

Anwendung in der Zellbiologie/ Biochemie:

Isolierung von Rezeptosomen und Organellen aus Zellen

Die Analyse der Struktur und Funktion von intrazellulären **Organellen, Rezeptosomen, Membrankomplexen und löslichen Proteinkomplexen** aus Zellen erfordert die Isolierung dieser Kompartimente aus den ganzen Zellen. Das HOKImag Magnetkammer-System stellt eine ideale Technologie zur selektiven immunomagnetischen Isolierung dar.

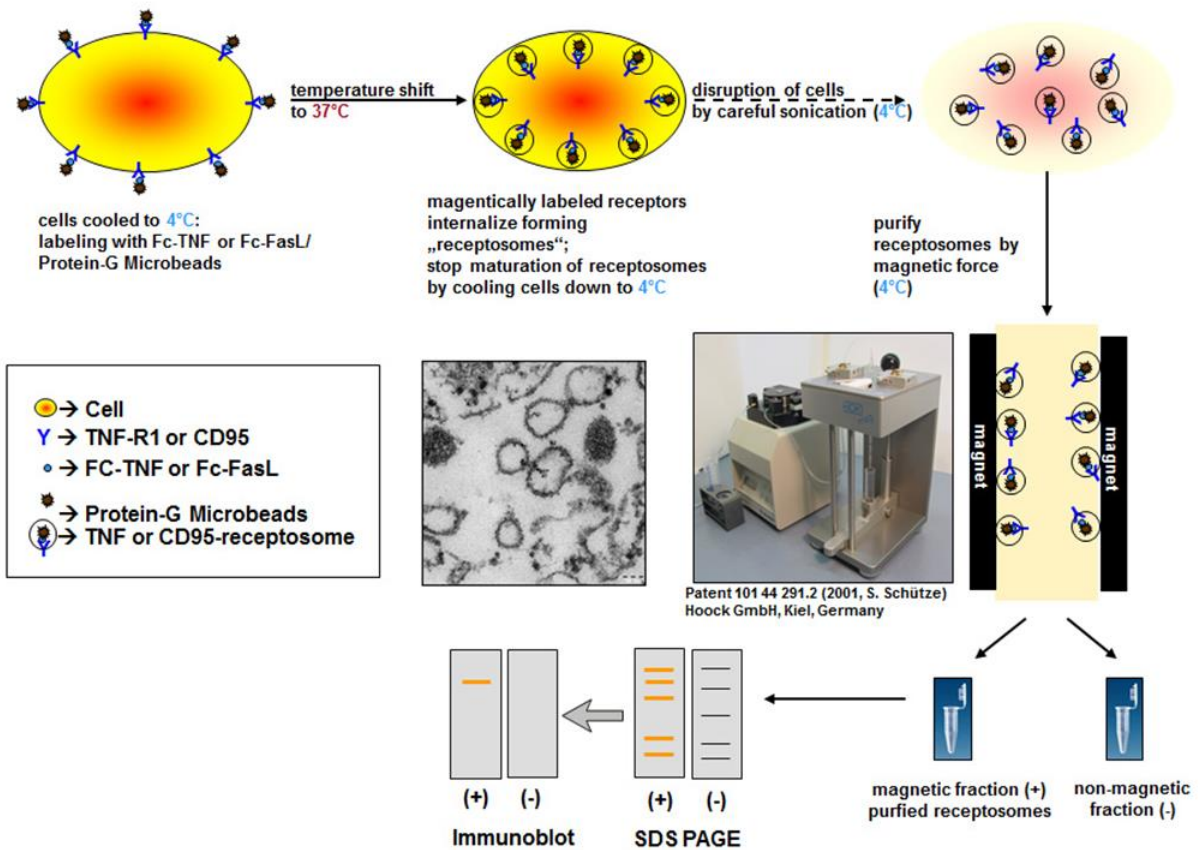
Vorteile der „Free-Flow“-Methode mit HOKImag:

Das bis zu 3 Tesla starke inhomogene Magnetfeld erlaubt die Verwendung kleinster superparamagnetischer magnetischer beads (50nm) zur Markierung von Membranrezeptoren, Organell-spezifischer Oberflächenproteine sowie löslicher Proteine. Die geringe Größe der Magnetpartikel ist Voraussetzung für die ungestörte Aufnahme von internalisierten Rezeptorkomplexen (Rezeptosomen) und erlaubt so ein physiologisches Verhalten der Kompartimente im Rahmen des vesikulären Transports und der Reifungs- und Fusionsprozesse mit anderen intrazellulären Membrankomplexen. Die isolierten Strukturen sind morphologisch und funktional intakt

Beispiele der Anwendung des HOKImag Magnetkammersystems:

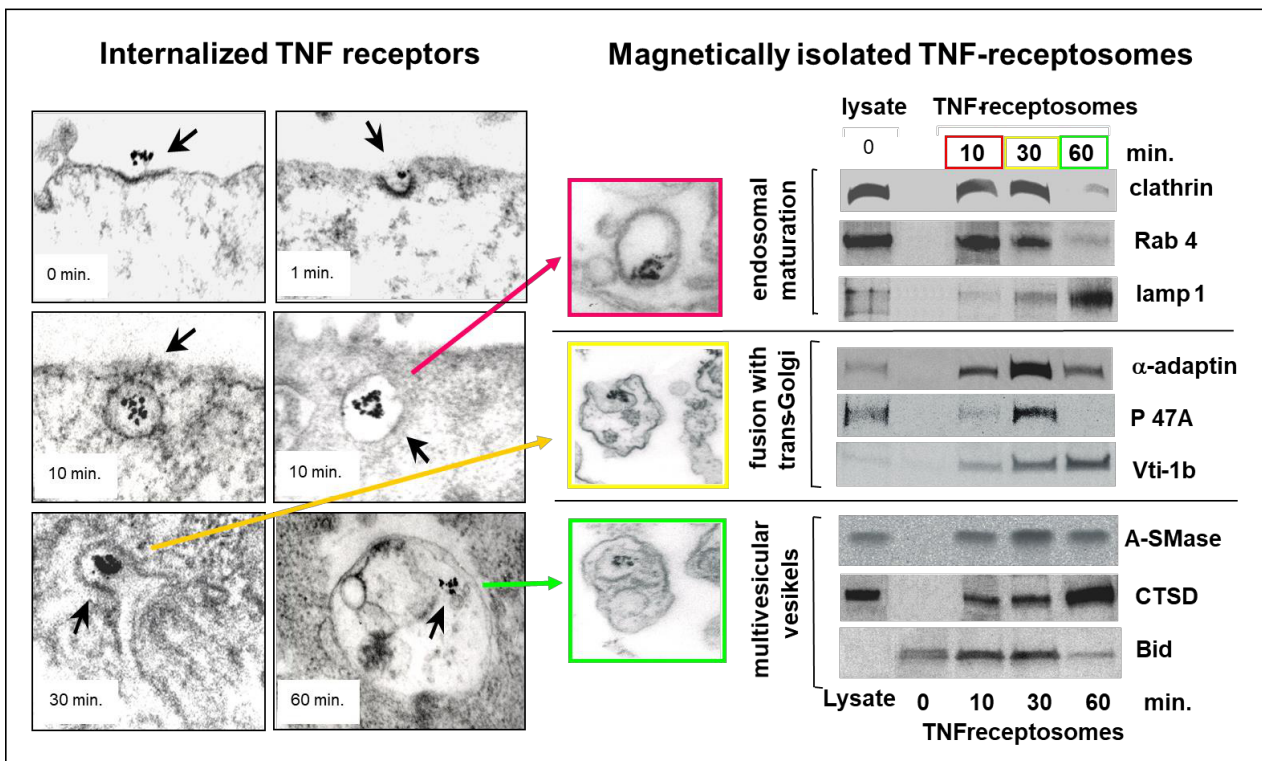
Markierung der TNF Rezeptoren mit Fc-TNF und Protein-G magnetischen Microbeads (alternativ bio-TNF und Streptavidin-magnetischen Microbeads), anschließende Internalisierung des Rezeptorkomplexes, Homogenisation der Zellen und Isolierung der magnetisierten TNF Rezeptosomen mittels HOKImag

Immunomagnetic Isolation of TNF and CD95 receptors



I. Isolierung und Charakterisierung von TNF Rezeptosomen

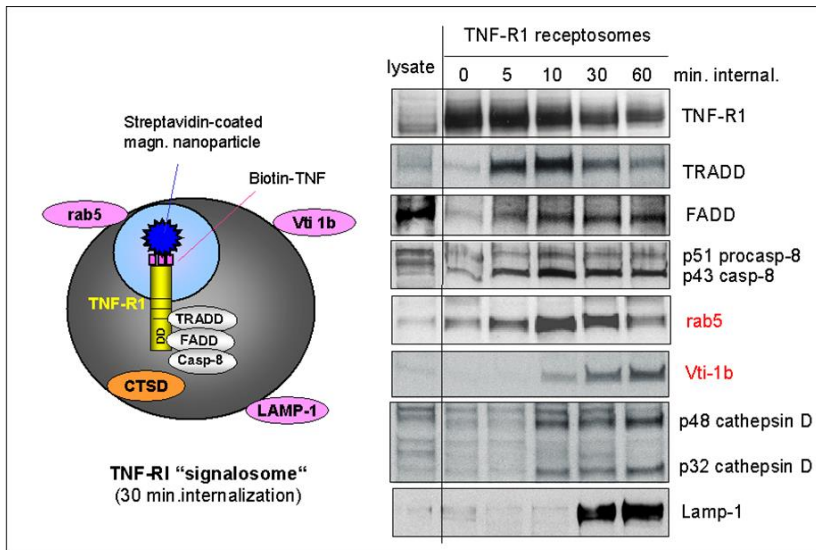
Elektronenmikroskopische Darstellung der Internalisierung von mit Streptavidin-Microbeads markierten TNF Rezeptoren und Isolierung der Reptosomen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des intrazellulären Transports mittels HOKImag, Charakterisierung der verschiedenen magnetischen Fraktionen anhand der Signatur-Proteine vesikulären Transports mittels Western-Blot



aus: Tchikov, V., Fritsch, J., Kabelitz, D., Schütze, S. (2010)

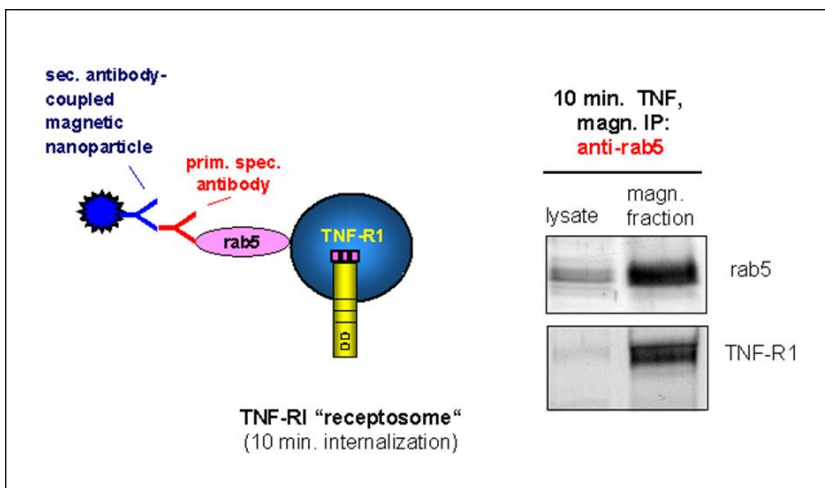
Immunomagnetic isolation of subcellular compartments. *Meth. Microbiol.* 37, 21-34

II. Isolierung von TNF-Rezeptosomen mit Streptavidin-Magnetpartikeln / biotin-TNF behandelten Zellen



Western-Blot Analyse mit HOKImag isolierter TNF-Rezeptosomen: Assoziation des TNF Rezeptors mit den rekrutierten Adaptor-Proteinen TRADD, FADD und Caspase-8 sowie des endosomalen Signatur-Proteins rab5, des MVB-Fusionsproteins Vti-1b und der lysosomalen Proteine Cathepsin D und Lamp-1

III. Isolierung von Endosomen mit anti-rab5 spezifischen Antikörperkomplexen aus mit TNF behandelten Zellen

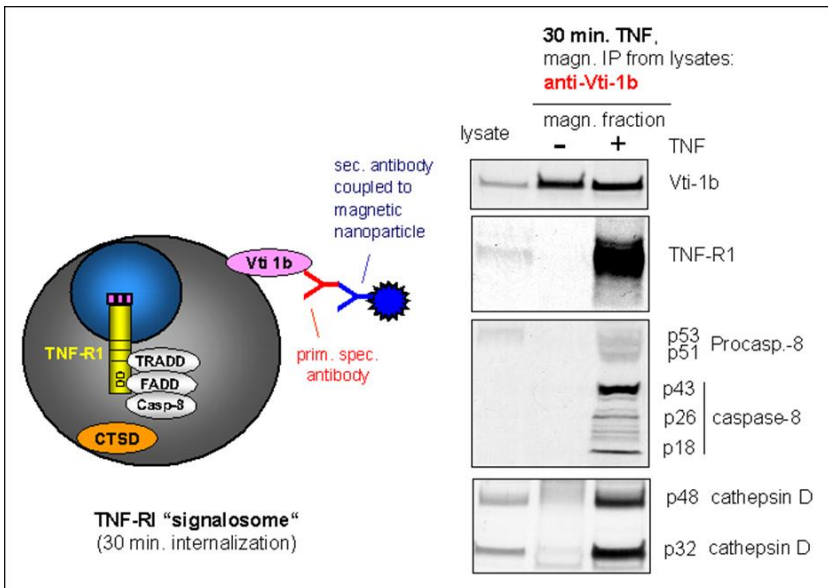


Aus Zell-Lysaten mittels magnetischer anti-Rab 5 Antikörper in der HOKImag Kammer isolierte frühe Endosomen welche den aktivierten TNF-Rezeptor enthalten

aus: Tchikov, V., Fritsch, J., Kabelitz, D., Schütze, S. (2010)

Immunomagnetic isolation of subcellular compartments. *Meth. Microbiol.* 37, 21-34

IV. Isolierung von multivesikulären Kompartimenten mit anti-Vti1b spezifischen Antikörperkomplexen aus mit TNF behandelten Zellen

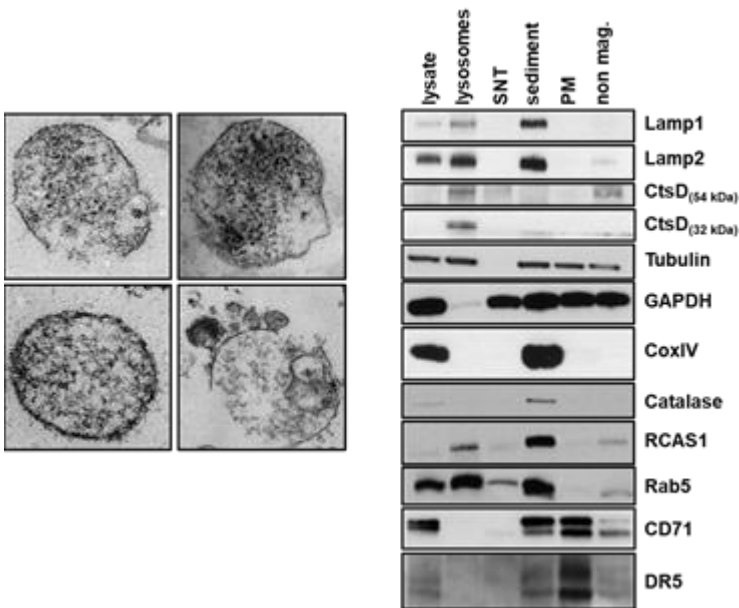


Aus Zell-Lysaten mittels magnetischer anti-Vti-1b Antikörper in der HOKImag Magnetkammer isolierte späte multivesikuläre Vesikel welche den aktivierten TNF-Rezeptor enthalten

aus: Tchikov, V., Fritsch, J., Kabelitz, D., Schütze, S. (2010)

Immunomagnetic isolation of subcellular compartments. *Meth. Microbiol.* 37, 21-34

V. Isolierung von Lysosomen mit Lamp1 spezifischen Antikörperkomplexen aus Zellhomogenaten



Aus Zell-Lysaten mittels magnetischer anti-Lamp1 spezifischer Antikörper in der HOKImag Kammer isolierte Lysosomen

aus: Fritsch, J., Tchikov, V., Hennig, L., Lucius, R., Schütze, S. (2019)

A toolbox for the immunomagnetic purification of signaling organelles. *Traffic.*

Mar;20(3):246-258.

Einige der Ergebnisse, bei denen das HOKImag-Magnet-Kammersystem eine wesentliche Verwendung gefunden hat:

Organellen-Isolierung (Rezeptosomen, Endosomen, Lysosomen), Methodik :

- Fritsch, J., Tchikov, V., Hennig, L., Lucius, R., Schütze, S. (2019) A toolbox for the immunomagnetic purification of signaling organelles. *Traffic*. Mar;20(3):246-258. doi: 10.1111/tra. 12631. Epub 2019 Jan 15.
- Schütze, S., Tchikov, V., Fritsch, J. (2014). Separation of magnetically isolated TNF-receptosomes from mitochondria. *Meth. Enzymol*. Vol. 535, Chapter 19, 327-349
- Schütze, S., Tchikov, V. (2008) Immunomagnetic isolation of TNF-receptosomes. *Meth. Enzymol*. 442, 101-123
- Tchikov, V., Fritsch, J., Kabelitz, D., Schütze, S. (2010) Immunomagnetic isolation of subcellular compartments. *Meth. Microbiol*. 37, 21-34
- Melum, E., Jiang, X., Baker, K.D., Macedo, M.F., Fritsch, J., Dowds, C.M., Wang, J., Pharo, A., Kaser, A., Tan, C., Pereira, C.S., Kelly, S.L., Duan, J., Karlsen, T.H., Exley, M.A., Schütze, S., Zajonc, D.M., Merrill, A.H., Schuchman, E.H., Zeissig, S., Blumberg, R.S. (2020) Control of CD1d-restricted antigen presentation and inflammation by sphingomyelin. *Nature Immunol*. 2019 Dec;20(12):1644-1655

Lösliche Protein-Komplexe:

- Marischen, L., Wesch, D., Oberg, H.H., Rosenstiel, P., Trad, A., Shomali, M., Grötzinger, J., Janssen, O., Tchikov, V., Schütze, S., Kabelitz, D. (2011) Functional expression of NOD2 in human peripheral blood $\gamma\delta$ T-cells. *Scand. J. Immunol*. 74, 126-134

TNF-Rezeptosomen:

- Zingler, P., Särchen, V., Glatter, T., Caning, L., Saggau, C., Kathayat, R.S., Dickinson, B.C., Adam, D., Schneider-Brachert, W., Schütze, S., Fritsch, J. (2019) Palmitoylation is required for TNF-R1 signaling. *Cell Commun. Signal*. Aug 5;17(1):90. doi: 10.1186/s12964-019-0405-8.

- Fritsch, J., Zingler, P., Särchen, V., Heck, A.-L., Schütze, S. Role of ubiquitination and proteolysis in the regulation of pro- and anti-apoptotic TNF-R1 signaling. (2017) **BBA – Mol. Cell Res.** 2017 Jul 29. pii: S0167-4889(17)30203-3. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.07.017. [Epub ahead of print]
- Fritsch, J., Fickers, R., Klawitter, J., Särchen, V., Zingler, P., Adam, D., Janssen, O., Krause, E., Schütze, S. (2016) TNF induced cleavage of HSP90 by Cathepsin D potentiates apoptotic cell death. **Oncotarget**, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.12411. [Epub ahead of print]
- Fritsch, J., Stephan, M., Winoto-Morbach, S., Tchikov, V., Gubkina, S., Kabelitz, D., Schütze, S. (2014) Cell-fate decisions to TNF regulated by K63 ubiquitination of TNF-receptor 1. **Mol. Cell. Biol.** 34 (17), 3214-3228
- Sosna, J., Voigt, S., Mathieu, S., Kabelitz, D., Trad, A., Tholey, A., Janssen, O., Meyer-Schwesinger, C., Schütze, S., Adam, D. (2013) The protease Htr2/Omi and UCH-L1 regulate TNF-induced necroptosis. **Cell. Signal. Commun.**, 2013, Oct 3;11:76. doi: 10.1186/1478-811X-11-76
- Sosna, J., Voigt, S., Mathieu, S., Lange, A., Thon, L., Davarnia, P., Herdegen, T., Linkermann, A., Rittger, A., Ka-Ming Chan, F., Kabelitz, D., Schütze, S., Adam, D. (2013) TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent two distinct and independent routes to programmed cell death. **Cell. Mol. Life Sci.** (published online 13. June 2013; DOI 10.1007/s00018-013-1381-6)
- Klingeisen, L., Ehrenschwender, M., Heigl, U., Wajant, H., Helgans, T., Schütze, S., Schneider-Brachert, W. (2012) E3-14.7K is recruited to TNF-Receptor 1 and blocks TNF cytolysis independent from interaction with optineurin. **PLoS ONE** 7(6):e38348. doi: 10.1371/journal.pone.0038348. Epub 2012 Jun 4.7
- Edelmann, B., Bertsch, U., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Jakob, M., Adam-Klages, S., Kabelitz, D., Schütze, S. (2011). Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1-receptosomes. **EMBO-J.** 30. 379-394
- Bertsch, U., Edelmann, B., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Schütze, S. (2011) Compartmentalization of TNF-receptor 1 signaling: TNF-R 1 - associated caspase-8 mediates activation of acid sphingomyelinase in late endosomes. **Adv. Exp. Med. Biol.** 691, 605-16
- Tchikov, V., Bertsch, U., Fritsch, J., Edelmann, B., Schütze, S. (2011) Subcellular compartmentalization of TNF receptor-1 and CD95 signaling pathways. **Eur. J. Cell Biol.** 90, 467-475

- Philipp, S, Puchert, M, Adam-Klages, S, Tchikov, V, Winoto-Morbach, S, Mathieu, S, Jung, A, Kolker, L, Marchesini, N, Kabelitz, D, Schütze, S, Adam, D. (2010) The polycomb group protein EED couples TNF-receptor 1 to neutral sphingomyelinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 1112-1117
- Yazdanpanah, B., Wiegmann, K., Tchikov, V., Krut, O., Pongratz, C., Schramm, M., Kleinridders, A., Wunderlich, T., Kashkar, H., Utermöhlen, O., Brüning, J.C., Schütze, S., Krönke, M. (2009) Riboflavin kinase couples TNF Receptor 1 to NADPH oxidase. *Nature* 460, 1159-1163
- Liao, W., Fujita, K., Tchikov, V., Yang, W., Gunsor, M., Garfield, S., Goldsmith, P., El-Deiry, W.S., Schütze, S., Srinivasula, S. (2009) CARP1 regulates induction of NF- κ B by TNF α . *Curr. Biol.* 19, R17-R19
- Liao, W., Xiao, Q, Liao, Z., Wincovitch, S., Garfield, S., Yang, W., Tchikov, V., El-Deiry, W., Schütze, S., Srinivasula, S.M. (2008) CARP-2 is an endosomal ubiquitin protein ligase for RIP and regulates TNF-induced NF- κ B activation. *Curr. Biol.* 18, 641-649
- Schütze, S., Tchikov, V., Schneider-Brachert, W. (2008) Regulation of TNF-R1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 655-662
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Kruse, M.-L., Lehn, A., Jakob, M., Hildt, E., Held-Feindt, J., Kabelitz, D., Krönke, M., Schütze, S. (2006) Inhibition of TNF receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism. *J. Clin. Invest.* 116: 2901-2913
- Heinrich, M., Neumeyer, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Trauzold, A., Hethke, A., Schütze, S. (2004) Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and caspase-3 activation. *Cell Death Differentiation* 11, 550-563
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Held-Feindt, J., Winoto-Morbach, S., Neumeyer, J., Jakob, M., Merkel, O., Ehrenschwender, M., Heinrich, D., Adam, D., Kabelitz, D., and Schütze, S. (2004) Compartmentalization of TNF Receptor-1 Signaling: Internalized TNF Receptosomes as Death Signaling Vesicles. *Immunity* 21, 415-428

TRAIL-Rezeptosomen:

- Voigt, S, Philipp, S, Davarnia, S, Winoto-Morbach, S, Röder, C, Arenz, C, Trauzold, A, Kabelitz, D, Schütze, S, Kalthoff, H, Adam, D. (2014) TRAIL-induced programmed necrosis as a novel approach to eliminate tumour cells. *BMC Cancer* 14(1):74

- Lemke J, Noack A, Adam D, Tchikov V, Bertsch U, Röder C, Schütze S, Wajant H, Kalthoff H, Trauzold A. (2010) TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5. *J. Mol. Med.* 88, 729-740

CD95-Rezeptosomen:

- Stephan, M., Edelmann, B., Janssen, O., Schütze, S. Fritsch, J. (2017) Biphasic activation of acid sphingomyelinase by CD95 Ligand stimulation. *Oncotarget*, Mar 21;8(12):20067-20085. doi: 10.18632/oncotarget.15379.
- Feig, C., Tchikov, V., Schütze, S., Peter, M.E. (2007). Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *EMBO J.* 26:221-231
- Lee K-H, Feig C, Tchikov V, Schickel R, Hallas C, Schütze S, Peter ME, Chan AC. (2006) The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO-J.* 25:1009-1023