. H. Johnston and S. C. Ley (2002). "CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52." EMBO J **21**(20): 5375-5385.
- Corredor, J., F. Yan, C. C. Shen, W. Tong, S. K. John, G. Wilson, R. Whitehead and D. B. Polk (2003). "Tumor necrosis factor regulates intestinal epithelial cell migration by receptor-dependent mechanisms." Am J Physiol Cell Physiol **284**(4): C953-961.
- Croft, M. (2003). "Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27." Cytokine Growth Factor Rev **14**(3-4): 265-273.
- Croft, M. (2009). "The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases." Nat Rev Immunol **9**(4): 271-285.
- Dasgupta, A. and R. Saxena (2012). "Regulatory T cells: A review." National Medical Journal of India **25**(6): 341-351.
- Dejardin, E. (2006). "The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development." Biochem Pharmacol **72**(9): 1161-1179.
- Dejardin, E., N. M. Droin, M. Delhase, E. Haas, Y. Cao, C. Makris, Z. W. Li, M. Karin, C. F. Ware and D. R. Green (2002). "The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways." Immunity **17**(4): 525-535.
- Demchenko, Y. N. and W. M. Kuehl (2010). "A critical role for the NFkB pathway in multiple myeloma." Oncotarget **1**(1): 59-68.
- Dutta, J., Y. Fan, N. Gupta, G. Fan and C. Gelinas (2006). "Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB." Oncogene **25**(51): 6800-6816.
- E. Huland, H. H., H. Huland (1993). Lokale Anwendung des Interleukin 2 bei Patienten mit fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom und metastasierendem Nierenzellkarzinom.
- El-Mesery, M., J. Trebing, V. Schafer, D. Weisenberger, D. Siegmund and H. Wajant (2013). "CD40-directed scFv-TRAIL fusion proteins induce CD40-restricted tumor cell death and activate dendritic cells." Cell Death Dis **4**: e916.

- Faria, A. M. and H. L. Weiner (2006). "Oral tolerance and TGF-beta-producing cells." Inflamm Allergy Drug Targets **5**(3): 179-190.
- Fesik, S. W. (2000). "Insights into programmed cell death through structural biology." Cell **103**(2): 273-282.
- Fusco, A. J., O. V. Savinova, R. Talwar, J. D. Kearns, A. Hoffmann and G. Ghosh (2008). "Stabilization of RelB requires multidomain interactions with p100/p52." Journal of Biological Chemistry **283**(18): 12324-12332.
- Gaur, U. and B. B. Aggarwal (2003). "Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily." Biochem Pharmacol **66**(8): 1403-1408.
- Ghosh, S., M. J. May and E. B. Kopp (1998). "NF-kappa B and rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses." Annual Review of Immunology **16**: 225-260.
- Grell, M. (1995). "Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF." J Inflamm **47**(1-2): 8-17.
- Grell, M., E. Douni, H. Wajant, M. Lohden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, W. Lesslauer, G. Kollias, K. Pfizenmaier and P. Scheurich (1995). "The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor." Cell **83**(5): 793-802.
- Grell, M., H. Wajant, G. Zimmermann and P. Scheurich (1998). "The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 570-575.
- Ha, H., D. Han and Y. Choi (2009). "TRAF-mediated TNFR-family signaling." Curr Protoc Immunol **Chapter 11**: Unit11 19D.
- Hacker, H. and M. Karin (2006). "Regulation and function of IKK and IKK-related kinases." Sci STKE **2006**(357): re13.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." Cell **132**(3): 344-362.
- Heller, R. A. and M. Kronke (1994). "Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways." J Cell Biol **126**(1): 5-9.
- Karin, M. and Y. Ben-Neriah (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity." Annu Rev Immunol **18**: 621-663.
- Kolitz, J. E. and R. Mertelsmann (1991). "The immunotherapy of human cancer with interleukin 2: present status and future directions." Cancer Invest **9**(5): 529-542.
- Krippner-Heidenreich, A., I. Grunwald, G. Zimmermann, M. Kuhnle, J. Gerspach, T. Sterns, S. D. Shnyder, J. H. Gill, D. N. Mannel, K. Pfizenmaier and P. Scheurich (2008). "Single-chain TNF, a TNF derivative with enhanced stability and antitumoral activity." J Immunol **180**(12): 8176-8183.
- Kumar, R., P. E. Herbert and A. N. Warrens (2005). "An introduction to death receptors in apoptosis." Int J Surg **3**(4): 268-277.

- Land, W. G. (2006). Immunsuppressive Therapie, Georg Thieme Verlag.
- Li, H. and X. Lin (2008). "Positive and negative signaling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation." Cytokine **41**(1): 1-8.
- Li, Q. and I. M. Verma (2002). "NF-kappaB regulation in the immune system." Nat Rev Immunol **2**(10): 725-734.
- Li, Q. T. and I. M. Verma (2002). "NF-kappa B regulation in the immune system (vol 2, pg 725, 2002)." Nature Reviews Immunology **2**(12): 975-975.
- Lillehei, K. O., Y. Liu and Q. Kong (1999). "Current perspectives in immunotherapy." Ann Thorac Surg **68**(3 Suppl): S28-33.
- Locksley, R. M., N. Killeen and M. J. Lenardo (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell **104**(4): 487-501.
- Loetscher, H., D. Stueber, D. Banner, F. Mackay and W. Lesslauer (1993). "Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors." J Biol Chem **268**(35): 26350-26357.
- Moynagh, P. N. (2005). "The NF-kappaB pathway." J Cell Sci **118**(Pt 20): 4589-4592.
- Muller, N., A. Wyzgol, S. Munkel, K. Pfizenmaier and H. Wajant (2008). "Activity of soluble OX40 ligand is enhanced by oligomerization and cell surface immobilization." Febs Journal **275**(9): 2296-2304.
- Naismith, J. H. and S. R. Sprang (1998). "Modularity in the TNF-receptor family." Trends Biochem Sci **23**(2): 74-79.
- Ramakrishnan, P., W. Wang and D. Wallach (2004). "Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF-kappaB activation pathways by NF-kappaB-inducing kinase." Immunity **21**(4): 477-489.
- Rauert, H., A. Wicovsky, N. Muller, D. Siegmund, V. Spindler, J. Waschke, C. Kneitz and H. Wajant (2010). "Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2)." J Biol Chem **285**(10): 7394-7404.
- Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula and M. K. Levings (2001). "Type 1 T regulatory cells." Immunological Reviews **182**: 68-79.
- Roncarolo, M. G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer and M. K. Levings (2006). "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans (vol 212, pg 28, 2006)." Immunological Reviews **213**: 257-257.
- S.T.Eichhorst, P. H. K. (2013). Grundlagen der molekularen Medizin Springer Verlag.
- Scheidereit, C. (2006). "IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription." Oncogene **25**(51): 6685-6705.
- Schneider, P., N. Holler, J. L. Bodmer, M. Hahne, K. Frei, A. Fontana and J. Tschopp (1998). "Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity." J Exp Med **187**(8): 1205-1213.

- Siegel, J. P., M. Sharon, P. L. Smith and W. J. Leonard (1987). "The IL-2 receptor beta chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities." Science **238**(4823): 75-78.
- Smith, C. A., T. Farrah and R. G. Goodwin (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." Cell **76**(6): 959-962.
- Sun, S. C. (2011). "Non-canonical NF-kappaB signaling pathway." Cell Res **21**(1): 71-85.
- Sun Shao-Cong, L. S. C. (2008). "New insights into NF-kappaB regulation and function." Trends Immunol. **Volume 29**(Issue 10): p455-502.
- Takayama, K., H. Yokozeki, M. Ghoreishi, T. Satoh, I. Katayama, T. Umeda and K. Nishioka (1999). "IL-4 inhibits the migration of human Langerhans cells through the downregulation of TNF receptor II expression." J Invest Dermatol **113**(4): 541-546.
- Theiss, A. L., J. G. Simmons, C. Jobin and P. K. Lund (2005). "Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2." J Biol Chem **280**(43): 36099-36109.
- Vignali, D. A. A., L. W. Collison and C. J. Workman (2008). "How regulatory T cells work." Nature Reviews Immunology **8**(7): 523-532.
- Vonderheide, R. H. (2007). "Prospect of targeting the CD40 pathway for cancer therapy." Clinical Cancer Research **13**(4): 1083-1088.
- W.N.Khan, C. (2009). BLyS Ligands and Receptors, Springer Verlag.
- Wajant, H. (2003). "Death receptors." Essays Biochem **39**: 53-71.
- Wajant, H. (2009). "The role of TNF in cancer." Results Probl Cell Differ **49**: 1-15.
- Wajant, H., M. Grell and P. Scheurich (1999). "TNF receptor associated factors in cytokine signaling." Cytokine Growth Factor Rev **10**(1): 15-26.
- Wajant, H., D. Moosmayer, T. Wuest, T. Bartke, E. Gerlach, U. Schonherr, N. Peters, P. Scheurich and K. Pfizenmaier (2001). "Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative." Oncogene **20**(30): 4101-4106.
- Wajant, H. and P. Scheurich (2011). "TNFR1-induced activation of the classical NF-kappa B pathway." Febs Journal **278**(6): 862-876.
- Weiner, H. L. (2001). "Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells." Microbes and Infection **3**(11): 947-954.
- Weiner, H. L., A. Friedman, A. Miller, S. J. Khoury, A. al-Sabbagh, L. Santos, M. Sayegh, R. B. Nussenblatt, D. E. Trentham and D. A. Hafler (1994). "Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens." Annu Rev Immunol **12**: 809-837.



Winkles, J. A. (2008). "The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting." Nat Rev Drug Discov **7**(5): 411-425.

Wyzgol, A., N. Muller, A. Fick, S. Munkel, G. U. Grigoleit, K. Pfizenmaier and H. Wajant (2009). "Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand." J Immunol **183**(3): 1851-1861.

Yang, J., Y. Lin, Z. Guo, J. Cheng, J. Huang, L. Deng, W. Liao, Z. Chen, Z. Liu and B. Su (2001). "The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation." Nat Immunol **2**(7): 620-624.

Zwirner, N. W. and C. I. Domaica (2010). "Cytokine regulation of natural killer cell effector functions." Biofactors **36**(4): 274-288.

## 8 Anhang

### 8.1 DNA- und Aminosäuresequenzen der Fusionsproteine

Für die in dieser Arbeit klonierten TNF-Ligandvarianten sind die kodierenden Nukleotidsequenzen und die translatierte Aminosäuresequenz angegeben.

#### 8.1.1 scTNF80(mu)-Flag-IL2(mu)

```

1 AAGCTTGCCACCATG AACTTCGGGTTTCAGC TTGATTTTCCTGGTC CTGGTGTCTGAAGGGC GTGCAGTGCGAGGTC
1 K L A T M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E V
76 AAGCTGTGCCACGC GGATCCGATTACAAA GACGATGACGATAAAA GAATTCGAGTTCACA CGGGACAAAACCTGTG
26 K L V P R G S D Y K D D D D K E F E F T R D K P V
151 GCTCATGTGGTGGCC AATCATCAGGTGGAG GAACAGCTGGAATGG CTGAGTCAGAGAGCA AACGCCCTGTGGCA
51 A H V V A N H Q V E E Q L E W L S Q R A N A L L A
226 AATGGGATGGACCTC AAAGACAATCAGCTC GTGGTGCTTGGCGAT GGACTGTACCTGGTG TACTCTCAGGTCCTG
76 N G M D L K D N Q L V V P A D G L Y L V Y S Q V L
301 TTTAAGGGACAGGGA TGCCCCGATTACGTG CTGCTCACCCACACT GTGTACGCTTCGCC ATCTCATACCAGGAG
101 F K G Q G C P D Y V L L T H T V S R F A I S Y Q E
376 AAAGTCAATCTCCTC TCCGCCGTGAAATCA CCATGTCCTAAGGAT ACTCCCAGGGAGGCC GAACGAAAACCTTGG
126 K V N L L S A V K S P C P K D T P E G A E L K P W
451 TACGAAGCCATCTAC CTGGGGCGCGTGTTC CAGCTGGAGAAAGGC GATCAGCTCTCCGCC GAAGTGAATCTGCC
151 Y E P I Y L G G V F Q L E K G D Q L S A E V N L P
526 AAATACCTCAACTTT AGGGAATCCGGACAG GTCTACTTTGGCGTG ATTGCCCTGGGAGGC GGATCTGGAGGAGGC
176 K Y L N F R E S G Q V Y F G V I A L G G G S G G G
601 TCTGGCGGGGGATCT GGGGGCGGATCCGAC AAACCTGTGGCACAC GTCGTGGCAAACCAT CAGGTCGAGGAACAG
201 S G G G S G G G S D K P V A H V V A N H Q V E E Q
676 CTCGAGTGGCTGCA CAGAGGGCCAATGCC CTGCTGGCAAAATGGA ATGGATCTGAAGGAT AATCAGCTCGTCGTG
226 L E W L S Q R A N A L L A N G M D L K D N Q L V V
751 CTGCCCACGGCCTC TACCTCGTCTACTCT CAGGTCTCTTTAAG GGACAGGGCTGCCCC GACTACGTCCTGCTC
251 P A D G L Y L V Y S Q V L F K G Q G C P D Y V L L
826 ACTCATCTCACTGTC CGCTTCGCTATTTC TACCAGAAAAAGTC AACCTGTGAGTGTG GTGAAAATCTCTTGC
276 T H T V S R F A I S Y Q E K V N L L S A V K S P C
901 CCTAAGGATACCCCT GAGGGAGCCGAAGTC AAACCTGTTGACGAG CCAATCTACCTCGGA GGAGTGTTCAGCTG
301 P K D T P E G A E L K P W Y E P I Y L G G V F Q L
976 GAAAAAGGGGATCAG CTCTCCGCCGAATGAC AACCTCCCAATATC CTCAATTTCCGGGAA TCCGGACAGGTGTAC
326 E K G D Q L S A E V N L P K Y L N F R E S G Q V Y
1051 TTTGAGTCAATGCCC CTGGGAGGCGGCTCT GGCGGGGGATCTGGA GGAGGTCGCGAGGA GGCAGTGACAAACCC
351 F G V I A L G G G S G G G S G G G S D K P
1126 GTCGCTCAGGTGGTG GCAAAATCATCAGGTC GAGGAACAGCTGGAA TGGCTGTCTCAGAGA GCAAACGCTCTCCTC
376 V A H V V A N H Q V E E Q L E W L S Q R A N A L L
1201 GCCAATGGAATGGAT CTCAAGGACAACAGC CTCGTCGTCCCTGCC GATGGACTCTACCTG GTCTACTCTCAGGTG
401 A N G M D L K D N Q L V V P A D G L Y L V Y S Q V
1276 CTCTTTAAGGGACAG GGATGCCCCGATTAC GTCCTGCTCACACAC ACCGTGTCTCGCTTT GCTATTTTCATACCAG
426 L F K G Q G C P D Y V L L T H T V S R F A I S Y Q
1351 GAGAAAGTCAATCTG CTGTCTGCCGTCAAAA TCTCCTGTGCCAAAA GACACACCCGAGGGA GCCGAACTCAACCT
451 E K V N L L S A V K S P C P K D T P E G A E L K P
1426 TGGTACGAGCCAATC TACCTGGGGGGAGTG TTTCACTGAGGAGAAG GGGGATCAGCTCTCC GCCGAAGTGAATCTC
476 W Y E P I Y L G G V F Q L E K G D Q L S A E V N L
1501 CCAAAATACCTCAAT TTTCCGGGAATCCGGA CAGGTCTACTTTGGA GTGATGCCCTGGGT ACCGCCCTACCAGC
501 P K Y L N F R E S G Q V Y F G V I A L G T A P T S
1576 AGCAGCACCTTAGC TCTACAGCCGAGGCT CAACAACAACAACA CAGCAACAGCAGCAG CAGCAGCACCTGGAA
526 S S T S S S T A E A Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q H L E
1651 CAGCTGTGATGGAC CTGCAGGAAGTCTG AGCCGGATGGAAAAC TACCGGAACCTGAAG CTGCCCGGATGCTG
551 Q L L M D L Q E L L S R M E N Y R N L K L P R M L
1726 ACCTTCAAGTTCTAC CTGCCCAAGCGGCC ACCGAGTGAAGGAT CTGCAGTGCCTGGAA GATGAGCTGGCCCC
576 T F K F Y L P K Q A T E L K D L Q C L E D E L G P
1801 CTGAGACACGTGCTG GATCTGACCCAGAGC AAGAGCTTTCAGCTG GAAGATGCCGAGAAC TTCATCAGCAACATC
601 L R H V L D L T Q S K S F Q L E D A E N F I S N I
1876 AGAGTGACCTCGTG AAGCTGAAGGGCAGC GACAACACTTCGAG TGCCAGTTCGACGAC TGCCAGTTCGACGAC
626 R V T V V K L K G S D N T F E C Q F D D E S A T V
1951 GTGACTTCTCTCGG AGATGGATCGCCTTC TGCCAGAGCATCATC AGCACCAGCCCCAG TAATCTAGA
651 V D F L R R W I A F C Q S I I S T S P Q * S R

```

### 8.1.2 TNF80(mu)-Flag-IL2(mu)

```

1 AAGCTTGCCACCATG AACTTCGGGTTTCAGC TTGATTTTCCTGGTC CTGGTGCTGAAGGGC GTGCAGTGCGAGGTC
1 K L A T M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E V
76 AAGCTGGTGCCACGC GGATCCGATTACAAA GACGATGACGATAAA GAATTCCTCAGATCA TCTTCTCAAAATTCG
26 K L V P R G S D Y K D D D D K E F L R S S S Q N S
151 AGTGACAAGCCTGTA GCCCACGTCGTAGCA AACCACCAAGTGGAG GAGCAGCTGGAGTGG CTGAGCCAGCGCGCC
51 S D K P V A H V V A N H Q V E E Q L E W L S Q R A
226 AACGCCCTCCTGGCC AACGGCATGGATCTC AAAGACAACCAACTA GTGGTGCCAGCCGAT GGGTGTACCTTGTC
76 N A L L A N G M D L K D N Q L V V P A D G L Y L V
301 TACTCCAGGTTCTC TTCAAGGGACAAGGC TGCCCCGACTACGTG CTCCTCACCCACACC GTCAGCCGATTTGCT
101 Y S Q V L F K G Q G C P D Y V L L T H T V S R F A
376 ATCTCATACGAGGAG AAAGTCAACCTCCTC TCTGCCCTCAAGAGC CCCTGCCCCAAGGAC ACCCTGAGGGGGCT
126 I S Y Q E K V N L L S A V K S P C P K D T P E G A
451 GAGCTCAAACCTGCG TATGAGCCATATAC CTGGGAGGAGTCTTC CAGCTGGAGAAGGGG GACCAACTCAGCGCT
151 E L K P W Y E P I Y L G G V F Q L E K G D Q L S A
526 GAGGTCAATCTGCC CAGTACTTAACTTTT AGGGAGTCCGGGCGAG GTCTACTTTGGAGTC ATTGCTCTGGGTACC
176 E V N L P K Y L N F R E S G Q V Y F G V I A L G T
601 GCCCCTACCAGCAGC AGCACCTCTAGCTCT ACAGCCGAGGCTCAA CAACAACAACAACAG CAACAGCAGCAGCAG
201 A P T S S S T S S S T A E A Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q
676 CAGCACTGGAACAG CTGCTGATGGACCTG CAGGAACCTGCTGAGC CGGATGGAAAAGTAC CGGAACCTGGAAGCT
226 Q H L E Q L L M D L Q E L L S R M E N Y R N L K L
751 CCCC GGATGCTGACC TTCAAGTTCTACTCTG CCAAGCAGGCCACC GAGCTGAAGGATCTG CAGTGCCTGGAAGAT
251 P R M L T F K F Y L P K Q A T E L K D L Q C L E D
826 GAGCTGGGCCCCCTG AGACACGTGCTGGAT CAGCCAGAGCAAG AGCTTTCAGCTGGAA GATCCCGAGAATTC
276 E L G P L R H V L D L T Q S K S F Q L E D A E N F
901 ATCAGCAACATCAGA GTGACCGTCGTGAAG CTGAAGGGCAGCGAC AACACCTTCGAGTGC CAGTTCGACGACGAG
301 I S N I R V T V V K L K G S D N T F E C Q F D D E
976 AGCGCTACCGTGGTG GACTTCTGCGGAGA TGGATCGCCTTCTGC CAGAGCATCATCAGC ACCGCCCCAGTAA
326 S A T V V D F L R R W I A F C Q S I I S T S P Q *
1051 TCTAGA
351 S R

```

### 8.1.3 TNF80(h)-Flag-IL2(h)

```

1 AAGCTTGCCACCATG AACTTCGGGTTTCAGC TTGATTTTCCTGGTC CTGGTGCTGAAGGGC GTGCAGTGCGAGGTC
1 K L A T M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E V
76 AAGCTGGTGCCACGC GGATCCGATTACAAA GACGATGACGATAAA GAATTCAGTGACAAG CCTGTAGCCCATGTT
26 K L V P R G S D Y K D D D D K E F S D K P V A H V
151 GTAGCAAACCTCAA GCTGAGGGGCGAGCTC CAGTGGCTGAACCGC CGGGCCAATGCCCTC CTGGCCAATGGCGTG
51 V A N P Q A E G Q L Q W L N R R A N A L L A N G V
226 GAGCTGAGAGATAAC CAGCTGGTGGTGCCA TCAGAGGGCCTGTAC CTCATCTACTCCCAG GTCCTTTCAAGGGC
76 E L R D N Q L V V P S E G L Y L I Y S Q V L F K G
301 CAAGGCTGCCCTCC ACCCATGTGCTCCTC ACCCACACCATCAGC CGCATCGCGTCTCC TACCAGACCAAGGTC
101 Q G C P S T H V L L T H T I S R I A V S Y Q T K V
376 AACCTCCTCTCTG C ATCAAGAGCCCCTGC CAGAGGGAGACCCCA GAGGGGGCTGAGGCC AAGCCCTGGTATGAG
126 N L L S A I K S P C Q R E T P E G A E A K P W Y E
451 CCCATCTATCTGGGA GGGGTCTTCCAGCTG GAGAAGGGTGACCGA CTCAGCGCTGAGATC AATCGGCCGACTAT
151 P I Y L G G V F Q L E K G D R L S A E I N R P D Y
526 CTCAACTTTCGCG TCTGGGCAGGTCTAC TTTGGGATCATTGCC CTGGGTACCGCCCCT ACCCAGCAGCAGCACC
176 L N F R E S G Q V Y F G I I A L G T A P T S S S T
601 AAGAAAACCCAGCTG CAGCTGGAACATCTG CTGCTGGACCTGCAG ATGATCCTGAACGGC ATCAACAAC TACAAG
201 K K T Q L Q L E H L L L D L Q M I L N G I N N Y K
676 AACCCCAAGCTGACC CGGATGCTGACCTTC AAGTTCTACATGCC AAGAAGGCCACCGAA CTGAAACATCTGCAG
226 N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q
751 TGCCTGGAAGAGGAA CTGAAGCCCCCTGGAA GAAGTGCTGAACCTG GCCCAGAGCAAGAAC TTCCACCTGAGGCC
251 C L E E E L K P L E E V L N L A Q S K N F H L R P
826 AGGGACCTGATCAGC AACATCAACGTGATC GTGCTGGAAC TGAAG GGCAGCGAGACAACC TTCAATGTGCGAGTAC
276 R D L I S N I N V I V L E L K G S E T T F M C E Y
901 GCCGACGAGACAGCT ACCATCGTGGAAATTT CTGAACCGGTGGATC ACCTTCTGCCAGAGC ATCATCAGCACCCTG
301 A D E T A T I V E F L N R W I T F C Q S I I S T L
976 ACCTAATCTAGA
326 T * S R

```

## 8.1.4 Gaussia-Flag-IL2(mu)

```

1 AAGCTTGCCACCATG AATTTTCGGCTTCTCC CTCATCTTTCTGGTC CTCGTGCTCAAAGGC GTGCAGTGTGAGGTG
1 K L A T M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E V
76 AAACCTCGTCCCTAGG GGCTCTATGGGCGTC AAAGTCTGTTTGCC CTCATCTGTATTGCT GTCGCTGAGGCTAAA
26 K L V P R G S M G V K V L F A L I C I A V A E A K
151 CCAACCGAGAATAAT GAGGATTTCAACATC GTGGTGTGGCATCC AATTTTGTACCACC GACCTCGATGCCGAT
51 P T E N N E D F N I V A V A S N F A T T D L D A D
226 CGGGGAAAACCTGCCT GGCAAAAAACCTGCCC CTGGAAGTGTGAAA GAGATGGAGGCCAAC GCTAGAAAAGCTGGC
76 R G K L P G K K L P L E V L K E M E A N A R K A G
301 TGACTAGAGGATGT CTCATCTGCCTGTCC CACATCAAGTGTACC CCAAAAATGAAAAA TTCATCCCTGGCCGG
101 C T R G C L I C L S H I K C T P K M K K F I P G R
376 TGTCACACATACGAG GGCGACAAGGAATCT GCTCAGGCGGAATC GGAGAGGCTATTGTG GATATTCCTGAAATT
126 C H T Y E G D K E S A Q G G I G E A I V D I P E I
451 CCTGGATTCAAGGAC CTGGAGCCTATGGAA CAGTTTATCGCCAG GTGGACCTCTGTGTC GATTGTACAACCTGGC
151 P G F K D L E P M E Q F I A Q V D L C V D C T T G
526 GCCTTGAAGGCTG GCGAATGTCCAGTGT AGTGACCTGTGAAA AAATGGCTGCCCCAG AGATGTGCCACTTTC
176 C L K G L A N V Q C S D L L K K W L P Q R C A T F
601 GCCTCTAAAATTCAG GGCCAGGTCGACAAA ATCAAAGGCGCTGGA GGAGACTCTGGAGCT GGATCCGATTACAAA
201 A S K I Q G Q V D K I K G A G G D S G A G S D Y K
676 GACGATGACGATAAA GAATTGCCCGTACC GCCCTACCAGCAGC AGCACCTCTAGCTCT ACAGCCGAGGCTCAA
226 D D D D K E L P G T A P T S S S T S S S T A E A Q
751 CAACAACAACAACAG CAACAGCAGCAGCAG CAGCACCTGGAACAG CTGTGATGGACCTG CAGGAACCTGTGAGC
251 Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q H L E Q L L M D L Q E L L S
826 CGGATGAAAACCTAC CGGAACCTGAAGCTG CCCCAGTGTGAGC TTCAAGTTCTACCTG CCCAAGCAGGCCACC
276 R M E N Y R N L K L P R M L T F K F Y L P K Q A T
901 GAGCTGAAGGATCTG CAGTGCCTGGAAGAT GAGCTGGGCCCTG AGACACGTGTGGAT CTGACCCAGAGCAAG
301 E L K D L Q C L E D E L G P L R H V L D L T Q S K
976 AGCTTTTCAAGGAAA GATGCCGAGAATCTC ATCAGCAACATCAGA GTGACCGCTGTGAA GGTGAAGGCGAGCAGC
326 S F Q L E D A E N F I S N I R V T V V K L K G S D
1051 AACACCTTCGAGTGC CAGTTCGACGACGAG AGCGCTACCGTGGT GACTTCTGCGGAGA TGGATCGCCTTCTGC
351 N T F E C Q F D D E S A T V V D F L R R W I A F C
1126 CAGAGCATCATCAGC ACCAGCCCCAGTAA TCTAGA
376 Q S I I S T S P Q * S R

```

## 8.1.5 Gaussia-Flag-IL2(h)

```

1 AAGCTTGCCACCATG AATTTTCGGCTTCTCC CTCATCTTTCTGGTC CTCGTGCTCAAAGGC GTGCAGTGTGAGGTG
1 K L A T M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E V
76 AAACCTCGTCCCTAGG GGCTCTATGGGCGTC AAAGTCTGTTTGCC CTCATCTGTATTGCT GTCGCTGAGGCTAAA
26 K L V P R G S M G V K V L F A L I C I A V A E A K
151 CCAACCGAGAATAAT GAGGATTTCAACATC GTGGTGTGGCATCC AATTTTGTACCACC GACCTCGATGCCGAT
51 P T E N N E D F N I V A V A S N F A T T D L D A D
226 CGGGGAAAACCTGCCT GGCAAAAAACCTGCCC CTGGAAGTGTGAAA GAGATGGAGGCCAAC GCTAGAAAAGCTGGC
76 R G K L P G K K L P L E V L K E M E A N A R K A G
301 TGACTAGAGGATGT CTCATCTGCCTGTCC CACATCAAGTGTACC CCAAAAATGAAAAA TTCATCCCTGGCCGG
101 C T R G C L I C L S H I K C T P K M K K F I P G R
376 TGTCACACATACGAG GGCGACAAGGAATCT GCTCAGGCGGAATC GGAGAGGCTATTGTG GATATTCCTGAAATT
126 C H T Y E G D K E S A Q G G I G E A I V D I P E I
451 CCTGGATTCAAGGAC CTGGAGCCTATGGAA CAGTTTATCGCCAG GTGGACCTCTGTGTC GATTGTACAACCTGGC
151 P G F K D L E P M E Q F I A Q V D L C V D C T T G
526 GCCTTGAAGGCTG GCGAATGTCCAGTGT AGTGACCTGTGAAA AAATGGCTGCCCCAG AGATGTGCCACTTTC
176 C L K G L A N V Q C S D L L K K W L P Q R C A T F
601 GCCTCTAAAATTCAG GGCCAGGTCGACAAA ATCAAAGGCGCTGGA GGAGACTCTGGAGCT GGATCCGATTACAAA
201 A S K I Q G Q V D K I K G A G G D S G A G S D Y K
676 GACGATGACGATAAA GAATTGCCCGTACC GCCCTACCAGCAGC AGCACCAAGAAAACC CAGTGCAGCTGGAA
226 D D D D K E L P G T A P T S S S T K K T Q L Q L E
751 CATCTGTGCTGGAC CTGCAGATGATCCTG AACGGATCAACAAC TACAAGAACCCTAAG CTGACCCGGATGCTG
251 H L L L L D L Q M I L N G I N N Y K N P K L T R M L
826 ACCTTCAAGTTTCTAC ATGCCCAAGAAGGCC ACCGAATGAAACAT CTGCAGTGCCTGGAA GAGGAACCTGAAGCCC
276 T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P
901 CTGGAAGAAGTGTG AACCTGGCCCAGAGC AAGAACTTCCACCTG AGGCCAGGGACCTG ATCAGCAACATCAAC
301 L E E V L N L A Q S K N F H L R P R D L I S N I N
976 GTGATCTGTGGAAA CTGAAAGGCGAGCAG ACAACNTTATGTGC GAGTACGCCGACGAG ACAGTACCCTCGTG
326 V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V
1051 GAATTTTCTGAACCGG TGGATCACCTTCTGC CAGAGCATCATCAGC ACCCTGACCTAATCT AGA
351 E F L N R W I T F C Q S I I S T L T * S R

```

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich primär bei Herrn Prof. Dr. Harald Wajant bedanken, der mir die Möglichkeit bot in der Abteilung der Inneren Molekularen Medizin unter seiner Betreuung meine Dissertation zu verfassen. Stets stand er mir mit nützlichen Ratschlägen zur Seite und unterstützte meine Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christoph Otto, der sich als Zweitgutachter meiner Promotion zur Verfügung stellte und seine Zeit hierfür investierte.

Des Weiteren bedanke ich mich für die tolle Zusammenarbeit bei allen Mitarbeitern der Molekularen Inneren Medizin, die mir stets mit Rat und Tat, Hilfestellungen und Problemlösungen rund um die Uhr zur Seite standen. Sie machten die Arbeitszeit im Labor durch eine freundliche Atmosphäre untereinander, klingelnden Weckern mitten in der Nacht, durch Verteilung von Fröschen und Sternen unvergesslich.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinen Großeltern und Daniel, für die unermüdliche Unterstützung, den Rückhalt und die Motivation während der Promotionszeit.

## Lebenslauf