



Die Bedeutung von TRAF2 bei TRAIL-induzierter  
Apoptose und Nekroptose.

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Ingolf Karl**

aus

Bad Langensalza

Würzburg, 2015

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

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin Engstler

1. Betreuer: Prof. Dr. Harald Wajant

2. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Müller

**Tag des Promotionskolloquiums:** .....

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

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Die Bedeutung von TRAF2 bei TRAIL-induzierter Apoptose und Nekroptose.“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und 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.

Bad Segeberg,.....

Datum

Unterschrift

## **Affidavit**

I herewith confirm that this thesis entitled “Die Bedeutung von TRAF2 bei TRAIL-induzierter Apoptose und Nekroptose.” is result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and materials applied are listed and specified in the thesis. I also confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process in identical or similar form.

Bad Segeberg,.....

Date

Signature

Die vorliegende Arbeit wurde vom 01. März 2011 bis 31. Mai 2014 in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie des Universitätsklinikums Würzburg unter Anleitung von Frau Dr. med. Tina Giner angefertigt.

## **Danksagung**

Mein großer Dank gilt Herrn Professor Harald Wajant nicht nur für die Übernahme des Gutachtens der vorliegenden Arbeit, sondern auch für drei Jahre wissenschaftliche Betreuung, die zeitweise Aufnahme in sein Labor und auch für das Mitverfassen eines Fachartikels. Für die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Professor Thomas Müller bedanken. Für die vielen Anregungen und Hilfestellungen sowie die fortwährende fachliche Diskussion möchte ich dem Direktor der Würzburger Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, Professor Matthias Goebeler, herzlich danken.

Für die Vergabe einer Promotionsstelle, einem zugehörigen Thema und allen notwendigen Mitteln, für eine stets ausgezeichnete, fördernde Betreuung und eine immerwährende sehr gute Arbeitsatmosphäre möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Tina Giner bedanken.

Für Rat und Tat und ein stets gutes Gefühl auf Arbeit zu kommen möchte ich Frau Martina Joßberger-Werner danken. Unsere ausgezeichnete Zusammenarbeit im Labor sowie die Grill- und Glühweinabende werden mir immer in Erinnerung bleiben. Für absolute Zuverlässigkeit und seinen kritischen Geist möchte ich Christian Adam sehr herzlich danken. Wir waren im selben Boot! Für Hilfe und Rat möchte ich Nicole Schmidt, Sabrina Angermeyer, Claudia Rüth, Margit Ott, Helga Sennefelder, Lena Völkert, Miriam Alb, Ravi Kumar Komaravolu und Carmen Schäfer danken, außerdem für die botanischen Fachsimpelleien Dr. Andreas Kerstan.

Für Hilfe und Zuverlässigkeit, wenn es darauf angekommen ist, und die vielen wunderbaren Abende zusammen möchte ich mich bei Thomas und Christoph Willmes ganz herzlich bedanken. Auf Euch, Freunde! Für ihre Zuversicht möchte ich zudem meinen Eltern Dr. Helmut Karl und Cornelia Allenstein und ihren Partnern wärmstens danken sowie meiner Schwester Nadine Waldorf und ihrer Familie.

Zu guter Letzt gibt es mit Katharina Jähn eine Person, die auf mich drei Jahre in der Ferne gewartet hat, die mir ihr Herz gab und auch meines verwahrt, für immer. Danke, mein Schatz, ich liebe Dich.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 TNF-Rezeptoren und ihre Liganden	8
1.1.1 Liganden der TNF-Familie	8
1.1.2 Rezeptoren der TNF-Familie	9
1.2 Todesrezeptorvermittelte Signalwege	11
1.3 Die TRAIL-Signaltransduktion und ihre klinische Relevanz	15
1.4 Nekroptose	17
1.5 Die Proteine der TRAF-Familie	19
1.6 TWEAK, Fn14 und der alternative NF $\kappa$ B Signalweg	22
1.7 Zielsetzung	23
<b>2. Materialien</b>	<b>24</b>
2.1 Geräteliste	24
2.2 Verbrauchsmaterialien	25
2.3 Chemikalien, Zytokine, Inhibitoren	26
2.4 Antikörper	28
2.4.1 Reagenzien zur Immundetektion (FACS-Antikörper)	28
2.4.2 Primärantikörper für den Immunoblot	29
2.4.3 Sekundärantikörper	29
2.5 Zellkulturmedien	30
2.6 Eukaryotische Zelllinien	30
2.7 siRNA-Oligos zum transienten Knockdown von Proteinen	31
2.7.1 TRAF2 siRNAs	31
2.7.2 Negativkontroll-siRNAs	31
2.8 DNA-Vektoren zur Proteinexpression	31
2.9 Puffer und Lösungen	32
<b>3. Methoden</b>	<b>34</b>
3.1 Zellkultur	34
3.1.1 HaCaT-Keratinozyten	34
3.1.2 Kultur weiterer Zelllinien	35
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl durch Neubauermikroskopie	35
3.2 Kryokonservierung und Revitalisierung eukaryotischer Zellen	36
3.3 Zelladhäsionsassay	36
3.4 Statistische Analysen	37
3.5 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	38
3.6 Herstellung denaturierter Zelllysate	39
3.6.1 Volllysatherstellung mittels 4x SDS-Puffer	39
3.6.2 Isolierung der Triton X100-solublen Fraktion	40
3.6.3 Protease- und Phosphatase-Inhibition	40
3.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	40
3.8 Analyse elektrophoretisch aufgetrennter Proteine	41
3.8.1 Coomassiefärbung	41
3.8.2 Western Blot	42
3.8.3 Ponceau S-Färbung	42
3.8.4 Immundetektion	42
3.9 Immunpräzipitation	43

3.10	Durchflusszytometrie.....	46
3.10.1	Kontrolle der GFP-Expression per FACS.....	46
3.10.2	Lebend/Tot-Differenzierung per Propidiumiodid.....	46
3.10.3	Rezeptorfärbung .....	47
3.11	Fluoreszenzmikroskopie.....	48
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
4.1	Knockdown von TRAF2 sensibilisiert HaCaT-Keratinocyten für TRAIL-induzierten Zelltod.....	49
4.2	TRAF2-Knockdown sensitiviert HaCaT-Keratinocyten für Nekroptose nach TRAIL-Stimulation.....	51
4.3	TRAF2-Knockdown sensitiviert die epitheliale Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa für TRAIL-induzierte Apoptose.....	53
4.4	Expression von RIP3 sensitiviert HeLa-Zellen für TRAIL-induzierte Nekroptose.....	54
4.5	TRAF2-Knockdown sensitiviert HeLa-Zellen für Apoptose und RIP3-exprimierende HeLa-Zellen für Apoptose und Nekroptose.....	56
4.6	Fc-TWEAK rekrutiert zytoplasmatisches TRAF2 in ein Triton X100-unlösliches Kompartiment und sensitiviert HaCaT-Keratinocyten für TRAIL-induzierte Nekroptose.....	61
4.7	Fc-TWEAK verstärkt TRAIL-induzierte Nekroptose in RIP3-exprimierenden HeLa-Zellen.....	63
4.8	Fc-TWEAK induziert keinen autokrin aktiven Tumornekrosefaktor in HaCaT-Keratinocyten.....	66
4.9	Knockdown von TRAF2 führt nicht zu kanonischer NFκB-Aktivierung.....	70
4.10	Das SMAC-Mimetikum BV6 sensitiviert HaCaT-Keratinocyten für TRAIL-vermittelte Apoptose und Nekroptose.....	71
4.11	Immunpräzipitation von Caspase 8-Komplexen.....	72
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>74</b>
5.1	TRAF2 als Antagonist von Apoptose und Nekroptose in der TRAIL-Signaltransduktion.....	74
5.2	Die Bedeutung Fc-TWEAK-mediiertes TRAF2-Depletion für die TRAIL-induzierte Apoptose und Nekroptose.....	78
5.3	Modifikationen der Komponenten des Nekroptosoms.....	84
5.4	Modell zur multifunktionalen protektiven Wirkungsweise von TRAF2 im Kontext TRAIL-induzierter Apoptose und Nekroptose.....	87
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>90</b>
<b>8.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>91</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>103</b>
9.1	Lebenslauf.....	103
9.2	Publikationen.....	104
9.2.1	Fachartikel.....	104
9.2.2	Posterpräsentationen und Kongressvorträge.....	104
9.3	Abkürzungsverzeichnis.....	105

## 1. Einleitung

### 1.1 TNF-Rezeptoren und ihre Liganden

Zellen und damit die aus ihnen bestehenden Gewebe kommunizieren untereinander, was in einer Vielzahl von regulativen Prozessen resultiert, die für den Erhalt der Integrität des gesamten Organismus wichtig sind. Hormone und Zytokine dienen als Vektoren dieser Kommunikation. Sie werden durch andere Zellen produziert und sind entweder membrangängig und binden direkt an ihren zytoplasmatischen Rezeptor, oder sie binden an von den Zielzellen an deren Oberfläche präsentierte Rezeptoren. Die Ligation zellständiger Rezeptoren bzw. deren Internalisierung kann eine sekundäre Einschleusung des Liganden ins Zellinnere induzieren. Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie sind essentiell für die Funktion unterschiedlichster Zellen und Gewebe. Sie vermitteln Signale im Kontext der Immunität, der unterschiedlichen Formen des sogenannten programmierten Zelltodes, der Proliferation, der Migration und von Differenzierungsprozessen. Diese Moleküle sind somit nicht nur für Immunregulation von zentraler Bedeutung, sondern tragen auch entscheidend zur Entwicklung verschiedener Organe und Zelltypen bei und sind für die Gewebshomöostase wichtig.

#### 1.1.1 Liganden der TNF-Familie

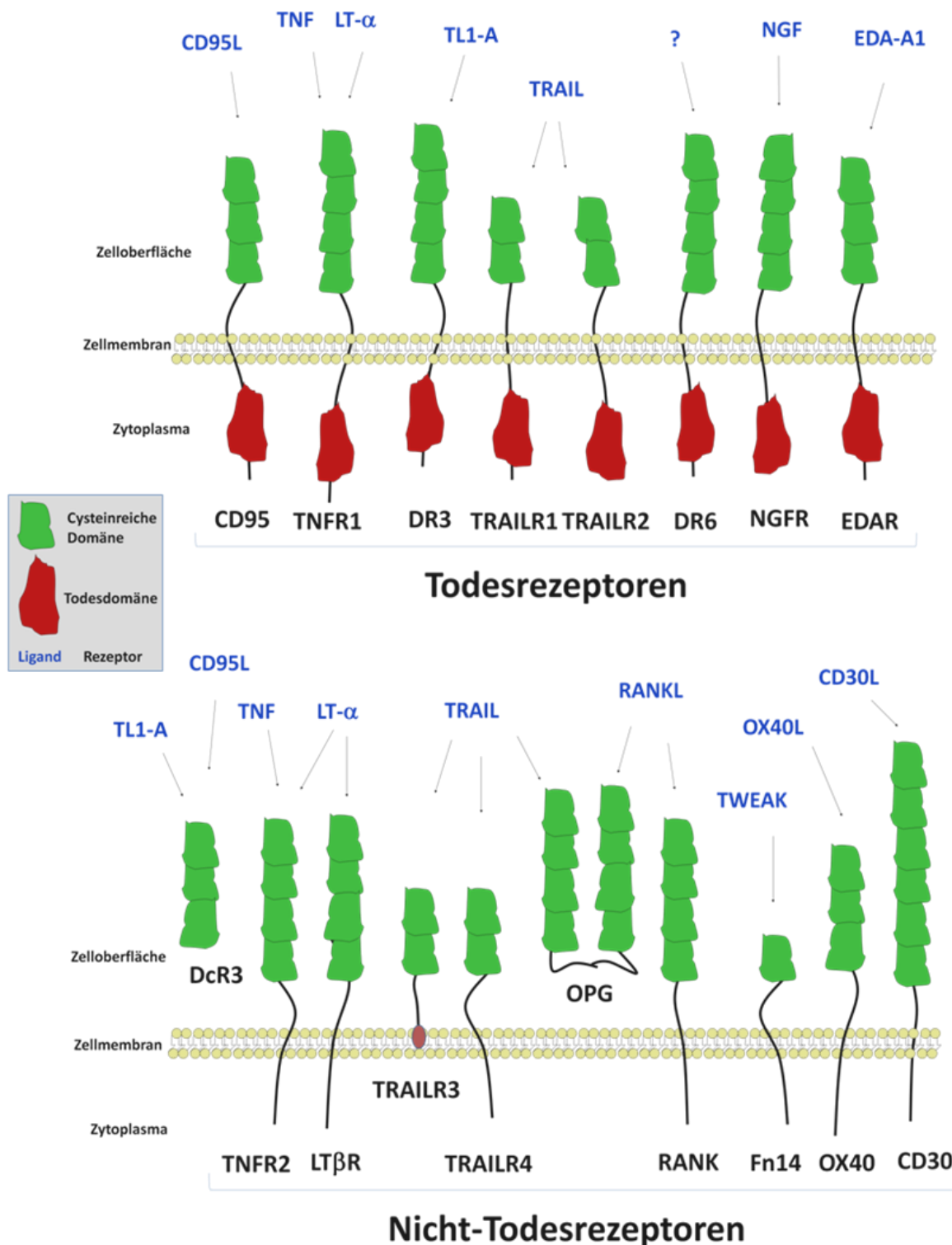
Vor bereits 70 Jahren wurde gezeigt, dass die Applikation von aus Bakterien isoliertem Lipopolysaccharid (LPS) zur Rückbildung von Tumoren führen kann. Dies ist jedoch kein direkter Effekt vom LPS sondern stellt vielmehr eine Reaktion dar auf ein Protein, dessen Produktion durch LPS im Gewebe induziert wird und welches inflammatorisch wirkt (O'Malley 1962). 1975 wurde das isolierte Protein durch Carswell et al. als Tumornekrosefaktor (TNF) beschrieben und 1984 kloniert, wobei funktionelle und sequentielle Homologien zu Lymphotoxin- $\alpha$  (LT $\alpha$ ) erkannt wurden. Dies führte zur Definition einer neuen Zytokinfamilie. Die Übereinstimmungen dieser Familie liegen vor allem in einem als TNF-Homologie-Domäne (THD) bezeichneten C-terminalen Bereich, der strukturell aus zwei antiparallelen Betafaltblättern besteht. Die THD vermittelt sowohl die Rezeptorbindung als auch die Trimerisierung der



Ligandenmoleküle (Bazan 1993). Bis auf das sekretierte  $LT\alpha$  sind die Liganden der TNF-Familie Typ II- oder Typ III-Transmembranproteine, d.h. sie besitzen eine extrazelluläre carboxyterminale Domäne und der Aminoterminus ist intrazellulär lokalisiert (Armitage 1994). Alternatives Spleißen oder Proteolytische Prozessierung erzeugen aber auch lösliche Formen der Liganden, die dann noch die intakte THD enthalten (Bodmer et al. 2002). Bis auf  $LT\alpha\beta_2$ , das aus dem löslichen  $LT\alpha$  und dem membranständigen  $LT\beta$  besteht, lagern sich membranständige als auch lösliche TNF-Liganden THD-vermittelt zu trimeren Molekülen zusammen und generieren so an den interagierenden Kontaktstellen jeweils zweier Ligandenprotomeren eine Rezeptorbindungsstelle.

### **1.1.2 Rezeptoren der TNF-Familie**

Die Familie der TNF-Rezeptoren umfasst 29 humane Proteine, die mit Ausnahme der nur als lösliche Moleküle vorkommenden Rezeptoren Decoy-Rezeptor 3 und Osteoprotegerin als Typ I-Transmembranproteine vorliegen. Die extrazelluläre Domäne der TNF-Rezeptoren ist durch den Besitz von bis zu sechs Cystein-reichen Domänen (CRDs) charakterisiert. Jede CRD besteht aus ca. 40 Aminosäuren und besitzt vier bis sechs konservierte Cysteinreste, die u.a. auch für die Ligandenbindung von Bedeutung sind (Zhang 2004, Smith et al. 1994). Von mehreren TNF-Rezeptortypen sind auch lösliche Rezeptoren bekannt, die durch Proteolyse oder alternatives Spleißen entstehen. Die membranständigen Rezeptoren werden durch Bindung ihrer jeweiligen Ligandentrimere ebenfalls trimerisiert, wodurch das Signal „Ligandenbindung“ mechanistisch ins Zellinnere transloziert wird. Die trimerisierten Rezeptoren können zytoplasmatische Proteine binden, die das „Ligandenbindungs“-Signal weiterleiten. Eine ganze Reihe von Befunden spricht dabei dafür, dass trimere TNF-Ligand-TNF-Rezeptor-Komplexe sekundär interagieren müssen, um eine maximale Signalweiterleitung zu gewährleisten. Die Rezeptoren der TNF-Familie werden aufgrund ihrer Aktivitäten und den von ihnen nach Ligandenbindung rekrutierten Proteinen eingeteilt in die sogenannte TNFR-associated factors (TRAF) bindenden TNF-Rezeptoren und die Todesrezeptoren.



**Abbildung 1.1. Übersicht der bekannten Todesrezeptoren sowie ausgewählter Nicht-Todesrezeptoren der TNF-Familie.** Es ist jeweils sofern bekannt der jeweilige TNF-Ligand angegeben. Bei den Rezeptoren sind sowohl Cystein-reiche Domänen (CRD) als auch die Todesdomänen angegeben. Für Einzelheiten siehe Textabschnitt 1.1.

Letztere besitzen eine konservierte Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die namensgebende Todesdomäne (DD), und rekrutieren zytoplasmatische Proteine, die gleichfalls eine DD besitzen. Mit Hilfe mancher dieser DD-Adaptorproteine können einige Todesrezeptoren (TNFR1, CD95, TRAILR1, TRAILR2) den Programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren. Folgende TNF-Rezeptoren besitzen eine Todesdomäne: TNFR1, FAS (CD95), TRAILR1 und TRAILR2, DR3 und DR6, EDAR sowie NGFR (p75) (Wajant et al. 2003). Neben dem klassischen Konzept der Trimerisierung von Rezeptormonomeren durch ihre Liganden konnte für TNF-Rezeptor 1 sowie für Fas (CD95) und CD40 nachgewiesen werden, dass deren Monomere auch Liganden-unabhängig interagieren können, allerdings ohne dass es zu einer Rezeptoraktivierung kommt. Dies erfolgt durch eine N-terminale, als PLAD (pre-ligand assembly domain) bezeichnete Domäne (Chan et al. 2000). Demzufolge könnte es sein, dass zumindest für die Aktivierung der genannten Rezeptoren nicht nur die Trimerisierung entscheidend für die Signaltranslokation ins Zellinnere ist, sondern auch weitere Prozesse, die durch die Bindung des Liganden aktiviert werden. Im Fall des TNFR1 wurde z.B. gezeigt, dass die Ligandenbindung eine Clathrin-vermittelte Endozytose der gebildeten Komplexe zur Folge hat (Schneider-Brachert et al. 2004) und für CD95 wurde die Liganden-induzierte Bildung von CD95-Komplexen und deren Internalisierung gezeigt (Parlato et al. 2000, Lee et al. 2006). Auch für die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 konnten TRAIL-induzierte endozytotische Prozesse gezeigt werden (Austin et al. 2006), jedoch scheinen diese zelltypspezifisch zu sein (Kohlhaas et al. 2007; Akazawa et al. 2009).

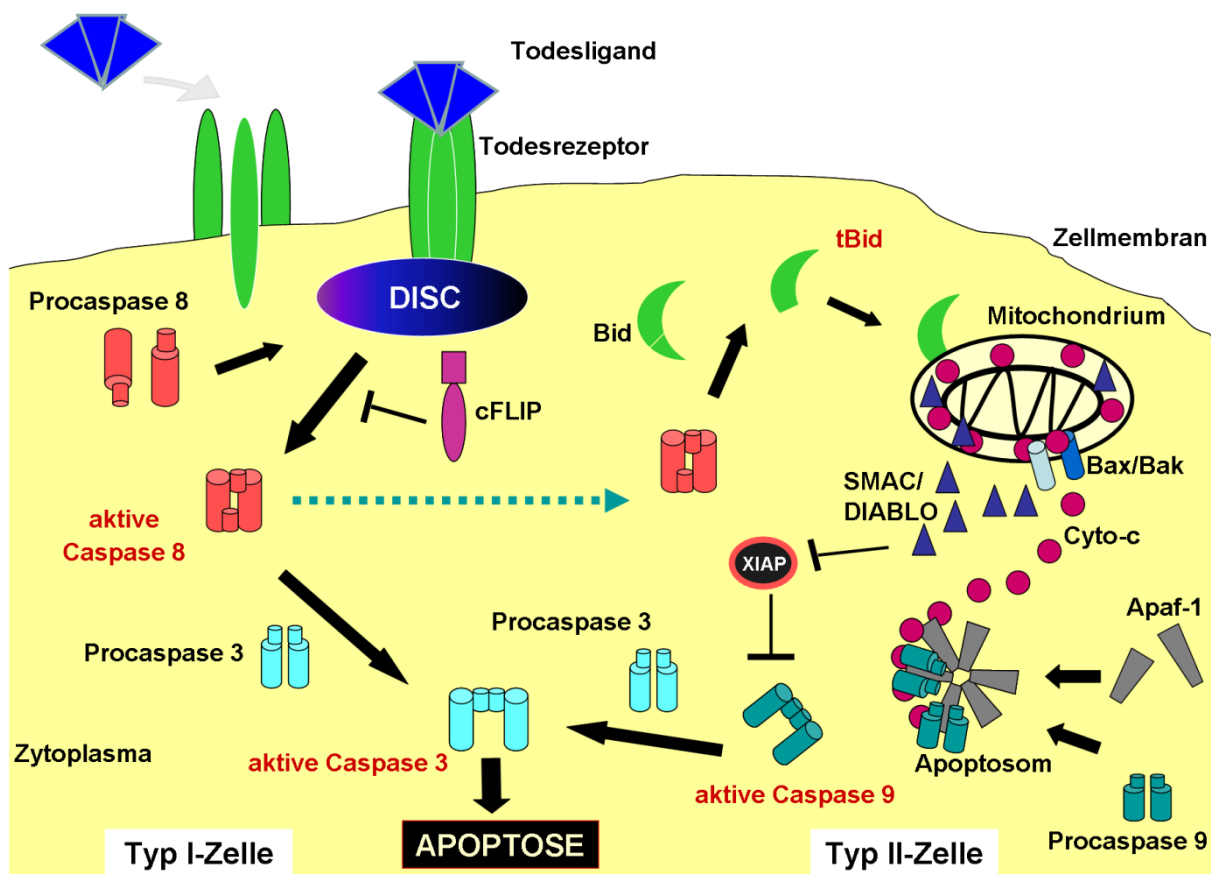
## 1.2 Todesrezeptorvermittelte Signalwege

Nach Trimerisierung durch den trimeren Liganden findet intrazellulär die Bindung von Adaptorproteinen an die Todesrezeptoren statt. Durch die trimere Struktur ist eine höhere Avidität gewährleistet, was zur Multimerisierung der gebildeten Komplexe führen kann. Diese Multimerisierung kann nötig sein, um die eigentliche Aktivierung von Caspase 8 zu vollziehen (Locksley et al. 2001). Trotz ihres Namens vermitteln Todesrezeptoren nicht ausschließlich Zelltodsignale, sondern können auch andere Signalwege induzieren, die z.B. zu Inflammation, Migration und Proliferation (Kreuz et al. 2004) führen. Dies hängt einerseits von der Anzahl der gebundenen Liganden

und damit der Anzahl der trimerisierten und unter Umständen multimerisierten Rezeptoren ab. Andererseits spielt es auch eine Rolle, wie viele Adaptorproteine (FADD, TRADD) intrazellulär zur Verfügung stehen und wie viele Procaspase 8- bzw. RIP1-Moleküle vorhanden bzw. rekrutierbar sind. Damit ist das Schicksal der Zelle auch abhängig von der Stöchiometrie der beteiligten interagierenden Proteine. Über sog. homotypische Interaktion der Todesdomänen von Todesrezeptoren mit den Adaptorproteinen FADD (Fas-associated death domain) bzw. TRADD (TNF-receptor associated death domain) werden unterschiedliche Signalkomplexe rekrutiert: TRADD rekrutiert die Receptor-interacting serin/threonine-protein kinase 1 (RIP1) als auch TNF-receptor associated factor 2 (TRAF2) sowie cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1) (Shu et al. 1996) und cIAP2 an den TNF-Rezeptor 1. Dadurch werden letztlich inflammatorische und antiapoptotische Signalwege initiiert, z.B. enthaltend NF $\kappa$ B-, p38- und JNK-Signalweg (Hayden & Gosh 2008). Die Stabilität von RIP1 an diesem ersten Komplex ist mit entscheidend für die Signalverarbeitung. Dabei findet unter anderem eine Modifizierung von RIP1 durch Ubiquitinierung statt. K48-verlinkte Ubiquitinketten markieren RIP1 für proteasomale Degradation, während K63-verlinkte Ubiquitine bzw. lineare Ubiquitinketten (Iwai 2011) zur Stabilisierung von RIP1 beitragen können (Wertz & Dixit 2010). Eine K63-Polyubiquitinierung an Lysin 377 ist essentiell für die erwähnte Aktivierung von NF $\kappa$ B, p38 und JNK (c-Jun terminal kinase), da diese Modifikation als molekulare Bindestelle für die transforming growth factor- $\beta$  activated kinase 1 (TAK1), das TAK1 binding protein 2 (TAB2) sowie den NF $\kappa$ B essential modulator (NEMO) dient. Deubiquitinierend wirken hingegen die Proteine A20 (De Valck et al. 1999; Evans et al. 2001) und CYLD (Wright et al. 2007), wobei ersteres nicht nur die stabilisierenden K63-Ubiquitinketten entfernt, sondern auch K48-Ketten an RIP1 ligiert, was RIP1 für den proteasomalen Abbau kennzeichnet (Newton et al. 2008). Folge sind Loslösen von RIP1 aus dem Komplex und damit der Abbruch des Signals in Richtung NF $\kappa$ B-Aktivierung. Des Weiteren ist auch gezeigt worden, dass Komplexe bestehend aus RIP1 und TRAF2 in der Lage sind, durch Initiierung des MAPK-Signalwegs JNK zu aktivieren, was dauerhaft ebenfalls zu Apoptose führen kann, wenn eine (zuvor erfolgte) NF $\kappa$ B-Inaktivierung zum Fehlen des antiapoptotischen X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) geführt hat (Tang et al. 2001). JNK-Aktivität führt zur Ubiquitinierung des cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) durch die

multifunktionale E3-Ubiquitinligase Itch (Übersichtsartikel: Venuprasad et al. 2015). Dadurch wird cFLIP für den proteasomalen Abbau markiert. cFLIP ist strukturell und sequenziell Caspase 8 sehr ähnlich, ihm fehlt allerdings die aktive proteolytische Domäne von Caspase 8. Da es zur Bindung von Caspase 8 fähig ist, können anstatt homodimerer Caspase 8-Komplexe auch heterodimere Caspase 8-cFLIP-Komplexe entstehen, wobei zwar cFLIP gespalten wird, jedoch die proapoptotische Spaltung von Caspase 8 unterbleibt, so dass cFLIP also kompetitiv zu weiteren Caspase 8-Molekülen wirkt und die Aktivierung der Caspase inhibiert (Schneider et al. 1997). Itch-katalysierte Ubiquitinierung von cFLIP senkt im Endeffekt die Schwelle zum Eingang in die Apoptose durch eine vergrößerte Anzahl aktivierter Caspase 8-Proteine. Die Zelle wird für den programmierten Zelltod sensitiviert (Budd et al 2006). Allerdings konnte für cFLIP auch im TRAIL-Kontext gezeigt werden, dass dieses nicht nur antiapoptotisch wirkt, sondern ebenfalls die NF $\kappa$ B-Aktivierung inhibiert (Wachter et al. 2004) und zwar unabhängig von der Prozessierung von Caspase 8 und cFLIP selbst. (Kavuri et al. 2011). Das Adaptorprotein FADD besitzt neben der Todesdomäne noch ein weiteres Strukturmotiv, die Todeffektordomäne (DED), mit der FADD Caspase 8 und Caspase 10 in den DISC rekrutieren kann. FADD interagiert über seine DD auch mit TRADD und den Todesrezeptoren, wodurch anfangs TRADD-bindende Rezeptoren auch FADD rekrutieren und darüber auch die genannten Initiatorcaspasen (eine Übersicht zu DED-Proteinen bieten z.B. Valmiki & Ramos 2008). Caspase 8-Moleküle werden so letztlich in den DISC rekrutiert und in p62-abhängigen Foci an der Zellmembran (Jin et al. 2009) durch die Ubiquitinligase Cullin 3 stabilisiert (Gonzalvez et al. 2012). Die daraus resultierende lokal gesteigerte Konzentration der Procaspasen führt dem Modell der induzierten Proximität (Salvesen & Dixit 1999) nach zur wechselseitigen Prozessierung der Procaspasen, einer Konformationsänderung und zur Bildung eines heterotetrameren Komplexes aus jeweils zwei Untereinheiten (p10 mit p43/p41 bzw. nach weiterer Prozessierung des Komplexes p10 mit p18), die aus zwei Procaspase 8-Moleküle hervorgegangen sind. Derartig reife Caspase 8-Komplexe spalten nachfolgend proapoptotische Proteine wie Bid zu aktiviertem tBid und die Proformen der Effektorcaspasen 3 und 6, was zu deren Aktivierung führt (Peter & Kramer 2003). Außerdem werden das antiapoptotisch wirkende cFLIP sowie die NF $\kappa$ B-Signalweg- bzw. Nekroptose-relevanten Kinasen RIP1 und RIP3 gespalten. Wie bereits besprochen, wirkt TRAF2

als Adaptor für cIAP1 und cIAP2, die RIP1 K63-ubiquitinieren können und so dessen NF $\kappa$ B-Signalweg stimulierende Wirkung aktivieren. Folglich kann aus einem apikalen Todesrezeptorstimulus durch K63-ubiquitiniertes RIP1 letztlich eine NF $\kappa$ B-Aktivierung resultieren anstatt Apoptose (Zhou et al. 2013). Sind die Caspasen allerdings durch einen artifiziellen oder natürlichen, z.B. viralen (Veyer et al. 2014) oder bakteriellen (Robinson et al. 2012) Inhibitor außer Funktion gesetzt, so bilden RIP1 (Holler et al. 2000) und RIP3 (Zhang et al. 2009) mit MLKL (Sun et al. 2012) Komplexe, die Nekroptose indizieren können (Vercammen et al. 1998). Da cIAP1 und cIAP2 die Aktivität des Caspase 8-RIP1-Komplexes regulieren und Caspase 8 zur Apoptoseinduktion benötigt wird und RIP1 und RIP3 dessen Substrate sowie Mediatoren des nekroptotischen Zelltods sind (Oberst et al. 2011), stellt sich die Frage hinsichtlich eines (putativen) Zusammenspiels dieser Proteine und von TRAF2 als mit allen interagierendem Protein.



**Abbildung 1.2. Extrinsische Apoptose.** Dargestellt sind beide Varianten todesrezeptorvermittelter Apoptose, wobei zwischen Typ I-Zellen mit Caspase 8-vermittelter Caspase 3-Aktivierung und Typ II-Zellen mit mitochondrialer Amplifizierungsschleife (SMAC-Freisetzung, Apoptosombildung und Caspase 9-Aktivierung) unterschieden wird. Für Erläuterungen siehe Textabschnitt 1.2.

Apoptose betreffend werden Zellen und Zelllinien unterteilt in zwei Typen. Erstens in solche, die durch die extrinsische Aktivierung (Todesrezeptoren) von Initiatorcaspasen ausreichend stimuliert werden, um Effektorcaspasen so effizient zu aktivieren, dass dadurch Apoptose robust induziert wird (Typ I). Zweitens in solche, die eine mitochondriale Amplifizierungsschleife benötigen, um nach Todesrezeptoraktivierung robust in die Apoptose zu gehen (Typ II). Typ II-Zellen präsentieren oftmals nur relativ wenige Rezeptormoleküle an ihrer Oberfläche (Meng et al. 2011) und/oder exprimieren wenig Caspasmoleküle oder viele antiapoptotische Proteine wie XIAP (Jost et al. 2009). Daher brauchen sie für die Apoptoseinduktion durch Todesrezeptoren eine Amplifizierung des initialen Caspase 8-Signals. Diese wird durch Caspase 8-abhängige Spaltung von Bid zu tBid (truncated BH3-interacting domain death agonist) eingeleitet. tBid aktiviert das auf der äußeren mitochondrialen Membran lokalisierte Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer), welches daraufhin mit Bax (Bcl-2 associated X-protein) Oligomere bildet und so Poren in die äußere Mitochondrienmembran einfügt. Durch diese Poren gelangen proapoptotische Faktoren, Cytochrom-c, second mitochondria-derived activator of caspase / direct IAP binding protein with low pI (SMAC/DIABLO) und weitere ins Zytoplasma. SMAC/DIABLO inhibiert das antiapoptotische XIAP (Vaux & Silke 2003), während Cytochrom-c den apoptosis promoting factor 1 (Apaf-1) bindet und ATP-abhängig das sog. Apoptosom bildet, welches die Caspase 9 rekrutiert und durch Apoptosom-assoziierte Dimerisierung aktiviert (Wurstle et al. 2009). Caspase 9 aktiviert nun Caspase 3 und so wird die Effektorstufe der Apoptose verstärkt stimuliert. Caspase 3, 6 und 7 spalten ICAD (inhibitor of Caspase-activated DNase) worauf CAD von ICAD freigesetzt wird und DNA spaltet (Enari et al. 1997). Caspase 3 spaltet PARP (poly(ADP-ribose) polymerase; Boulares et al. 1999). Unter anderem werden auch Bestandteile des Golgi-Apparates proteolysiert (Lane et al. 2002).

### **1.3 Die TRAIL-Signaltransduktion und ihre klinische Relevanz**

Der TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) wurde 1995 identifiziert (Wiley et al. 1995) und bisher als Bindungspartner von fünf Rezeptoren beschrieben. Neben den Apoptose vermittelnden Todesrezeptoren (Neumann et al. 2012) DR4 und DR5 (TRAILR1; Pan et al. 1997 und TRAILR2; Walczak et al. 1997) werden auch zwei

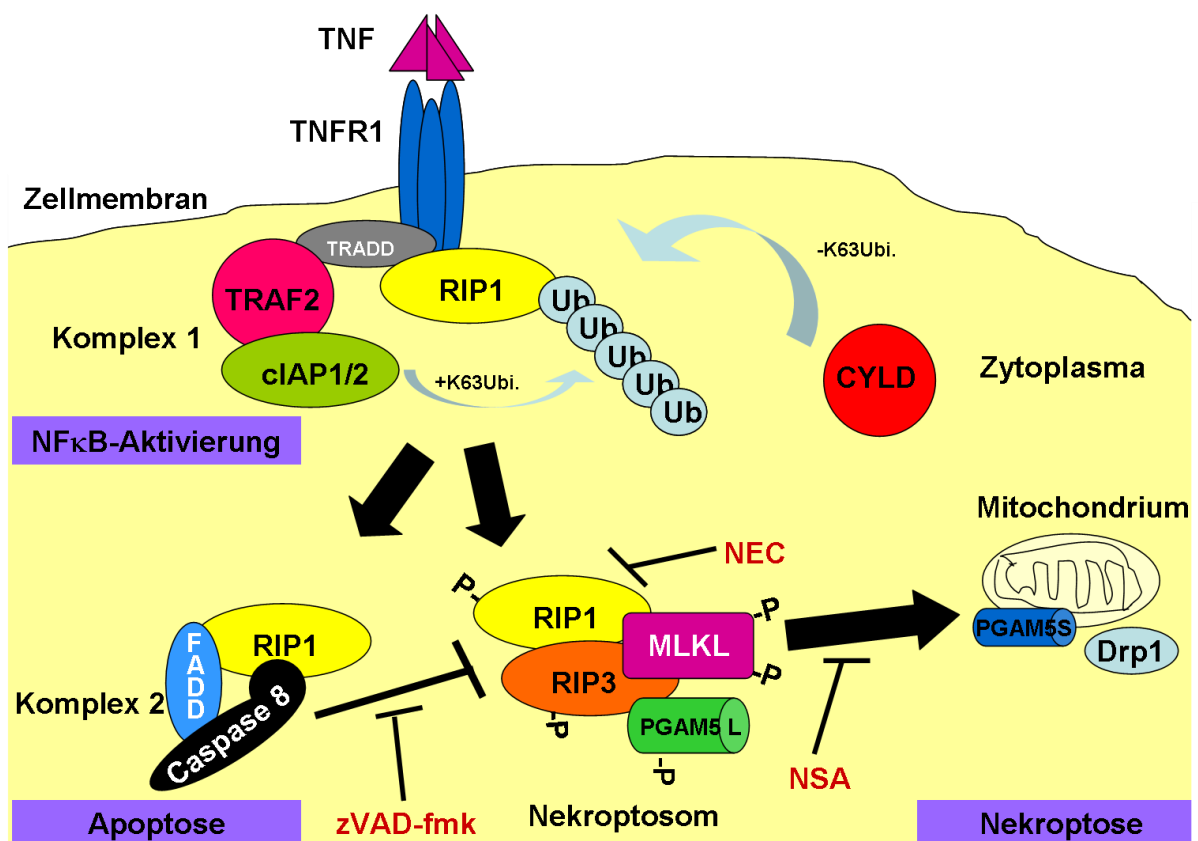
zellassoziierte Täuschungsrezeptoren gebunden, nämlich TRAILR3 (Decoy-Rezeptor 1; DcR1) und TRAILR4 (DcR2), die beide nicht in der Lage sind, proapoptotisches Signalling zu vermitteln, da entweder die zytoplasmatische DD trunkiert ist und dadurch inaktiv vorliegt (TRAILR4 / DcR2) oder der gesamte zytoplasmatische Abschnitt fehlt (TRAILR3 / DcR1). Außerdem bindet TRAIL an den löslichen Rezeptor Osteoprotegerin, einen RANKL-Antagonisten (Falschlehner et al. 2009). Die TRAIL-Rezeptoren 3 und 4 binden TRAIL kompetitiv zu TRAILR1 und TRAILR2 und wirken also inhibitorisch. TRAILR4 wurde im Gegenteil sogar beschrieben als Pro-survival-/Wachstums-Rezeptor auf HeLa-Zellen (Lalaoui et al. 2011). TRAILR1 und TRAILR2 kommen beide auf den Oberflächen unterschiedlichster Zelltypen vor und werden meist koexprimiert. Sie können heterotrimere Komplexe ausbilden und sind als proapoptotisch beschrieben worden, aber auch als Pro-survival-Signalgeber, die zur Aktivierung von NF $\kappa$ B und weiterer Faktoren beitragen (Hu et al. 1999). Dabei entstehen verschiedene Komplexe, die sowohl TRAF2, NIK, IKK als auch MEKK/Erk-Proteine enthalten können. Die komplexe Regulierung der TRAIL-stimulierten Signalwege spiegelt sich in den Ergebnissen zur Verwendung von TRAIL oder TRAIL-Rezeptor-spezifischen Antikörpern zur Therapie von Tumoren wider: problematisch waren hier bei präklinischen Experimenten in Mäusen das Auftreten von Tumormetastasierung als auch die Hochregulierung proinflammatorischer Zytokine (Trauzold et al. 2006, Gerspach et al. 2011). Gleiches konnte bei *in vitro*-Experimenten mit Zellkulturen gezeigt werden (Colo357; Hct116). In konstitutiv Phosphoinositid-3-Kinase-aktiven Hct116-Zellen wurde zudem nachgewiesen, dass eine nicht-apoptotische Caspase 8-Aktivität nach CD95L- oder TRAIL-Stimulation zu Spaltung und Aktivierung der rho-associated coiled coil-containing protein kinase-1 (ROCK1) und damit zu Migration der behandelten Zellen führt, verbunden mit einem amöboiden, invasiven Phänotyp (Ehrenschwender et al. 2010). Geserick et al. (2014) berichten abschließend von den derzeitigen Versuchen, durch Einsatz von TRAIL BRAF-Inhibitor-resistente Melanome für Zelltod in Kombination mit verschiedenen weiteren Inhibitoren zu resensitivieren.



## 1.4 Nekroptose

Nekroptose stellt phänotypisch eine andere Art von Zelltod dar als Apoptose. Ursprünglich als unreguliert betrachtet, ist heute bekannt, dass das für die Nekroptose typische Anschwellen der Organellen, das Abrunden der Zellen, die Volumenzunahme und das schlussendliche Aufreißen der Zellmembran durchaus gesteuerte Prozesse darstellen können (Cho et al. 2009). Dieser in Anlehnung an die Begriffe „Apoptose“ und „Pyroptose“ Nekroptose (Galluzzi et al. 2012) genannte Prozess ist abhängig von der Bildung eines nach dem DISC auftretenden, sekundären Komplexes. Dieser besteht mindestens aus den Proteinen Receptor-interacting protein 1 (RIP1; Degterev et al. 2005), RIP3 (Li et al. 2012) und Mixed-lineage kinase-like domain protein (MLKL; Sun et al. 2012). Zur Bildung dieses sogenannten Nekroptosoms (auch Necrosom) müssen nach Todesligandbindung und Formation eines DISC die Caspase 8-Moleküle inaktiviert bleiben und RIP1 muss aufgrund der Inaktivität der cIAPs ins Zytosol dissoziieren können (Tenev et al. 2011), wo es zur Bildung eines amyloiden Komplexes mit RIP3 (Li et al. 2012) kommen kann, der als molekulares Gerüst zur Rekrutierung weiterer pronekroptotischer Faktoren wie MLKL dient. Außerdem muss RIP3 an Ser227 (durch RIP1 oder auto-) phosphoryliert werden und auch MLKL muss durch Phosphorylierung an Thr357 und Ser358 aktiviert werden. Aktiviertes MLKL scheint über Aktivierung der Phosphoglycerate mutase 5 (PGAM5) in die Teilung der Mitochondrien einzugreifen und könnte so zur Effektorphase der Nekroptose beitragen. Die Isoform PGAM5S wurde auf Mitochondrienmembranen nachgewiesen (Wang et al. 2012) und kann im Verbund mit der Isoform PGAM5L den Mitochondrien-Teilungsfaktor Dynamin-related protein 1 (Drp1; Lee et al. 2004) aktivieren. Die Relevanz der Drp1-Aktivierung im Kontext der Nekroptose wird allerdings kontrovers diskutiert (z.B. Moujalled et al. 2014). Cai et al. (2014) berichten, dass MLKL Homotrimere bildet, die TNF-induziert an die Plasmamembran translozieren und durch Anlagerung an den Ionenkanal transient receptor potential melastatin related 7 (TRPM7) einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx induzieren. Auch ist strittig, ob RIP1 für die Induktion von Nekroptose unentbehrlich ist, was z.B. Moujalled et al. 2013 für mouse embryonic fibroblasts (MEFs) bei erhöhten RIP3-Leveln zeigen konnten.

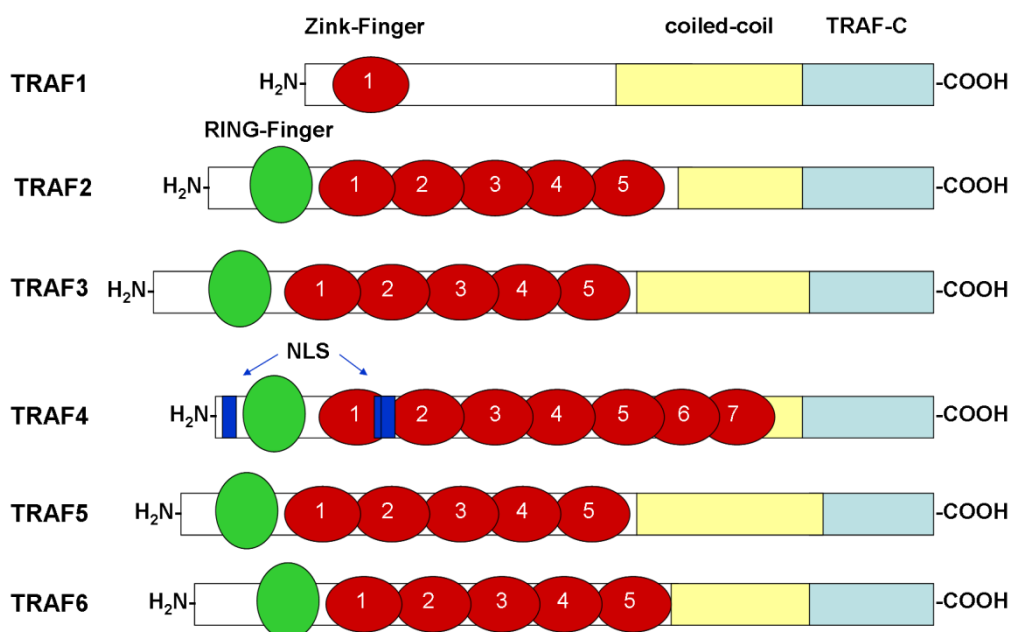
Remijisen et al. (2014) konnten zudem für murine L929-Zellen zeigen, dass die Depletion von MLKL oder RIP3 zu einer Art verzögerter RIP1-abhängigen Apoptose führt, während Knockdown von PGAM5, induced putative kinase 1 (PINK1) und Drp1 keinen Einfluss auf die TNF-induzierte Nekroptose hatte. Eine anhaltende JNK-Aktivierung und die Synthese reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) gelten als weitere (Zhao et al. 2012) zelltyp- bzw. gewebsspezifische (Fortes et al. 2012) Schritte nach Bildung des Nekroptosoms. Neben Todesliganden wie TRAIL können auch Moleküle, die als Aktivatoren intrinsischer Apoptose gelten, z.B. Staurosporin, unter Caspase-inhibierenden Bedingungen Nekroptose induzieren und sowohl der RIP1-Inhibitor Necrostatin-1 sowie der heatshock protein 90 (Hsp90)-Inhibitor Geldanamycin in U937-Makrophagen können diese zumindest in pars stoppen (Dunai et al. 2012). Die Autoren legten zudem dar, dass CA-074-OMe, ein Inhibitor lysosomaler Cystein-Cathepsine, die Nekroptose ebenfalls inhibiert und bestätigten, dass das von Sun et al. 2012 beschriebene Necrosulfonamide ein wirkungsvoller MLKL- und Nekroptoseinhibitor ist.



**Abbildung 1.3. Schema TNF-vermittelter Signalwege.** Dargestellt sind die relevanten Komplexe 1, 2 sowie das Nekroptosom sowie eine (hypothetische) Exekution der Nekroptose. Außerdem sind auch die Angriffspunkte der in dieser Arbeit angewendeten Inhibitoren aufgeführt. Für detaillierte Informationen siehe Textabschnitt 1.4.

## 1.5 Die Proteine der TRAF-Familie

Die sechs Mitglieder der TRAF-Familie sind durch einen konservierten Abschnitt in ihrer Aminosäuresequenz gekennzeichnet. So besitzen alle TRAFs die sog. TRAF-Domäne (Rothe et al. 1994). Diese befindet sich am carboxyterminalen Ende des Polypeptids und ist stark konserviert, was ihren C-terminalen Anteil (TRAF-C) betrifft, und etwas weniger stark in ihrem N-terminalen Abschnitt (TRAF-N). Die TRAF-N-Subdomäne hat Struktur- und Sequenzhomologien zu Coiled-Coil-Domänen (Hu et al. 1994) und ermöglicht es den monomeren Proteinen, Trimere zu bilden. Die TRAF-C-Subdomäne bildet eine pilzkopffartige, dreidimensionale Domäne im Zusammenspiel mit TRAF-N aus. Diese interagiert mit den zytoplasmatischen Bindedomänen der membranständigen Rezeptoren (Park et al. 1999). TRAF1 wurde entdeckt als ein durch TRAF2 an den TNFR2 rekrutiertes Protein (Rothe et al. 1994).

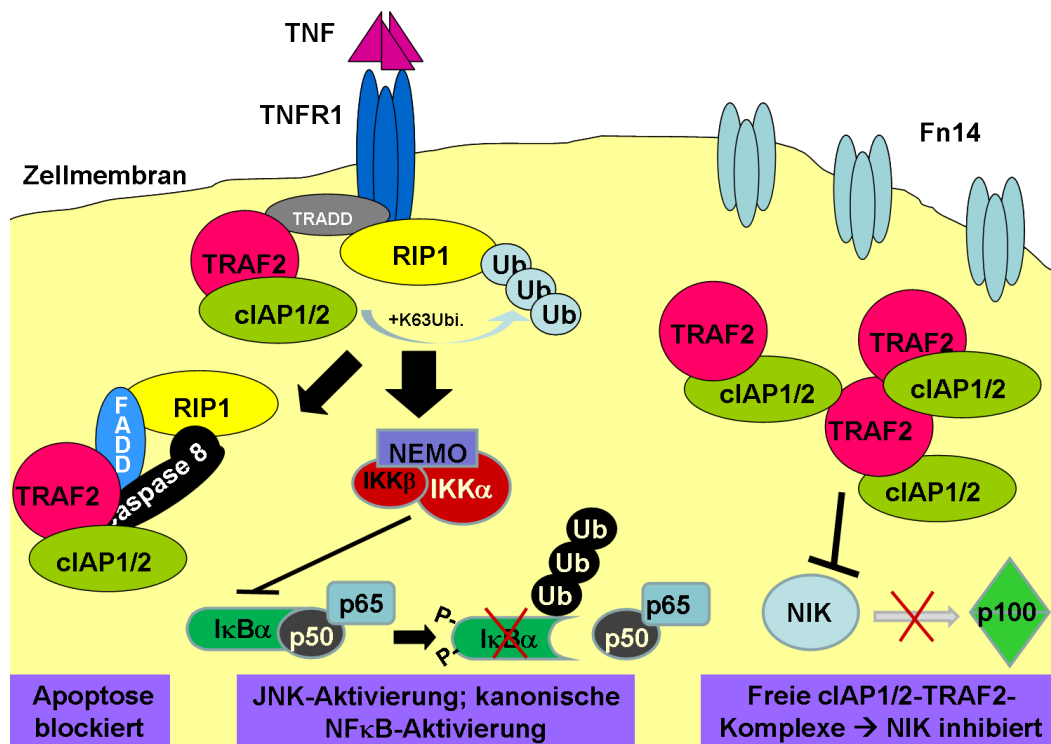


**Abbildung 1.4. Schematische Darstellung der TRAF-Proteine.** Relevante Domänen sind abgebildet. Nähere Informationen im Text unter Punkt 1.5.

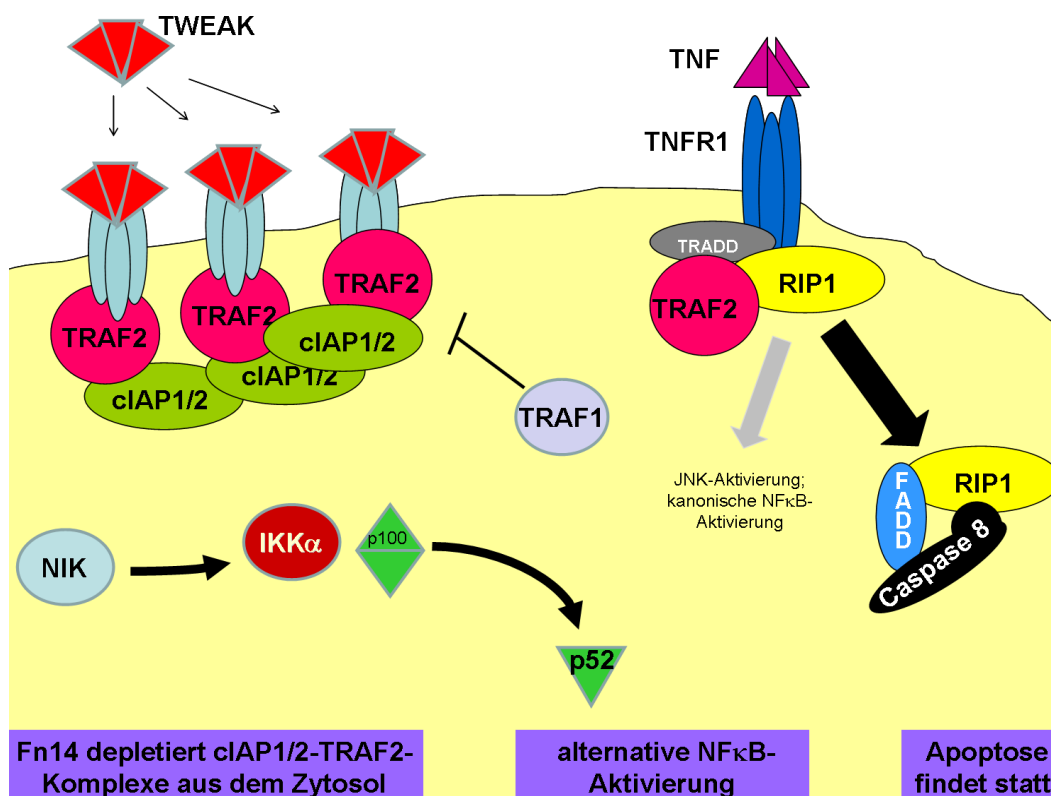
Bis auf TRAF1 weisen alle TRAFs aminoterminal eine weitere Domäne auf, nämlich einen sog. really interesting new gene (RING)-Finger, auf den bis zu sieben Zinkfinger Motive folgen. Der RING-Finger weist bei TRAF2 und TRAF3 eine für dieses Motiv häufige Cys3HisCys4-Struktur auf, während TRAF4, TRAF5 und TRAF6 eine eher seltene Cys3HisCys3Asp-Sequenz besitzen. TRAF2, TRAF3,

TRAF5 und TRAF6 beinhalten jeweils fünf hintereinander liegende Zinkfinger motive, TRAF1 nur eines und TRAF4 sieben. TRAF4 verfügt zusätzlich über zwei Kernlokalisationssequenzen und anstatt aus der Zytoplasmafraktion, wie die anderen TRAF-Proteine, wurde es kernassoziiert aufgereinigt (Regnier et al. 1995). TRAF-Proteine binden aufgrund ihrer ähnlichen Bindemotive teils dieselben Rezeptoren. Es sind mehrere Konsensus-Bindungssequenzen für die TRAF-Bindung bekannt. TRAF6 bindet als einziges TRAF an den nerve growth factor receptor (NGFR) und indirekt auch an den Interleukin 1-Rezeptor sowie an die Toll-like-Rezeptoren 2 und 4, außerdem an CD40. Die anderen TRAFs binden unter anderem an TNFR2, an CD30, CD40, LT $\beta$ -Rezeptor, RANK, GITR, Fn14, mindestens indirekt über weitere Proteine an TNFR1, CD95, TRAILR1, TRAILR2 und an einige andere mehr (Review Inoue et al. 2000). Außerdem interagieren TRAF-Proteine mit verschiedenen Enzymen, darunter MAP3-Kinasen, die zu JNK- und NF $\kappa$ B-Aktivierung führen. TRAF2 bindet zudem cIAP1 und cIAP2 (Rothe et al 1995) und interagiert dabei auch mit Proteinen, die bei der Aktivierung von NF $\kappa$ B relevant sind (Malinin et al. 1997). Dies betrifft einerseits die alternative Aktivierung von NF $\kappa$ B via NIK. Hier kommt es zur Phosphorylierung von IKK $\alpha$  durch akkumuliertes NIK, dadurch zur Phosphorylierung und Ubiquitinierung von p100, das im Komplex mit RelB vorliegt, und in der Folge zur Prozessierung von p100 zu p52 und so zur Generierung von p52:RelB-Komplexen. Letztere können in den Nukleus translozieren und die Transkription definierter Gene induzieren (Miyamoto & Verma 1995). Andererseits ist TRAF2 auch in die klassische Aktivierung von NF $\kappa$ B involviert, wo durch Interaktion von TRAF2 mit RIP1 die regulatorische Untereinheit des IKK-Komplex, NEMO (IKK $\gamma$ ), von TRAF2-assoziierten MAP3-Kinasen, z.B. MEKK3 oder TAK1, phosphoryliert wird und dadurch der IKK-Komplex (IKK $\alpha$ :IKK $\beta$ :IKK $\gamma$ , entspricht IKK1:IKK2:NEMO) aktiviert wird. Dieser Komplex phosphoryliert I $\kappa$ B $\alpha$ , was zu dessen proteasomalem Abbau führt, wodurch zuvor durch I $\kappa$ B $\alpha$ -Moleküle im Zytoplasma sequestrierte p50:p65 NF $\kappa$ B-Heterodimere frei werden und in den Nukleus translozieren können. TRAF1, TRAF2 und TRAF3 binden zudem RIP1, welches Todessignal-abhängig von TRADD rekrutiert wird (Hsu et al. 1996).

a.)



b.)



**Abbildung 1.5. Aktivierung des Alternativen NFκB-Weges.** TWEAK-vermittelte TRAF2/cIAP1/cIAP2-Depletion und die Konsequenzen hinsichtlich Apoptose und NFκB-Aktivierung. Details siehe Text 1.6 und Kästen in den Grafiken.

Kürzlich erst wurde durch Gonzalez et al. (2012) gezeigt, dass TRAF2 nach einem TRAIL-induzierten Todessignal in der Lage ist, zum DISC rekrutierte und dort durch Cullin-3 stabilisierte Caspase 8-Proteine mit K48-verlinkten Ubiquitinpolymeren zu versehen, weshalb die Autoren für TRAF2 die maßgebliche Funktion definierten, die Halbwertszeit der Initiatorcaspase zu bestimmen, denn weniger TRAF2 führte zu geringer K48-polyubiquitinierten p43- bzw. p18-Untereinheiten von Caspase 8 und damit zu deren längerer enzymatischer Aktivität. Die Autoren belegten zudem durch Immunpräzipitationen der Caspase 8 (p18)-Untereinheit, dass diese TRAF2-abhängig ubiquitiniert wird. Diese neue Funktion von TRAF2 als aktive E3-Ubiquitin-Ligase neben den bereits ausgeführten weiteren Eigenschaften als Rekrutierungsprotein für cIAP1/2 im Zusammenspiel mit RIP1 und TRADD könnte essentiell zum Verständnis der Regulierung des Todessignals von Todesrezeptoren sein. TRAF2 als „Shut-off timer“ für Caspase 8 (Gonzalez et al. 2012) wird allerdings kontrovers diskutiert.

### **1.6 TWEAK, Fn14 und der alternative NF $\kappa$ B Signalweg**

Nach Bindung des TNF-Liganden TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) an das zur TNF-Rezeptorfamilie gehörende Fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14)-Molekül erfolgt die Rekrutierung zytosolischer Proteinkomplexe, bestehend aus TRAF2 sowie cIAP1 und cIAP2 an die zytoplasmatische TRAF-Bindedomäne von Fn14. Dies führt zu einer Depletion der genannten Proteine im Zytoplasma und hat zur Folge, dass diese nicht mehr für die K48-Ubiquitinierung der NF $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) zur Verfügung stehen, die so in unstimulierten Zellen permanent für den proteasomalen Abbau markiert wird. Bindung von TWEAK an Fn14 führt folglich zum Ausbleiben des permanenten Abbaus von NIK, dieses reichert sich an und phosphoryliert die Inhibitor of kappaB kinase 1 (IKK1), welche wiederum p100 phosphoryliert und damit dessen partielle Degradation bzw. Prozessierung zu p52 bewirkt, wodurch der alternative NF $\kappa$ B-Signalweg induziert wird (Wicovsky et al. 2009).

## **1.7 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von TRAF2 im Kontext des TRAIL-induzierten Zelltodes unter Beachtung seiner derzeit bekannten oder vermuteten Funktionen zu klären. Es wurde daher der Einfluss von TRAF2 auf die TRAIL-induzierte Apoptose und Nekroptose untersucht als auch die Funktion von TRAF2 als Mediator der NF $\kappa$ B-Signalwege betrachtet.

## 2. Materialien

### 2.1 Geräteliste

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>	<b>Herkunft</b>
Bakterienbrutschrank	I	Memmert	Schwabach
Bakterienschüttler	minova 4330	New Brunswick Sc.	Nürtingen
CO2-Inkubator	FormaSeriesII HEPA	Thermo	Karlsruhe
Durchflusszytometer	FACSCanto	BD Biosciences	Heidelberg
Eismaschine	AF-20	SCOTSMAN	Sprockhövel
Feinwaage	BP110S	Sartorius	Göttingen
Feinwaage	MP300	Chyo / Kern	Balingen
Gefrierschrank (-20-30 °C)	Öko Super	Liebherr	Biberach an der Riss
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg
Heizblock	TCR100	Roth	Karlsruhe
Horizontalschwenker	KS125 basic	IKA Labortechnik	Staufen
Inkubationsrotator	54124	Heidolph	Schwabach
Kühlschrank (4-8 °C)	2 0003 1	Liebherr	Biberach an der Riss
Kühlschrank (4-8 °C)	Standard N	Kirsch	Offenburg
Magnetrührer	IKAMAG RET	IKA Labortechnik	Staufen
Mikroskop (Licht)	CK2, 4/10/20x	Olympus	Hamburg
Mikroskop (Fluoreszenz)	Axio Vert.A1	Zeiss	Jena
Photometer	Biophotometer	Eppendorf	Hamburg
Photometer-Küvette	UVette	Eppendorf	Hamburg
pH-Meter	pH11	HANNA Instruments	Kehl am Rhein
Pipette 0,5-10 µL	Research plus	Eppendorf	Hamburg
Pipette 2-20 µL	Research plus	Eppendorf	Hamburg
Pipette 10-100 µL	Research plus	Eppendorf	Hamburg
Pipette 100-1000 µL	Research plus	Eppendorf	Hamburg
Pipette Dispension	Multipette plus	Eppendorf	Hamburg
Pipette 8-Kanal	Transferpette S-8	BRAND	Wertheim
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann	Heilbronn
Pipettierhilfe	accu-jet pro	BRAND	Wertheim
Plattenphotometer	SUNRISE BASIC	Tecan	Crailsheim



<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>	<b>Herkunft</b>
Röntgenfilmentwicklungsgerät	Optimax	Protec Medizintechnik	Oberstenfeld
Rollenschüttler	SRT9	Stuart	Staffordshire
Scanner	Scanjet G3110	HP	Böblingen
SDS-PAGE-Apparatur	XCell Sure Lock	Invitrogen	Carlsbad
Sterilwerkbank	LaminAir HB2472	Heraeus	Hanau
Sterilwerkbank	LaminAir HB2448	Heraeus	Hanau
Stickstoff-Tiefkühler	CHRONOS ADUR-β	Messer	Gumpoldskirchen
Stromquelle	POWER-PAC 300	BIO-RAD	München
Taumelschüttler	Polymax 1040	Heidolph	Schwabach
Temperaturmessfühler	LT102	TFA / Hartenstein	Würzburg
Tiefkühleinheit (-80 °C)	Forma -86C ULT	Thermo	Karlsruhe
Vakuumpumpe	PM20405-86	VWR	Darmstadt
Vortexer	Genius 3	IKA Labortechnik	Staufen
Vortexer	MONO-MIXER	Sarstedt	Nümbrecht
Wasserbad	MOT	GFL / Hartenstein	Würzburg
Western Blot-Apparatur	XCell II Blot Module	Invitrogen	Carlsbad
Zellzählobjektträger	Neubauer improved	Hartenstein	Würzburg
Zentrifuge für 1,5-2,0 mL	Biofuge fresco	Heraeus	Hanau
Zentrifuge für 1,5-50 mL	Megafuge 1.0R	Heraeus	Hanau
Zentrifuge Klein	C1301	Labnet / Hartenstein	Würzburg
Zentrifuge Ultra	OPTIMA-L70	Beckman Coulter	Krefeld

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Artikel</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>	<b>Ort</b>
Cryoröhrchen	1,8 mL	Sarstedt	Nümbrecht
Dispensionsspitzen	1 mL, 2,5 mL, 5 mL	Eppendorf	Hamburg
FACS-Röhrchen	1 mL	Hartenstein	Würzburg
Filterpapier	0,76 mm	Hartenstein	Würzburg
Gelladespitzen	300 µL	Hartenstein	Würzburg
Insulinspritzen	1 mL	Braun	Melsungen

<b>Artikel</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>	<b>Ort</b>
Multivertiefungsplatten	6, 12, 24, 48, 96 wells	Greiner	Frickenhausen
Nitrozellulosemembran	0,45 µm	GE Healthcare	Solingen
Pasteurpipetten	24 cm	Sarstedt	Nümbrecht
Pipettierspitzen	10 µL, 200 µL, 1000 µL	Sarstedt	Nümbrecht
Pre-Cast Fertiggele	4-12 %; 10-,15-,17wells	life tech.	Darmstadt
Reagiergefäße	0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL	Sarstedt	Nümbrecht
Reagiergefäße	15 mL, 50 mL	Greiner	Frickenhausen
Röntgenfilme	Fujifilm RX Super 18x24	Hartenstein	Würzburg
Sterilfilter	Minisart 0,2 / 0,45 µm	Hartenstein	Würzburg
Sterilpipetten	1 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL	Greiner	Frickenhausen
Verschlussfolie	Parafilm M	Hartenstein	Würzburg
Zelkulturflaschen	mit Filter, 25-175 cm <sup>2</sup>	Greiner	Frickenhausen
Zellkulturschalen	35 mm, 145 mm	Greiner	Frickenhausen
Zellkulturschalen	60 mm, 100 mm	BD Biosciences	Heidelberg
Zellschaber	20 mm	Hartenstein	Würzburg

### 2.3 Chemikalien, Zytokine, Inhibitoren

<b>Agens</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Herkunft</b>
Azeton zur Analyse	Baker	Griesheim
BV-6 SMAC mimetic	AG Wajant	Würzburg
CD95L-FLAG-Fc	AG Wajant	Würzburg
Complete-Proteinaseinhibitor	Roche	Mannheim
Cycloheximid	Sigma	Steinheim
DMSO	Sigma	Steinheim
ECL-Western Blot-Substrat	Thermo	Rockford
EDTA Dihydrat	Roth	Karlsruhe
Enbrel	Wyeth	Münster
Essigsäure glazial	Roth	Karlsruhe
Ethanol zur Analyse	Sigma	Steinheim
Brilliant Blau R250	Roth	Karlsruhe
Glyzerol	Merck	Darmstadt

<b>Agens</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Herkunft</b>
Humira	Abbott	Kent
Kaliumchlorid	Merck	Darmstadt
KillerTRAIL	Enzo	Lörrach
Kristallviolett	Roth	Karlsruhe
Lipofectamine 2000	Invitrogen	Carlsbad
b-Mercaptoethanol (98 %)	Sigma	Steinheim
MES Hydrat (> 95 %)	Sigma	Steinheim
Methanol zur Analyse	Sigma	Steinheim
Milchpulver, blotting grade	Roth	Karlsruhe
Molekulargewichtsstandard	life tech.	Darmstadt
Natriumazid	Merck	Darmstadt
Natriumazetat zur Analyse	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid zur Analyse	Merck	Darmstadt
NaOH (1 N)	Merck	Darmstadt
Necrostatin-1	Enzo	Lörrach
Necrosulfonamide	Calbiochem	Darmstadt
Oligofectin	Invitrogen	Carlsbad
Phosphataseinhibitor 1+2	Sigma	Steinheim
2-Propanol	Appllichem	Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma	Steinheim
Protein G-Agarose	Roche	Mannheim
Ponceau S	Roth	Karlsruhe
RNAiMAX zur Transfektion	Invitrogen	Carlsbad
Röntgenentwicklerflüssigkeit	Calbe Chemie	Calbe
Röntgenfixierflüssigkeit	Calbe Chemie	Calbe
Salzsäure zur Analyse	Merck	Darmstadt
SDS, ultra pure	Roth	Karlsruhe
Stripping Buffer	Thermo	Rockford
TPCA-1	AG Wajant	Würzburg
TRIS, blotting grade	Roth	Karlsruhe
Transferpuffer (20x)	Invitrogen	Carlsbad
TRITON-X100	Sigma	Steinheim

<b>Agens</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Herkunft</b>
Trypanblau	Sigma	Steinheim
Turbofectin	Thermo	Rockford
Tweak-FLAG-Fc	AG Wajant	Würzburg
Tweak-Fc	AG Wajant	Würzburg
Tween 20	Millipore	Darmstadt
Zeocin	Invitrogen	Carlsbad
zVAD-fmk	Bachem	Heidelberg

## 2.4 Antikörper

### 2.4.1 Reagenzien zur Immundetektion (FACS-Antikörper)

<b>Antigen / Substanz</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>(v/v)</b>
anti Human IgG	IgG	Ziege	Dianova	109-005-003	---
Maus IgG (Biotin)	IgG	Ratte	eBioscience	13-4013	1:50
Fn14 (CD266) ITEM-4	IgG2b	Maus	eBioscience	12-9018-82	1:100
Kontroll-Ak	IgG1	Maus	Dako	X0931	1:100
Kontroll-Ak	IgG2b	Maus	R&D Systems	IC0041P	1:100
Streptavidin/RPE	---	---	Dako	R0438	1:100
TRAIL-Rezeptor 1	IgG1	Maus	Alexis	ALX-804-297A	1:100
TRAIL-Rezeptor 2	IgG1	Maus	Alexis	ALX-804-298A	1:100
TRAIL-Rezeptor 3	IgG1	Maus	Alexis	ALX-804-344A	1:100
TRAIL-Rezeptor 4	IgG1	Maus	Alexis	ALX-804-299A	1:100

### 2.4.2 Primärantikörper für den Immunoblot

Antigen (Klon)	Isotyp	Spezies	Hersteller	Artikelnummer	WB (v/v)
a-Tubulin	IgG1	Maus	Millipore	05-829	1:3000
Caspase 3	IgG	Kaninchen	Cell Signaling	#9662	1:3000
Caspase 8	IgG2b	Maus	Alexis	8011-1129-C100	1:3000
Caspase 8 p18	IgG	Ziege	Santa Cruz	sc-6134	1:1000
c-IAP1 (D5G9)	IgG	Kaninchen	Cell Signaling	#7065	1:1000
c-IAP2 (58C7)	IgG	Kaninchen	Cell Signaling	#3130	1:1000
CUL3	IgG1	Maus	BD	611848	1:2000
ERK	IgG	Kaninchen	Santa Cruz	sc-154	1:5000
FADD	IgG	Kaninchen	Santa Cruz	sc-5559	1:500
FlagM2	IgG1	Maus	Sigma	F3165	1:1000
Flip (NF6)	IgG1	Maus	Enzo	ALX-804-428-C100	1:500
MLKL	IgG	Kaninchen	Sigma	M6697	1:1000
NF $\kappa$ Ba	IgG 2a	Maus	Millipore	5361	1:1000
NIK	IgG	Kaninchen	Cell Signaling	#4994	1:1000
PARP	IgG1	Maus	BD	556494	1:1000
RIP1	IgG2a	Maus	BD	610459	1:333
RIP3	IgG	Kaninchen	Imgenex	IMG-5846A	1:1000
TRAF2	IgG	Kaninchen	Abcam	ab126758	1:1000

### 2.4.3 Sekundärantikörper

Spezifität	Spezies	Hersteller	Artikelnummer	WB (v/v)
anti Huhn IgG	Esel	Abcam	ab16349	1:2000
anti Kaninchen IgG	Esel	Southern Biotech	6440-5	1:2000
anti Maus IgG	Ziege	Southern Biotech	1030-05	1:2000
anti Maus IgG1	Ziege	Southern Biotech	1070-05	1:2000
anti Maus IgG2a	Ziege	Southern Biotech	1080-05	1:2000
anti Maus IgG2b	Ziege	Southern Biotech	1090-05	1:3000

Alle Sekundärantikörper waren gekoppelt mit einer Meerrettichperoxidase.

## 2.5 Zellkulturmedien

Im Rahmen der Arbeit wurde in der Zellkultur mit folgenden sterilen Medien und Puffern gearbeitet:

Produkt	Produktnummer	Hersteller	Herkunft
RPMI-1640	R8758	Sigma-Aldrich	Steinheim
DMEM	D5796	Sigma-Aldrich	Steinheim
FCS	A15-151	PAA	Pasching
OptiMEM I	31985070	Gibco (life tech.)	Darmstadt
PBS (1x)	H15-001	PAA	Pasching
Trypsin/EDTA (10x)	L11-003	PAA	Pasching

## 2.6 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Merkmal	Ursprung	Herkunft
HaCaT	parental	human; Keratinozyten	Laborbestand
HeLa	parental	human; Zervixkarzinomisolat	AG Wajant
HeLa	pcf65	human; Leervektorkontrolle	AG Leverkusen
HeLa	pcf65-RIP3	human; RIP3-Überexpression	AG Leverkusen
SK-OV-3	parental	Human; Ovarialkarzinomisolat	AG Wajant
HT29	parental	human; Colorektaladenokarzinomisolat	AG Wajant

## 2.7 siRNA-Oligos zum transienten Knockdown von Proteinen

In dieser Arbeit wurden ausschließlich kommerziell erwerbbar siRNAs der Firma Qiagen (Hilden) verwendet.

### 2.7.1 TRAF2 siRNAs

Name	Sequenz	Produktnummer
HS-TRAF2_4	5'-GGACCAAGACAAGAUUGAATT-3'	SI00129619
HS-TRAF2_5	5'-CGAGGGCAUAUAUGAAGAATT-3'	SI02644579
HS-TRAF2_6	5'-GUUCGGCCUCCCCAGAUAAATT-3'	SI03073455
HS TRAF2_7	5'-GCUGCGGAGCAGACGUGAATT-3'	SI03096009

### 2.7.2 Negativkontroll-siRNAs

Name	Produktnummer
AllStars Negative Control siRNA	SI03650318
Negative Control siRNA	1027310

## 2.8 DNA-Vektoren zur Proteinexpression

Name	Herkunft
peGFP-N1-TRAF2	AG Wajant; Würzburg

## 2.9 Puffer und Lösungen

Coomassie-Färbelösung		
	50 % (v/v)	Ethanol
	40 % (v/v)	dH <sub>2</sub> O
	10 % (v/v)	Eisessig
	0,05 % (w/v)	Brilliant Blau R250
Kristallviolettlösung		
	20 % (v/v)	Methanol
	0,5 % (w/v)	Kristallviolett
4x Lämmli-Puffer		
	8 % (w/v)	SDS
	10 %	β-Merkaptoethanol
	40 %	Glycerol
	0,2 M	Tris
	0,04 %	Bromphenolblau
Laufpuffer (SDS-PAGE)		
	50 mM	MES
	50 mM	Tris Base
	0,1 %	SDS
	1 mM	EDTA
	pH 7.3	
Transferpuffer (Western Blot)		
	50 mL	Transferpuffer (20x)
	200 mL	Methanol
	1 mL	Antioxidant
	ad 1 L	dH <sub>2</sub> O
PBS		
	0,02 M	Natriumphosphat
	0,7 % (w/v)	NaCl
	pH7,2	



PBS-Tween	1x 0,05 % (v/v)	PBS Tween-20
5 % Milch in PBS-Tween	1x 0,05 % (v/v) 5 % (w/v)	PBS Tween-20 Magermilchpulver
TBS	0,02 M 8 % (w/v) pH7,6	Tris NaCl
TBS-Tween	1x 0,1 % (v/v)	TBS Tween-20
5 % Milch in TBS-Tween	1x 0,1 % (v/v) 5 % (w/v)	TBS Tween-20 Magermilchpulver
Triton X-100 Lysispuffer	0,03 M 1 % (v/v) 10 % 0,12 M pH7,5	Tris-HCl Triton X-100 Glycerol NaCl

### 3. Methoden

#### 3.1 Zellkultur

Die Kultur eukaryotischer Zellen erfolgte stets in dafür vorgesehenen Zellkulturflaschen bzw. Petrischalen im speziellen Zellkulturinkubator bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid. Alle Manipulationen, z.B. Splitten der Zellen, Transfektion, Stimulierung mit Inhibitoren bzw. Liganden, geschah unter sterilen Bedingungen in Sterilwerkbänken. Alle Materialien wurden vorher durch Autoklavierung sterilisiert oder steril von Firmen bezogen. Werkbänke und Inkubatoren wurden regelmäßig gereinigt und desinfiziert. Gearbeitet wurde mit Kittel und semisterilen, desinfizierten Latex- oder Nitrilhandschuhen für den einmaligen Gebrauch.

##### 3.1.1 HaCaT-Keratinocyten

Human adult high  $\text{Ca}^{2+}$  high temperature-Keratinocyten (HaCaT) sind eine spontan immortalisierte Keratinocytenlinie, die erstmals 1988 von Boukamp et al. beschrieben wurde und standardisiert als Keratinocytenmodell verwendet wird. HaCaT-Zellen wachsen in DMEM-Medium mit 10 % FCS und können alle 7-10 Tage 1:10 gesplittet werden, sofern ein konfluenter Zellrasen vorliegt. HaCaT bilden eine starke extrazelluläre Matrix aus. Zum Splitten der Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen und verworfen, dann mit PBS der Zellrasen durch Auf- und Niederpipettieren in der Zellkulturflasche gewaschen. Anschließend folgte zum Lösen der Zell-Zell-Kontakte eine zehnmündige Inkubation mit 2 mM EDTA in PBS (5 mL bei einer T75-Flasche) im Inkubator, was zur Desintegration des Zellrasens führte, da die beteiligten Integrine ohne Kalziumionen in ihrer Funktion gestört sind. Nach Verwerfen des EDTA-PBS wurden die Zellen für 5-10 min. mit Trypsin-EDTA erneut inkubiert (3 mL für eine T75-Flasche). Es kam zur Vereinzelung der Zellen und zu ihrer Ablösung von der Kulturflaschen- bzw. Petrischalenoberfläche, was durch zusätzliches Klopfen unterstützt werden konnte. Die erhaltene Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und dabei mit 10 % FCS-DMEM versetzt, sodass die Aktivität des Trypsins gestoppt wird. Es folgte die Pelletierung der Zellen in der Zentrifuge bei 1300 rpm für 5 min. bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen mit

frischem Medium (DMEM mit 10 % FCS) erneut resuspendiert. Für die fortlaufende Kultur wurden 10 % des Gesamtvolumens in eine neue Kulturflasche bzw. –schale überführt und durch frisches Medium auf erneut 100 % des anfänglichen Kulturmediumvolumens ergänzt. Die übrigen 90 % der Zellen wurden entweder verworfen oder für Experimente eingesetzt.

### **3.1.2 Kultur weiterer Zelllinien**

Die weiteren verwendeten Zelllinien wurden sehr ähnlich behandelt wie für HaCaT-Keratinocyten oben beschrieben worden ist. Allerdings entfällt bei ihnen allen die Inkubation mit EDTA-haltigem PBS. Je nach Zelllinie erfolgte die Kultivierung entweder mit DMEM oder RPMI-1640, jeweils zugesetzt mit 10 % FCS. Besonders schnell wachsende Zelllinien (HeLa) wurden abweichend von 3.1.1 jedoch alle 3 Tage gesplittet, zum Teil dann auch 1:20, sodass also alle drei Tage jeweils nur 5 % der Zellen wieder für eine neue Flasche verwendet wurden.

### **3.1.3 Bestimmung der Zellzahl durch Neubauer-Mikroskopie**

Von abgelösten, zentrifugierten und resuspendierten Zellpellets muss, sofern sie für Versuche exakt eingesetzt werden müssen bzw. zum Zwecke der Kryokonservierung, ihre genaue Anzahl bestimmt werden. Dafür wurde die Neubauer-Zählkammer genutzt. Hierbei wird ein definiertes Volumen (10  $\mu$ L) auf eine definierte Fläche gegeben, die in Quadranten aufgeteilt ist. Einzelne Quadranten sind in jeweils 16 Quadrate aufgeteilt. Durch Zählen per Mikroskop der über diesen Quadranten liegenden, vereinzelter Zellen und Multiplikation mit dem Kammerfaktor (10.000) erhält man die Zellzahl pro Milliliter. Die eingebrachte Zellsuspension kann z.B. auch 1 Teil zu 3 Teilen mit PBS-Trypanblau verdünnt werden, wodurch es möglich ist, beim folgenden Zählen zwischen lebenden Zellen (transluzierend) und dunkel verfärbten, Trypanblau-positiven und damit toten Zellen zu differenzieren. Letzteres ist vor allem beim Vergleich mehrerer Zelllinien im Versuch sinnvoll.

### 3.2 Kryokonservierung und Revitalisierung eukaryotischer Zellen

Für die Kryokonservierung wurden Zellen wie unter Punkt 3.1.1 und 3.1.2 von ihrer Wachstumsunterlage abgelöst, zentrifugiert, resuspendiert, gezählt und dann nach erneutem Dekantieren mit sog. Einfriermedium versetzt. Dieses bestand aus 10 % DMSO und 90 % FCS. Die verwendeten Kryoröhrchen haben ein Volumen von max. 1,8 mL und wurden mit 1-1,5 mL Zellsuspension beschickt. Grundsätzlich wurden  $1-2 \times 10^6$  Zellen pro Röhrchen eingefroren. Zunächst erfolgte ihre Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Nacht und dann die Verbringung in den Kryokonservator, wo sie bei  $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff dauerhaft konserviert wurden. Die Wiederverwendung der Zellen erfolgte durch zügiges Auftauen der Zellen und Resuspendierung in Zellkulturmedium. Nach Entnahme aus dem Kryokonservator wurden die einzelnen Kryoröhrchen steril geöffnet und ihr Inhalt mit vorgewärmtem Zellkulturmedium (DMEM / RPMI-1640 plus 10 % FCS) unter Auf- und Niederpipettieren mit der 1000  $\mu\text{L}$ -Pipette versetzt, in ein Zentrifugenröhrchen (15 mL) mit insgesamt 10 mL Medium überführt und anschließend abzentrifugiert (1300 rpm, 5 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Dann wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

### 3.3 Zelladhäsionsassay

Für die Analyse Liganden-, Inhibitor- oder Knockdown-spezifischer Effekte auf die Viabilität der verwendeten Zelllinien wurde ein sogenannter Zelladhäsionsassay durchgeführt. Dabei wurden 10.000 Zellen pro Vertiefung in eine 96well-Platte eingesetzt und über Nacht inkubiert bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5 % Kohlendioxid. Nach 16-20 h (je nach Dichte der Zellen und etwaiger Vorinkubation mit Inhibitoren) erfolgte nach vorherigem Absaugen des Überstands von den Zellen die Zugabe des Todesliganden. Letzterer war vorab in Reaktionsgefäßen in definierten Schritten in Zellkulturmedium titriert worden. Die Zellen wurden in einem Volumen von 100  $\mu\text{L}$  pro Vertiefung nochmals 16 h inkubiert ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ) und anschließend angefärbt. Für die Anfärbung kann unsteril gearbeitet werden. Die verwendeten 96well-Platten werden in Wasser ausgewaschen, wodurch auch alle toten, nicht mehr adhärenen Zellen aus den Vertiefungen entfernt wurden und nur bis dahin

vitale Zellen erhalten blieben. Diese wurden nun mit einer Mehrkanalpipette mit 50  $\mu\text{L}$ /well Kristallviolettlösung (0,5 g in 20 % Methanol) für 30 min auf dem Taumelschüttler gefärbt, anschließend im Wasserbad entfärbt, auf Papier ausgeklopft und an der Luft getrocknet. Trockene Platten sind langfristig lagerungsfähig. Zur Analyse wurden die gefärbten und getrockneten Platten mit 100 % Methanol (100  $\mu\text{L}$ /well) überschichtet, für 15 min auf dem Taumelschüttler mit Deckel inkubiert und das gelöste KV dann im Plattenphotometer (Tecan ELISA Reader) bei einer optischen Dichte  $\text{OD}=570\text{ nm}$  gemessen.

### 3.4 Statistische Analysen

Die Zelladhäsionsassays wurden mit Excel ausgewertet. Von jedem gemessenen Wert wurde zunächst der vorhandene methodische Hintergrund der Kristallviolettfärbung (Mittelwert von sechs Einzelmessungen in Vertiefungen ohne Zellen) abgezogen oder es wurde eine „0 % lebende Zellen-Bestimmung“ durchgeführt durch Inkubation eines Triplikats mit einer Mischung aus Fc-CD95L und TRAIL (jeweils 1000 ng/mL), deren  $\text{OD}_{570\text{nm}}$ -Wert dann von den anderen Werten abgezogen wurde. Die so um den Hintergrund reduzierten Einzelwerte wurden mit dem Mittelwert der unbehandelten Zellen der betreffenden Zelllinie (bei Vergleich verschiedener ektopischer Proteinexpression) bzw. Transfektionsreihe (bei Vergleich von Kontroll-si- mit TRAF2-siRNA) bzw. Inkubationsreihe (z.B. bei Vergleich +/- Fc-TWEAK) prozentual in Beziehung gesetzt wobei also gilt: Wert unbehandelter Zellen entspricht 100 %. Dies geschah mit allen Werten und die erhaltenen Prozentangaben jedes Triplikats wurden gemittelt, ihre Standardabweichung berechnet und durch Bildung einer Titrationskurve ihre Mittelwerte mit Standardabweichung in Beziehung gesetzt bzw. bei Einzelwerten wurde eine Säulendiagrammdarstellung gewählt. Formel zur Berechnung eines Prozentwerts von Einzelwert „n“:

$$[\text{OD}_{570\text{ nm}}(n) / \text{MW OD}_{570\text{ nm}}(\text{Null-Inkubation})] \times 100 = \text{Einzelwert in Prozent von } (n)$$

Abweichend von dieser Methode wurde im Versuch zur Bestimmung der Aktivität des MLKL-Inhibitors Necrosulfonamide auf Umrechnung in Prozentwerte verzichtet und eine einfache „Fold“-Darstellung gewählt, bei der die Nullwerte ohne

Necrosulfonamide gleich 1 gesetzt werden und die folgenden Titrationsstufen das X-Fache (gegebenenfalls ein Vielfaches) darstellen. Dementsprechend gilt hier:

$$[\text{OD}_{570 \text{ nm}}(n) / \text{MW OD}_{570 \text{ nm}}(\text{Null-Inkubation})] = \text{Vielfachwert}(n).$$

Zur Überprüfung, ob sich zwischen einzelnen Gruppen die Mittelwerte signifikant von einander unterscheiden, wurde mittels GraphPad QuickCalcs Software™ ein ungepaarter Student's t-Test durchgeführt. Als Signifikanzniveaus werden angenommen:  $P < 0,05$  = signifikant (\*),  $P < 0,01$  = hochsignifikant (\*\*) und  $P < 0,001$  = höchstsignifikant (\*\*\*) und über den betreffenden Mittelwerten mit Angabe des P-Wertes entsprechend indiziert. Wo sich keine signifikanten Unterschiede ergaben, wird auf die Angabe des P-Wertes verzichtet.

### 3.5 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Zur transienten Transfektion von eukaryotischen Zellen mit siRNAs wurde nach den Vorgaben des Herstellers des jeweiligen Transfektionsreagens gehandelt. Als Transfektionsreagens diente vor allem Lipofectamine 2000. Für dieses kam folgendes Protokoll zur Anwendung:

Tabelle 1. Bedingungen und Reaktanden bei der Transfektion von siRNAs.

Format	Zellzahl	siRNA	Lipofectamine	OptiMEM	Gesamtvolumen
6-Well-Platte	$2 \times 10^5$ Zellen	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	2 mL
p35 Schale	$2 \times 10^5$ Zellen	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	2 mL
p60 Schale	$5 \times 10^5$ Zellen	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	3 mL
p100 Schale	$1 \times 10^6$ Zellen	30 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$	1,5 mL	6 mL

Die zu transfizierenden Zellen wurden einen Tag vorher wie in Tabelle 1 angegeben in eine geeignete Zellkulturschale eingesät. Am Tag der Transfektion erfolgte zunächst die Herstellung eines Transfektionsmixes, bestehend aus dem Transfektionsmedium OptiMEM sowie dem Transfektionsreagens und der zu applizierenden siRNA. Dabei wurde pro siRNA das erforderliche Volumen an OptiMEM vorgelegt und auch das gleiche Volumen OptiMEM für das Lipofectamine. Beide Ansätze wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann vereinigt und nochmals für 25 min inkubiert. In der Zwischenzeit wurde bei den zu transfizierenden

Zellen das Medium gewechselt und nur soviel neues DMEM bzw. RPMI-1640 plus 10 % FCS vorgelegt, wie die Differenz aus dem Gesamtvolumen und der Summe beider OptiMEM-Ansätze (Lipofectamine-Ansatz plus siRNA-Ansatz) betrug. Zum Beispiel galt für eine p100-Schale:

$$\begin{array}{r} 1,5 \text{ mL OptiMEM} + 30 \text{ } \mu\text{L Lipofectamine} \\ 1,5 \text{ mL OptiMEM} + 30 \text{ } \mu\text{L siRNA} \\ \hline = 3,06 \text{ mL Transfektionsmix} \end{array}$$

Während dieser Transfektionsmix inkubierte, wurden 3 mL DMEM bzw. RPMI in der Zellkulturschale vorgelegt. Nach 25 min Inkubation wurde der Transfektionsmix vorsichtig unter sterilen Bedingungen mit einer 1000  $\mu$ L-Pipette auf die Zellen mit dem frischen Medium getropft. Es folgte die Inkubation über Nacht. Am nächsten Tag erfolgte das Einsäen für den vorgesehenen Versuch, so dass im Endeffekt an Tag 2 nach der Transfektion der Zellen das eigentliche Experiment begann. Erfahrungsgemäß konnten an Tag 2-5 nach Transfektion gute Knockdownraten erzielt werden.

### 3.6 Herstellung denaturierter Zelllysate

Im Rahmen der Arbeit wurden Zelllysate auf zwei unterschiedliche Arten hergestellt. Zum einen Vollzelllysate durch Aufschluss der Zellen mittels Lämmli-Puffers (4x SDS-Puffer) und zum anderen Lysate mit Triton X100 zur verhältnismäßig milderen Lysis, die erst nach Abzentrifugieren unlöslicher Bestandteile mit Lämmli-Puffer versetzt wurden. Bei beiden Verfahren wurden ca. 500.000 Zellen durch Abschaben oder Abtrypsinierung (wie unter Punkt 3.1.1 beschrieben) geerntet, zentrifugiert, dekantiert, in PBS resuspendiert, wieder zentrifugiert, dekantiert und abschließend im jeweiligen Lysispuffer resuspendiert.

#### 3.6.1 Volllysatherstellung mittels 4x SDS-Puffer

Zum oben erhaltenen gewaschenen Zellpellet wurden 100  $\mu$ L 4x SDS-Puffer hinzupipettiert. Im Falle auftretender Fäden und schlechter Pipettierbarkeit des Lysats konnte auch noch 1  $\mu$ L Benzonase zugesetzt werden, welche die im Pellet

enthaltenen Nukleinsäuren spaltete und somit die Viskosität der Probe minimierte. Die so hergestellte Probe wurde für 15 min auf Eis inkubiert, anschließend für 5 min im Thermoblock bei 95 °C erhitzt, dann 15 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert und schließlich bei -20 °C gelagert oder sofort für eine Gelelektrophorese verwendet.

### **3.6.2 Isolierung der Triton X100-solublen Fraktion**

Für eine Lysis mit Triton X100 wurden die gewaschenen Zellpellets in 100 µL Triton X100 („DISC“-Puffer resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert, 15 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert und dann wurde ausschließlich der Überstand, ca. 75 µL, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 25 µL 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C im Thermoblock erhitzt, während das bei der Zentrifugation erhaltene Pellet verworfen wurde. Im Unterschied zum unter 3.6.1 erhaltenen Gesamtzellysate wurde hier ausschließlich die Triton X100-lösliche Proteinfraction weiterverwendet. Zur Lagerung wurden die Proben ebenfalls bei -20°C verstaut.

### **3.6.3 Protease- und Phosphatase-Inhibition**

Da sowohl Proteolyse als auch Dephosphorylierung die Detektion bestimmter Konformationen und Modifikationen der hier behandelten Proteine beeinflussen konnten, wurden den verwendeten Lysispuffern geeignete Inhibitoren zugesetzt. Als Proteaseinhibitor wurden Roche Complete™ Mini Tabletten verwendet. Auf 12,5 mL Puffer kam dabei eine Tablette, die im Puffer aufgelöst wird. Zur Vermeidung etwaiger Dephosphorylierung wurden Phosphataseinhibitorcocktail 1+2 von Sigma jeweils 1:100 (v/v) appliziert.

## **3.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen**

Die oben hergestellten Proben konnten im auf Eis aufgetauten Zustand und nach erneutem Zentrifugieren (1 min bei 13.000 rpm und 4 °C) für eine Gelelektrophorese verwendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Elektrophoresen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, wo also durch Zugabe von SDS in Laufpuffer und Ladepuffer die Proteine nicht in ihrer nativen dreidimensionalen



Konformation vorliegen, sondern entfaltet als lineare Aminosäureketten, an welche in einem zur Länge der Kette konstanten Verhältnis Dodezylsulfate angelagert werden, was letztlich in der Elektrophorese dazu führt, dass das so entstandene Polyanion zur positiven Anode migriert und seine Ladung relativ zu seiner Größe ist. Außerdem stellt das verwendete Gel als Polyakrylamid-Polymer eine physikalische Matrix dar, was zusätzlich dazu führt, dass größere Proteine langsamer zur Anode wandern können als kleinere. Als Gele wurden in der Arbeit Fertiggele der Firma life technologies verwendet, deren Matrix nicht konstant dicht war, sondern die einen Gradienten in der Akrylamidkonzentration aufwiesen von 4-12 % in Richtung der Anode. Pro Tasche wurde in Abhängigkeit von der Proteinmenge, die man analysieren wollte und der Abundanz des relevanten Zielproteins, ein Volumen von 5 bis 15  $\mu\text{L}$  geladen. Für die meisten hier behandelten Proteine wurde standardisiert verfahren und ein Volumen von 5  $\mu\text{L}$  aus den wie unter 3.6.1 und 3.6.2 generierten Proben appliziert, was laut photometrischer Messung bzw. BSA-Eichreihe im Coomassiegel einer Proteinmenge von 2,5  $\mu\text{g}$  pro Tasche entsprach. Als Größenstandard wurde der See Blue™ Plus 2 Prestained Protein Ladder von life technologies verwendet. Dieser deckt unter MES-Laufpuffer-Bedingungen ein Größenspektrum zwischen 3 und 188 Kilodalton (kD) ab. Die Gelelektrophorese an sich erfolgte unter standardisierten Bedingungen: maximal 400 mA, Spannung konstant bei anfangs 90 V (5 min) und anschließend 160 V für weitere 60 bis 90 min in Abhängigkeit von der Größe des anschließend im Immunoblot zu detektierenden Proteins. Für die Elektrophorese wurde die XCell Sure Lock-PAGE-Aparatur von Invitrogen verwendet.

## **3.8 Analyse elektrophoretisch aufgetrennter Proteine**

### **3.8.1 Coomassiefärbung**

Zum optischen Ladungsvergleich z.B. bei einer Überexpression können Gele nach der Elektrophorese durch das Coomassieverfahren angefärbt werden. Dafür wurden aus ihren Rahmen herausgenommene Gele über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler in Coomassiefärbelösung inkubiert und am nächsten Tag für weitere 24h mit destilliertem Wasser gewaschen.

### **3.8.2 Western Blot**

Möchte man spezifisch etwaige Proteine immunologisch anfärben, müssen die Proteine vom Gel auf eine Membran übertragen werden, was durch einen elektrischen Transfer bewerkstelligt wird. Dazu wurde in dieser Arbeit das XCell II Blot Module von Invitrogen verwendet und komplett nach dessen Gebrauchsanweisung verfahren. Es wurde auf Nitrozellulosemembrane (45 µm Porenweite) von GE Healthcare geblottet und Gel und Membran wurden dabei von Whatman-Papier (Hartenstein) umgeben. Der Transfer fand in geeignetem Puffer desselben Herstellers statt und wurde für eine Stunde bei 30 V und maximal 400 mA durchgeführt.

### **3.8.3 Ponceau S-Färbung**

Im Anschluss an den Transfer konnte dessen Güte kontrolliert werden durch reversible Anfärbung der auf die Membran geblotteten Proteine mittels Ponceau S-Lösung. Die Entfärbung fand durch Auswaschen mit destilliertem Wasser statt und abschließend mittels PBS-T oder TBS-T.

### **3.8.4 Immundetektion**

Vor der Anfärbung mit spezifischen Antikörpern mussten unspezifische Bindungsstellen gesättigt werden. Dies geschah mittels 5 %-Magermilch-Lösung in PBS-T oder TBS-T. Bei einigen Antikörpern konnte zusätzlich eine Vorabinkubation für 5 min mit Stripping Buffer hilfreich bei der Vermeidung unspezifischer Bindungen bei der Immundetektion sein, wonach der Stripping Buffer aber auch noch 3x mit TBS-T oder PBS-T wegzuwaschen war, bevor die Magermilchlösung appliziert wurde, da diese sonst ausflockte. Die Blockierung geschah für 1 h bei RT auf dem Taumelschüttler. Nach anschließendem dreimaligem Waschen in PBS-T oder TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper über Nacht bei 4 °C auf dem Taumelschüttler. Antikörperverdünnung und Lösungsmittel sind firmen- und antikörperspezifisch. Für viele galt jedoch: 5 % Magermilchpulver in PBS-T. Am

nächsten Tag wurde 3x für 10 min in PBS-T oder TBS-T gewaschen und dann der Sekundärantikörper für eine Stunde mit der Membran auf dem Taumelschüttler bei RT inkubiert, wobei Verdünnung und Anteil des Magermilchpulvers wiederum individuell ausgetestet werden musste. Zumeist wurde eine 2,5 %-Magermilchpulverlösung in PBS-T eingesetzt. Nach der Inkubation erfolgte wiederum 3x 10 min Waschen der Membran mit PBS-T oder TBS-T. Im Anschluss daran stand die Photodetektion. In dieser Arbeit wurden ausschließlich mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper für den Western Blot verwendet. Diese waren jeweils spezifisch für die Spezies des Primärantikörpers oder aber auch für einzelne Subklassen. Die gekoppelte Peroxidase setzte das 1:1-Gemisch von *Enhancer* und Chemilumineszenzsubstrat der ECL-Lösung (Thermo Scientific) um, wobei Licht emittiert wurde, welches auf Röntgenfilm eine Schwärzung bewirkte. Somit konnte indirekt auf das im Zelllysate vorhandene, vom Primärantikörper markierte und vom Sekundärantikörper:HRP-Konjugat sichtbar gemachte Protein und dessen Abundanz, Prozessierungszustand im Moment der Zellyse und eventuelle Bindungspartner (bei Immunpräzipitationen) rückgeschlossen werden.

### 3.9 Immunpräzipitation

Zur Analyse von Caspase 8-haltigen Proteinkomplexen, die nach Ligation von Todesrezeptoren entstehen, wurden im Rahmen der Arbeit Immunpräzipitationen durchgeführt. Dazu wurden HaCaT-Keratinocyten in p145-Schalen eingesät und kultiviert, bis ein beinahe konfluenter Zellrasen vorhanden war (80-90 %). Der Zeitraum bis zur IP variierte stark in Abhängigkeit vom Wachstum der Zelllinie. Die Menge der Schalen richtete sich nach den gewünschten Zeitpunkten und den verschiedenen Transfektionsansätzen. Außerdem sollten allgemein gesprochen HaCaT-Keratinocyten aufgrund geringer Ausbeuten doppelte Ansätze haben, sprich pro Datenpunkt 2x p145, oder aber ein nur halb so großes finales Probenendvolumen, was die Anzahl möglicher Western Blots halbierte. Für die in dieser Arbeit gezeigten Daten wurden Zellen verwendet, die mit siRNAs zwei Tage zuvor transfiziert worden waren (Ansätze entsprechen dem Doppelten des in Tabelle 1 aufgeführten Satzes an siRNA, Lipofectamine und OptiMEM wie für eine p100-Schale). 1 h vor der Inkubation mit 1 µg/mL KillerTRAIL wurden alle p145-Schalen

zudem noch mit dem Pancaspaseinhibitor zVAD-fmk (40  $\mu\text{M}$ ) in neuem Medium (10 mL) versehen. Dann erfolgte die Inkubation mit KillerTRAIL für 5 h in den dafür vorgesehenen Schalen bzw. nur mit zVAD-fmk allein in den Kontrollschalen jedes Zeitpunkts bzw. Inkubations- oder Transfektionstyps. Nach insgesamt 6 h Inkubation bei 37 °C und 5 %CO<sub>2</sub> wurden die Zellen geerntet. Dafür wurde das Medium jedes Ansatzes in einem 50 mL-Röhrchen gesammelt, die Zellen wurden mit eiskaltem PBS überschichtet, mittels Zellschaber vom Boden der p145-Schalen abgeschabt und auch in die entsprechenden Röhrchen pipettiert. In der auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge mit Ausschwenkrotor werden die Röhrchen bei 2500 rpm für jeweils 5 min zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das entstandene Pellet wiederum mit eiskaltem PBS resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss ans dritte Dekantieren wurden die Zellpellets in jeweils 1,5 mL Triton X100-Puffer mit Proteaseinhibitor (siehe 3.6.3) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Lyse wurden die Proben jeweils in 2 mL-Reaktionsgefäßen überführt und für 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde weiterverwendet, das Pellet verworfen. Ca. 1400  $\mu\text{L}$  des Überstands wurden in 2,0 mL-Reagiergefäßen gesammelt. Es folgte 1 h Inkubation der Proben bei RT im Rolleninkubator mit 20  $\mu\text{L}$  Protein G-Agarose von Roche. Diese Vorreinigung fing unspezifisch ans Protein G bindende Proteine ein und gewährleistete weniger Hintergrund bei der später folgenden Immunpräzipitation. Vor allem RIP1/RIP3-Proteine hatten in Vorversuchen oft falsch positiv an Protein G-Agarose gebunden, unabhängig ob die Zellen mit KillerTRAIL inkubiert worden waren oder nicht. Durch die Vorreinigung („Precogning“) wurde das Problem minimiert. Die Proben wurden anschließend bei RT und 5000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand von den Protein G-Agarose-Kugeln getrennt. Letztere wurden verworfen. Aus den vorhandenen, vorgereinigten Proben wurde eine weitere Probe gemischt, sodass ein sog. Input-Mix entstand, der später für die Negativkontrolle in der Immunpräzipitation diente. Zum Beispiel wurden bei vier Proben von jeweils 1 mL Volumen je 0,2 mL abgenommen und zum Input-Mix hinzugefügt, sodass im Endeffekt 5 Proben á 800  $\mu\text{L}$  entstanden. Bei größeren Ausgangsvolumen entsprechend mehr Teilvolumen gemäß der Formeln:

---

$[Anzahl(Proben)] / [Anzahl(Proben)+1] \times Ausgangsvolumen = Probenendvolumen$

und :

$Ausgangsvolumen - Endvolumen = Anteil \text{ pro Probe für den Input-Mix.}$

Mittels photometrischer Konzentrationsbestimmung nach Bradford wurden die Proben durch Zugabe von Triton X100-Puffer zu den Proben mit höherer Anfangskonzentration auf dieselbe Konzentration eingestellt. Jeder Probe wurden nun 50 µL entnommen und mit 4x SDS-Laufpuffer vermischt und behandelt wie unter 3.6.1 beschrieben. Diese Ansätze stellten den späteren „Input“ dar, der darüber Auskunft gab, was an Proteinen überhaupt in die IP eingebracht worden war. Für die anschließende Immunpräzipitation wurden gleiche Volumina verwendet, sodass im Endeffekt gleich viel Gesamtprotein in jeder Probe für die IP zur Verfügung stand. In dieser Arbeit werden ausschließlich Immunpräzipitationen von Caspase 8 gezeigt. Dafür wurden 5 µg Antikörper pro 1000 µL vorgereinigter IP-Probe verwendet. Als Antikörper zum Einfangen von Caspase 8-Molekülen und komplexierter Proteine wurde ein Ziege-anti-human p18-Fragment-Caspase 8-Antikörper von Santa Cruz verwendet und als IP-Kontrollantikörper ein Antikörper selbiger Spezies von Dianova. Die Inkubation mit den Antikörpern fand über Nacht bei 4 °C im Reagiergefäßrotator statt. Am nächsten Tag wurden pro Probe je 40 µL Protein G-Agarose Beads hinzupipettiert und die Inkubation wurde für weitere 24 h fortgesetzt. Zur Ernte der Beads mit den daran gekoppelten Immunkomplexen am folgenden Tag wurden die Reagiergefäße in einer auf 4 °C vorgekühlten Tischzentrifuge jeweils 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Mittels Insulinspritzen wurde der Überstand abpipettiert und zunächst aufbewahrt. Die Beads wurden resuspendiert in Triton X100-Puffer und wiederum zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Zuletzt wurden die Beads in nur 80 µL Triton X100-Puffer resuspendiert und mit 80 µL 4x SDS-Probenpuffer vermischt. Dann erfolgte das Erhitzen der Proben für 15 min bei 80 °C im Heizblock. Im späteren SDS-PAGE wurden Inputproben und IP-Proben miteinander verglichen. Dabei gilt es zu beachten, dass im Input wahrscheinlich mehr Protein vorhanden war als bei einer IP-Probe. Daher wurden 5 µL Inputprobe und 15 µL IP-Probe aufs Gel aufgetragen.

### **3.10 Durchflusszytometrie**

Für durchflusszytometrische Analysen wurde an einem FACSCanto der Firma BD gearbeitet. Zur immunologischen oder chemischen Färbung von Zellen wurden hierfür mindestens 50.000 Zellen gebraucht. In der Regel wurden aber mehr verwendet und vor der Messung in 6well-Schalen kultiviert.

#### **3.10.1 Kontrolle der GFP-Expression per FACS**

Zur Kontrolle, ob GFP-tragende Proteinexpressionsvektoren in transfizierten Zellen aktiv bzw. vorhanden waren, wurde die GFP-Expression neben der Möglichkeit einer optischen Kontrolle am Fluoreszenzmikroskop quantitativ am FACS bestimmt. Dafür wurden 100.000 Zellen aus ihrer 6well-Vertiefung abgelöst (wie unter 3.1.1 bzw. 3.1.2) und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 200 µL PBS resuspendiert und am FACS im FITC-Kanal gemessen, nachdem vorher im Vorwärts/Seitwärts-Plot zur Ausgrenzung des Debris ein Gate gesetzt worden war und also nur intakte Zellen berücksichtigt wurden. Letztlich wurden untransfizierte, GFP-negative Zellen mit den GFP-positiven Zellen verglichen und damit wurde die Menge der das jeweilige Protein exprimierenden Zellen ermittelt.

#### **3.10.2 Lebend/Tot-Differenzierung per Propidiumiodid**

Nach einem Zytotoxizitätsassay besteht die Möglichkeit, den Anteil abgetöteter Zellen durch Propidiumiodid zu bestimmen. PI ist nicht membrangängig, sondern kann nur durch perforierte Membrane absterbender Zellen translozieren und dann als interkalierender Farbstoff in die DNA eingelagert werden. Daraus resultiert eine Anfärbung ausschließlich toter Zellen, deren Färbung im Durchflusszytometer quantifiziert wird. Nach dem Zytotoxizitätsassay wurden sowohl Kulturüberstand (der bereits abgelöste tote Zellen enthält) und adhärente Zellen geerntet und vereinigt. Es erfolgte anders als unter Punkt 3.10.1 keine Applikation eines „Lebend Gates“ am FACS, sondern alle Zellen wurden gemessen und durch Abgleich mit einer Lebendkontrolle wurde das prozentuale oder vielfache Maß der PI-Positivität bestimmt.

### 3.10.3 Rezeptorfärbung

Durch spezifische Antikörper können Zelloberflächenbestandteile differenziell angefärbt und damit deren Expressionen im FACS analysiert werden. Da in dieser Arbeit vor allem die TRAIL-Rezeptoren und der TWEAK-Rezeptor Fn14 stimuliert wurden, musste gezeigt werden, dass die verwendeten Zellen auch tatsächlich die zu stimulierenden Rezeptoren an ihrer Oberfläche präsentierten, denn wo kein Rezeptor, da auch kein Stimulus. Zum Nachweis der TRAIL-Rezeptoren 1-4 sowie von Fn14 wurden 100.000 vormals kultivierte und abgelöste Zellen in FACS-Röhrchen überführt und mit PBS gewaschen (in 1 mL PBS resuspendiert und bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert und dekantiert). Im Anschluss daran erfolgte die Markierung der Rezeptoren (siehe Materialteil 2.4.3) mit den Primärantikörpern, indem diese zu den in 100  $\mu$ L PBS + 1 % FCS resuspendierten Zellen 1:100 hinzupipettiert wurden. Die Röhrchen wurden für 30 min bei 4 °C inkubiert, dann abzentrifugiert (1500 rpm für 5 min), gewaschen mit 3 mL PBS + 1 % FCS und resuspendiert in wiederum 100  $\mu$ L PBS + 1 % FCS. Die gebundenen murinen Primärantikörper wurden nun von MausIgG-spezifischen, biotinylierten Sekundärantikörpern markiert, indem letztere 1:50 der Suspension zugesetzt wurden. Auf eine weitere 30 min-Inkubation bei 4 °C folgte erneutes Waschen und Resuspendieren in 100  $\mu$ L PBS + 1 % FCS, dem Biotin-bindendes Streptavidin 1:100 zugesetzt war. Ans Streptavidin war Cytochrom 5-PE gekoppelt, welches im PerCP-Cy5-5-A-Kanal im FACS detektiert werden kann. Neben den Rezeptor-spezifischen Primärantikörpern wurde zudem eine nichtbindende Negativkontrolle mitgeführt, die den falschpositiven Hintergrund der Messung darstellte. Als solche Isotypkontrollen wurden ein MausIgG1-Antikörper (Kontrolle für anti-Fn14) und ein MausIgG2b-Antikörper (Kontrolle für anti-TRAIL-R1-4) angewendet. Wenn man die FACS-Software (FACSDiva) die Anzahl der Ereignisse gegen die logarithmisch dargestellte Intensität des PerCP-Cy5-5-A-Kanals von Kontrollzellpopulation und gefärbter Population auftragen ließ, ergaben sich im Endeffekt zwei Verteilungen. Überlagerten sich diese komplett, so lag kein Unterschied vor. Unterschieden sich beide Populationen aber, so war nachgewiesen, dass die ansonsten gleich behandelten Zellen den jeweils angefärbten Rezeptor auf ihrer Oberfläche trugen. Die Größe der Differenz beider Intensitätsspitzen war dabei das Maß für die Spezifität bzw. relative

Rezeptorexpression, sofern mehrere Zelllinien bzw. verschiedene Rezeptoren angefärbt wurden.

### **3.11 Fluoreszenzmikroskopie**

Während der experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation wurden mittels eines Axio Vert.A1 der Firma Zeiss Aufnahmen von Zellen in Kulturschalen durchgeführt. Es wurden Stapelbilder hergestellt aus Hellfeldaufnahmen und Fluoreszenz-Falschfarbenaufnahmen des FITC-Kanals mittels 10x, 20x und 40x-Objektiven.

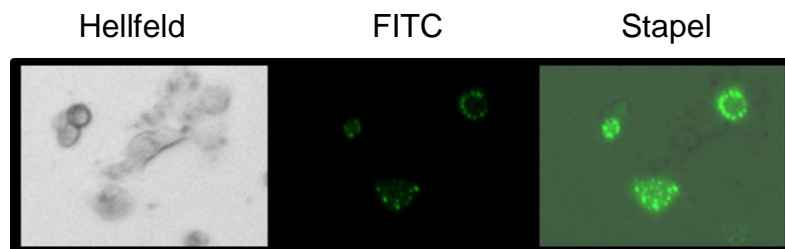


## 4. Ergebnisse

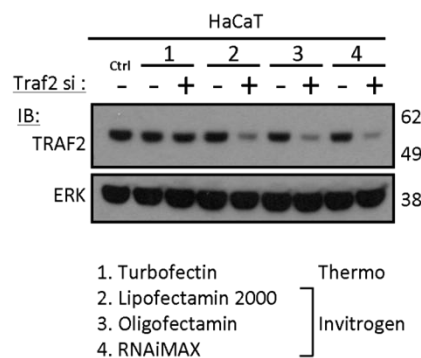
### 4.1 Knockdown von TRAF2 sensibilisiert HaCaT-Keratinocyten für den TRAIL-induzierten Zelltod.

TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) ist an der Regulation der beiden NF $\kappa$ B-Signalwege beteiligt und kann mit cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1) und cIAP2 Komplexe bilden. Die Funktion von TRAF2 wurde vor allem für TNF-induzierte Signalwege untersucht, für TRAIL aber bisher wenig studiert. Abbildung 4.1a zeigt zunächst in HaCaT-Keratinocyten die Verteilung von TRAF2 in den Zellen. Dafür wurde der für GFP-TRAF2 kodierende Vektor pGFP-N1-TRAF2 transient in HaCaT-Zellen transfiziert und nach 48 Stunden wurden die Zellen mikroskopiert. Das TRAF2-GFP-Fusionsprotein war vor allem im Zytoplasma und nur wenig im Kern zu finden. Zudem zeigte es sich in granularen Strukturen.

a.)



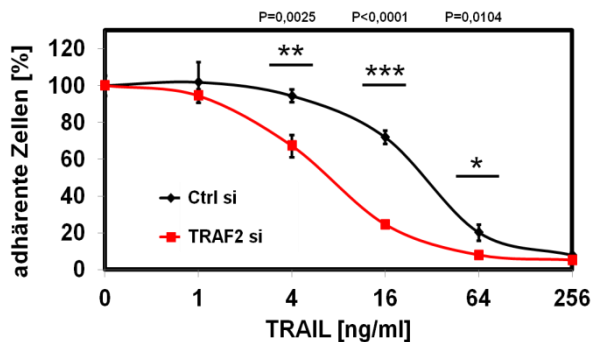
b.)



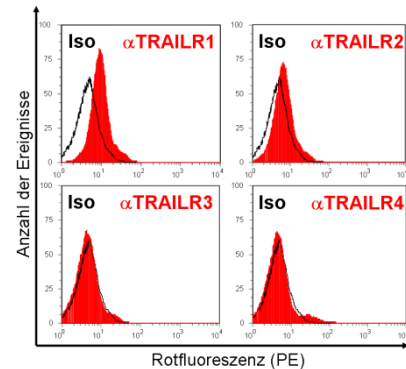
**Abbildung 4.1. Fluoreszenzmikroskopie und Knockdown von TRAF2.** a.) Hellfeld- und FITC-Kanal-Fluoreszenzmikroskopie (100-fache Vergrößerung) sowie deren Stapelbild von transient mit einem für ein GFP-TRAF2-Fusionspeptid kodierenden Plasmid transfizierten HaCaT-Keratinocyten. b.) Im Test waren die angegebenen Transfektionsreagenzien. „Ctrl“ bezeichnet unbehandelte Zellen ohne Transfektion. „-“ jeweils unter 1, 2, 3, 4 steht für Kontroll-siRNA und „+“ für die TRAF2-spezifische siRNA. Es wurden 250.000 HaCaT-Keratinocyten in 6 well-Vertiefungen eingesät, einen Tag kultiviert, dann mit dem jeweiligen Reagens transfiziert, einen weiteren Tag kultiviert und schließlich lysiert. Es folgten SDS-PAGE und Western Blot sowie Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen die Antigene TRAF2 und ERK (Ladekontrolle). Ca. 2,5  $\mu$ g Protein pro Spur wurden aufgetragen.

Zur Depletion von TRAF2 wurden HaCaT-Keratinocyten transient mit TRAF2-spezifischen bzw. Kontroll-siRNAs transfiziert. Abbildung 4.1b zeigt den Knockdown von TRAF2 unter Verwendung verschiedener Transfektionsreagenzien. Turbofectin erwies sich als ungeeignet für die siRNA-Transfektion, während die anderen drei, Lipofectamin 2000, Oligofectamin und RNAiMAX, deutlich zur Degradation der TRAF2-mRNA und damit zur Depletion von TRAF2 in den Zellen führten.

a.)



b.)



**Abbildung 4.2. RNAi gegen TRAF2 sensitiviert HaCaT-Keratinocyten für TRAIL-induzierten Zelltod.** a.) HaCaT-Keratinocyten wurden mit Kontroll- oder TRAF2-siRNAs transfiziert, in Triplikaten in 96 well-Platten ausgesät, einen Tag kultiviert und dann mit den angegebenen TRAIL-Titrationsstufen für 16 Stunden inkubiert. Die Adhärenz der Zellen wurde durch Anfärben mit Kristallviolett, Auswaschen nichtgebundenen und Lösen des verbleibenden Kristallvioletts in Methanol im ELISA-Reader (570 nm) quantifiziert. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten beider Transfektanten in einzelnen Titrationsstufen wurden mit GraphPad Software ermittelt im ungepaarten Student's t-Test. Sterne indizieren signifikante ( $P < 0,05$ ), hochsignifikante ( $P < 0,01$ ) und höchstsignifikante ( $P < 0,001$ ) Unterschiede. P-Werte sind über dem Diagramm vermerkt. b.) Durchflusszytometrie einer Färbung von HaCaT-Zellen für die TRAIL-Rezeptoren TRAILR1-TRAILR4 unter Verwendung spezifischer Primärantikörper bzw. einer Isotypkontrolle.

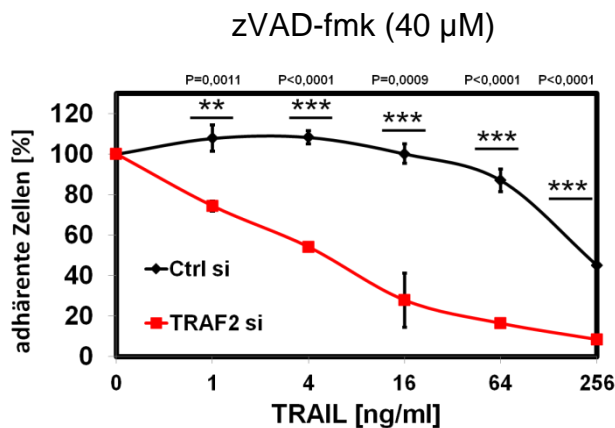
Für die Folgeexperimente wurde vor allem Lipofectamin 2000 verwendet. Einen Tag nach Transfektion wurden die Zellen für 16-20 h mit TRAIL-haltigem Medium oder Kontrollmedium inkubiert. Dabei wurde der Todesligand in verschiedenen Konzentrationen auf die TRAIL-Rezeptor-1 und -2 positiven (Abb. 4.2b) HaCaT-Zellen titriert (Abb. 4.2a). Der Anteil adhärenter, daher noch vitaler Zellen geht bei Kontroll-siRNA- wie TRAF2-Knockdown-Zellen bei 256 ng/mL TRAIL gegen Null. Die Kurve der TRAF2 Knockdownzellen verläuft bei geringeren Konzentrationen an TRAIL jedoch deutlich unterhalb der Kurve der Kontrolltransfektanten. Dabei ergeben sich bei den Titrationsschritten von 4, 16 und 64 ng/mL TRAIL signifikante Unterschiede in der Adhärenz der Zellen. Damit wurde deutlich, dass Knockdown von TRAF2 zu einer Sensitivierung von HaCaT-Zellen gegenüber TRAIL-induziertem Zelltod führt.

#### **4.2 TRAF2-Knockdown sensitiviert HaCaT-Keratinocyten für Nekroptose nach TRAIL-Stimulation.**

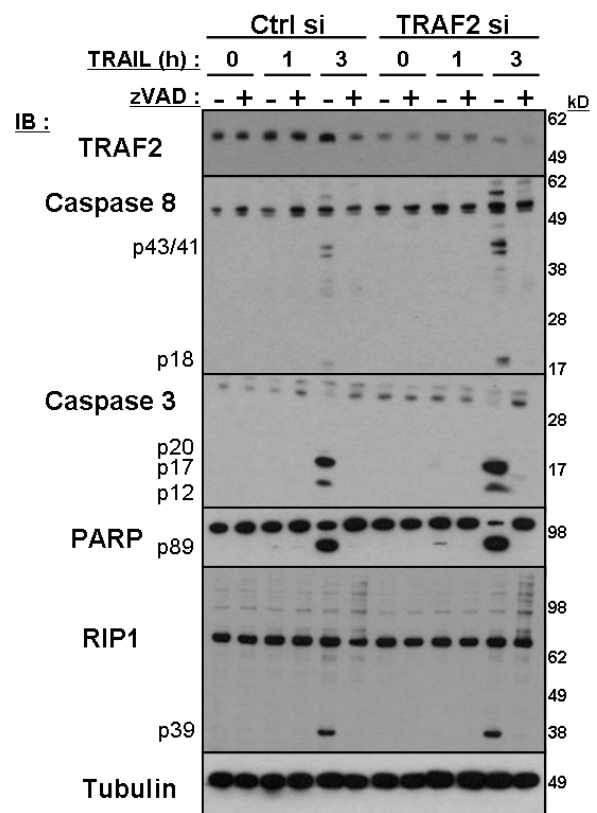
Davon ausgehend, dass der in Abbildung 4.2 beobachtete und durch TRAF2-Knockdown verstärkte Zelltod rezeptormedierte, extrinsische Apoptose darstellte, wurde im nächsten Schritt versucht, durch Einsatz des Caspaseinhibitors zVAD-fmk den TRAIL-induzierte Zelltod aufzuheben. Dazu wurde der obige Versuch (Abb. 4.2a) wiederholt, allerdings wurden die Zellen jeweils 30 Minuten mit zVAD-fmk vorinkubiert, bevor der Todesligand hinzugegeben wurde. Die Kontroll-siRNA-Zellen konnten durch diese Behandlung weitgehend geschützt werden (Abb. 4.3a) und waren z.B. bei 64 ng/mL TRAIL noch zu über 80 % adhären, während die TRAF2-Knockdownzellen überraschender Weise bei unter 20 % Adhärenz lagen. Diese Sensitivierung war sogar stärker als die unter Apoptose beobachtete (Abb. 4.2a). Das heißt, unter Bedingungen, wo Caspasen inaktiv waren, führte der Knockdown von TRAF2 noch immer zu einer Sensitivierung gegenüber TRAIL. Die Caspaseunabhängigkeit des Zelltods in TRAF2-Knockdown-Zellen deutete darauf hin, dass es sich bei diesem Zelltod um Nekroptose handelt. Abbildung 4.3b zeigt, dass die zVAD-fmk-Behandlung in der Tat ausreichend war die TRAIL-induzierte Caspaseaktivierung zu blockieren. Nach zVAD-fmk-Behandlung war keinerlei Spaltung der Caspasen, von PARP oder von RIP1 zu erkennen. Allerdings scheint die Caspase 8-Aktivierung bei den TRAF2-Knockdown-Zellen etwas stärker zu sein, da ihre p43/41- und p18-Banden nach drei Stunden TRAIL-Inkubation etwas stärker sind im Vergleich zu den Kontrolltransfektanten und auch die Caspase 3-abhängige Spaltung von PARP ist etwas stärker unter TRAF2-si-Bedingungen und auch bereits nach einer Stunde TRAIL-Inkubation deutlicher zu erkennen. Unter Bedingungen, unter denen Caspase-Aktivierung erfolgen kann sensitiviert TRAF2-Knockdown daher vermutlich auch etwas für die TRAIL-induzierte Apoptose. Dass es sich bei dem Caspase-unabhängigen Zelltod um Nekroptose handelte, wurde durch Einsatz von Necrostatin-1, einem spezifischen RIP1-Kinase-Inhibitor bestätigt (Abb. 4.3c). Hierzu wurden HaCaT-Keratinocyten, die mit einer Kontroll- oder TRAF2-siRNA transfiziert worden waren, wiederum im Zytotoxizitätsassay analysiert. Neben der Inkubation mit 64 ng/mL TRAIL erfolgte eine Koinkubation mit zVAD-fmk oder Necrostatin-1 oder einer Kombination beider Reagenzien. Die TRAF2-Knockdown-Zellen wiesen im Unterschied zu den Kontroll-siRNA-Zellen und analog zur TRAIL-

Titration in Abb. 4.3a bei Anwesenheit von zVAD-fmk allein keinen vollständigen Schutz vor dem TRAIL-induzierten Zelltod auf. Außerdem hatte Necrostatin-1 allein bei Anwesenheit von TRAIL keinerlei schützenden Effekt. Beide Transfektanten ließen sich aber durch eine Kombination von zVAD-fmk und Necrostatin-1 gegen TRAIL-vermittelten Zelltod schützen.

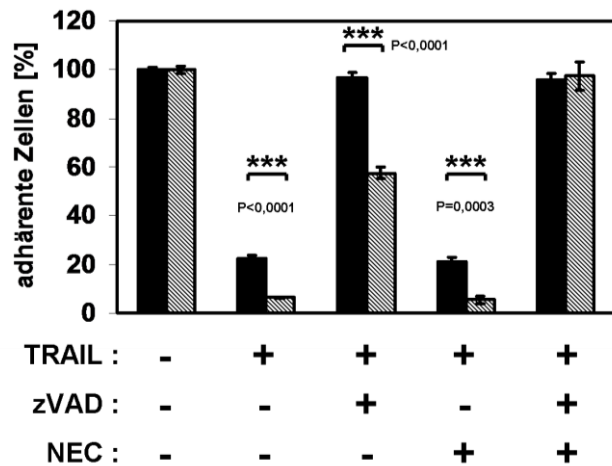
a.)



b.)



c.)

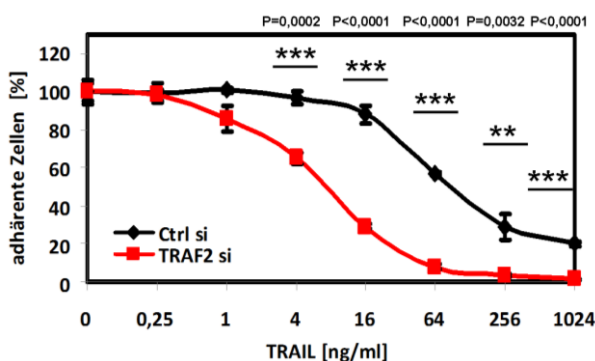


**Abbildung 4.3. Knockdown von TRAF2 verstärkt die TRAIL-induzierte Nekroptose in HaCaT-Keratinocyten.** a.) Der Versuch wurde wie für Abb. 4.2a beschrieben durchgeführt, zuzüglich Applikation von zVAD-fmk (40  $\mu$ M Endkonzentration). b.) Western Blot-Kinetik in Ab- und Anwesenheit von zVAD-fmk (40  $\mu$ M) und 100 ng/mL TRAIL. c.) Koinkubation von HaCaT-Keratinocyten +/- TRAF2-Knockdown mit 64 ng/mL TRAIL in Kombination mit zVAD-fmk (40  $\mu$ M) und/oder Necrostatin-1 (90  $\mu$ M).

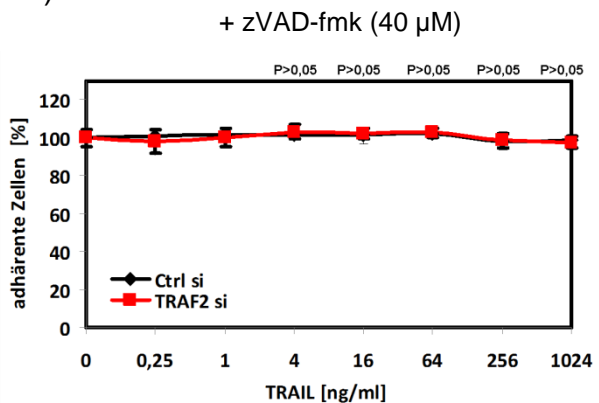
### 4.3 TRAF2-Knockdown sensitiviert die epitheliale Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa für TRAIL-induzierte Apoptose.

Ob es sich bei dem durch TRAF2-Knockdown verstärkten Zelltod unter antiapoptotischen Bedingungen um Nekroptose handelt, ist verifizierbar, indem Zellen verwendet werden, die nicht über eines der für die Bildung des Nekroptosoms mutmaßlich essentiellen Proteine (RIP1 und RIP3) verfügen. Von HeLa-Zellen ist bekannt, dass sie kein RIP3 exprimieren. Die mit HaCaT-Keratinocyten durchgeführten Zytotoxizitätsassays wurden daher mit HeLa wiederholt, um zu überprüfen, ob (1.) der Befund, dass TRAF2-Knockdown für Apoptose sensitiviert, auch in anderen Zelllinien gezeigt werden kann und ob (2.) in Zellen ohne RIP3 der in HaCaT beobachtete Zelltod unter caspaseinhibierenden Bedingungen aufgehoben ist. Der TRAF2-Knockdown sensitivierte HeLa-Zellen signifikant für TRAIL-induzierte Apoptose (Abb. 4.4). Die halbletale Konzentration (LC50) liegt bei den Kontroll-siRNA-Zellen bei ca. 100 ng/mL TRAIL, während sie beim TRAF2-Knockdown ca. 8 ng/mL beträgt. Dementsprechend konnte der in HaCaT aufgetretene Phänotyp des TRAF2-Knockdown (Abb. 4.2a) auch in HeLa nachgewiesen werden. Abbildung 4.4b zeigt einen analogen Versuch unter Anwesenheit von zVAD-fmk. Hier zeigte sich aber im Gegensatz zu HaCaT, dass sowohl die Kontroll- als auch die TRAF2-siRNA-Zellen komplett schützbar gegen den TRAIL-induzierten Zelltod waren. TRAIL-induzierte Nekroptose tritt also unter caspaseinhibierenden Bedingungen in RIP3-negativen HeLa-Zellen nicht auf (Abb. 4.4b).

a.)



b.)

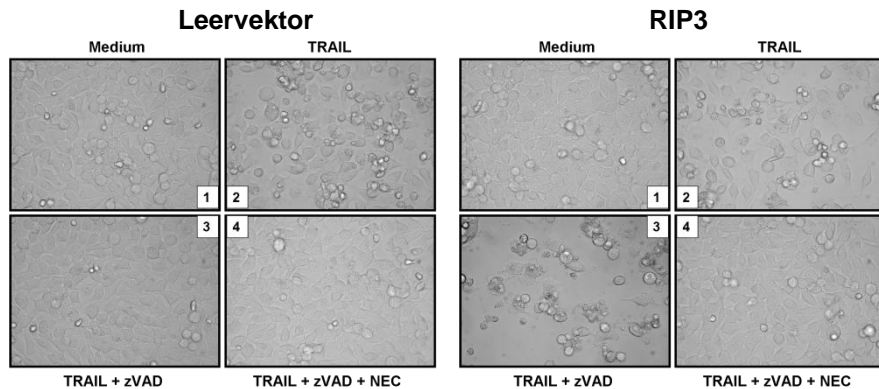


**Abbildung 4.4. TRAF2-Knockdown-abhängige Sensitivierung für Apoptose ist schützbar durch Pancaspaseinhibition in parentalen HeLa-Zellen.** 10.000 mit Kontroll- oder TRAF2-siRNA transfizierte HeLa-Zellen wurden in Triplikaten in 96 well-Platten eingesät und entweder mit zVAD-fmk und TRAIL kokubiert oder nur mit TRAIL allein. a.) zeigt die Titration ohne Pancaspaseinhibitor zVAD-fmk, b.) die Titration bei dessen Anwesenheit. Die statistische Auswertung (ungepaarter Student's t-Test) in a.) und b.) wurde mit der GraphPad Software durchgeführt.

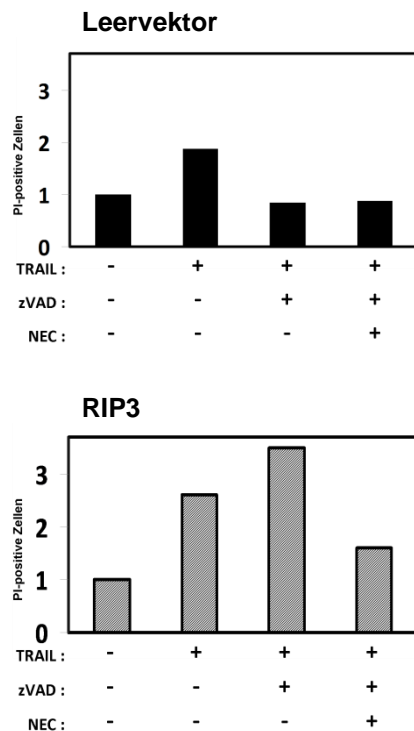
#### 4.4 Expression von RIP3 sensitiviert HeLa-Zellen für TRAIL-induzierte Nekroptose.

Nachdem parentale, RIP3-negative HeLa-Zellen im Gegensatz zu den RIP3-exprimierenden HaCaT-Keratinocyten gegen TRAIL-induzierten Zelltod mittels zVAD-fmk vollständig schützbar waren (Abb. 4.4), wurde im Folgenden verifiziert, ob HeLa-Zellen für Nekroptose durch Expression von RIP3 sensibilisiert werden könnten.

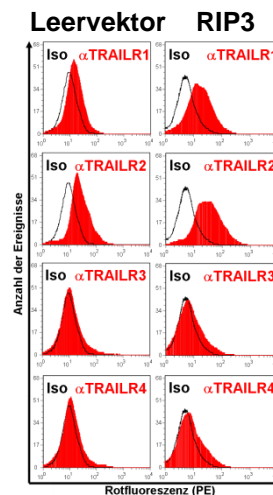
a.)



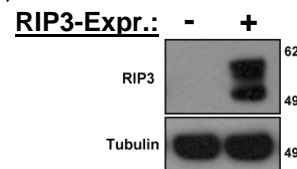
b.)



c.)



d.)

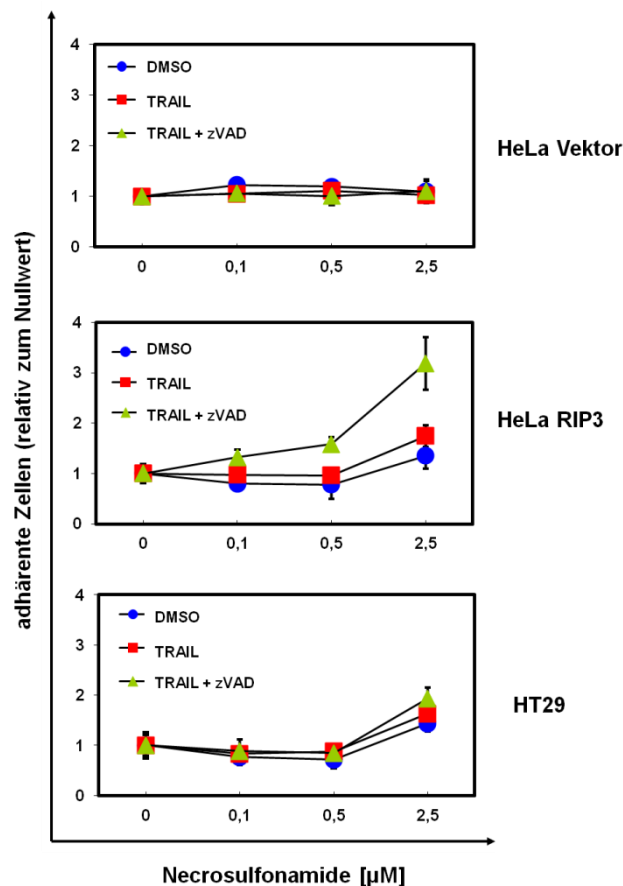


**Abbildung 4.5. Expression von RIP3 führt zu TRAIL-abhängiger Nekroptose in HeLa-Zellen.** a.) Mikroskopische Aufnahmen (400-fache Vergrößerung) von HeLa-Leervektor- bzw. HeLa-RIP3-Zellen, die bis auf die Kontrolle (Medium) jeweils 18 h mit 64 ng/mL TRAIL allein oder in Kombination mit zVAD-fmk (40  $\mu$ M) oder mit TRAIL, zVAD-fmk und Necrostatin-1 (90  $\mu$ M) inkubiert wurden. b.) Die Zellen aus a.) wurden geerntet, mit Propidiumiodid inkubiert und dann im Durchflusszytometer analysiert. c.) Färbung von HeLa-Leervektor- bzw. RIP3-Expressionszellen gegen TRAILR1-TRAILR4. d.) Western Blot zeigt die Expression von RIP3. Tubulin dient als Ladekontrolle.

Zu diesem Zweck wurden stabil mit einem Leervektor oder einem humanes RIP3 exprimierenden Vektor transfizierte HeLa-Zellen genutzt (Abb. 4.5d). Beide HeLa-Varianten wurden im Folgenden mit 64 ng/mL TRAIL oder zusätzlich mit zVAD-fmk oder einer Kombination von zVAD-fmk und Necrostatin-1 inkubiert. Abbildung 4.5a zeigt mikroskopische Aufnahmen der so behandelten Zellen nach 18 Stunden TRAIL-Inkubation. Es zeigt sich deutlich, dass TRAIL sowohl in Leervektorzellen als auch in RIP3-Expressionszellen Zelltod induziert (Bild 2 jeweils), denn bei beiden werden im Vergleich zur Mediumkontrolle (Bild 1 jeweils) mehr abgelöste Zellen sichtbar und es ist kein konfluenter Zellrasen mehr vorhanden. Während aber dieser TRAIL-Phänotyp bei den Leervektorzellen durch Einsatz von zVAD-fmk gänzlich inhibierbar war, trat er bei den RIP3 exprimierenden Zellen in Anwesenheit von zVAD-fmk sogar noch deutlicher auf (Bild 3 jeweils). Sowohl Leervektor- als auch RIP3-Expressionszellen sind aber durch Koinkubation von zVAD-fmk und Necrostatin-1 gegen TRAIL-vermittelten Zelltod schützbar (Bild 4 jeweils). Wie eine Färbung mittels spezifischer Antikörper gegen die TRAIL-Rezeptoren 1, 2, 3 und 4 (TRAILR1-TRAILR4) belegt, unterscheiden sind beide Zelllinien bezüglich der Expression der TRAIL-Rezeptoren nicht (Abb. 4.5c), so dass dies als Ursache für die beobachteten Unterschiede ausgeschlossen werden konnte.

Zur weiteren Bestätigung des beobachteten nekroptotischen Zelltodes wurde mit Necrosulfonamide (NSA) ein weiterer Inhibitor verwendet. Dieser ist spezifisch für das mixed lineage kinase-like domain Protein (MLKL), einem weiteren Bestandteil des Nekroptosoms, der nach Phosphorylierung durch RIP1/RIP3 die Nekroptose vorantreibt. HeLa (Leervektor), HeLa (RIP3) und HT29-Zellen wurden mit NSA titriert (0-2,5  $\mu$ M) und dabei entweder zur Kontrolle mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) inkubiert oder mit TRAIL allein (256 ng/mL) oder mit einer Kombination von TRAIL (256 ng/mL) mit zVAD-fmk (40  $\mu$ M). Es zeigte sich, dass die Titration von NSA auf die Vitalität der RIP3-negativen HeLa-Leervektorzellen (oberes Diagramm Abb. 4.6) keinen Einfluss hat: egal ob diese nur mit DMSO oder TRAIL oder TRAIL und zVAD-fmk inkubiert wurden. Bei den stabil RIP3 exprimierenden HeLa-Zellen (mittleres Diagramm) allerdings nehmen sowohl die DMSO-Kontrolle und die TRAIL-Inkubation als auch die TRAIL+zVAD-Inkubation in der Vitalität relativ zu 0  $\mu$ M NSA mit steigender NSA-Konzentration zu. So leben dreimal mehr HeLa-RIP3-Zellen bei Anwesenheit von TRAIL und zVAD-fmk, wenn sie mit dem MLKL-Inhibitor koinkubiert

werden (2,5  $\mu\text{M}$  NSA). Ähnlich verhalten sich HT29-Zellen, die natürlicherweise RIP3 exprimieren (unteres Diagramm). Neben der RIP1-Inhibition mittels Necrostatin-1 war der durch zVAD-fmk verstärkte TRAIL-induzierte Zelltod von RIP3 exprimierenden Zellen also auch durch Inhibition des nekroptotischen Proteins MLKL vermeidbar, was bestätigte, dass es sich dabei um Nekroptose handelt.



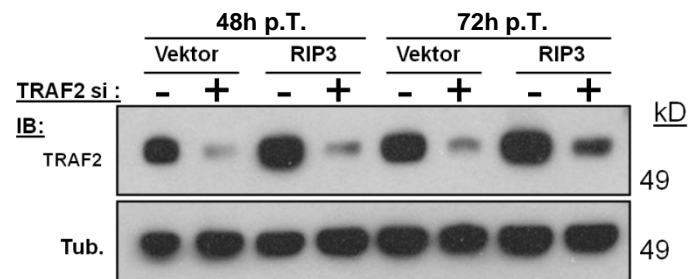
**Abbildung 4.6. Inhibition von MLKL mittels Necrosulfonamide schützt RIP3 exprimierende Zellen vor Nekroptose.** 10.000 Zellen/well wurden mit Necrosulfonamide titriert (0-2,5  $\mu\text{M}$ ), mit TRAIL allein (256 ng/mL) oder TRAIL plus zVAD-fmk (40  $\mu\text{M}$ ) bzw. zur Kontrolle nur mit DMSO (2,5  $\mu\text{M}$ ) für 18 h inkubiert und schließlich mit Kristallviolett gefärbt. Dargestellt wird das Vielfache adhärenter Zellen in Bezug auf die Inkubation ohne NSA (ganz links). Eines von zwei Experimenten ist dargestellt.

#### 4.5 TRAF2-Knockdown sensitiviert HeLa-Zellen für Apoptose und RIP3-exprimierende HeLa-Zellen für Apoptose und Nekroptose.

Ob ein TRAF2-Knockdown analog zu HaCaT auch auf HeLa-Leervektor- bzw. RIP3-Expressionszellen sensitivierend wirkt, wurde geklärt, indem diese gleichartig mit

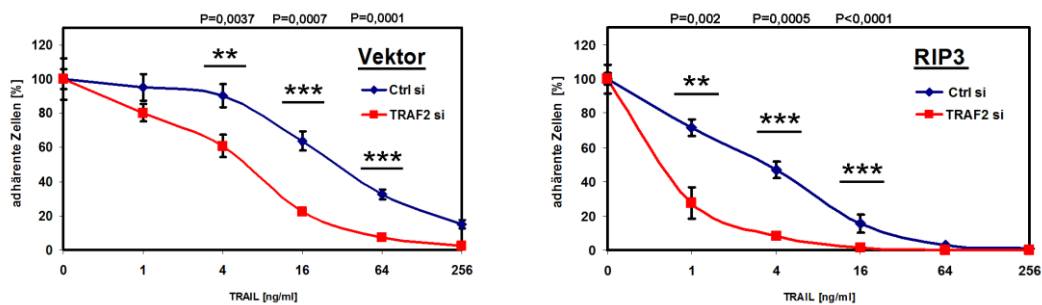


Kontroll- bzw. TRAF2-siRNAs transfiziert und mit verschiedenen Konzentrationen von TRAIL inkubiert wurden.



**Abbildung 4.7. Western Blot zur Kinetik des TRAF2-Knockdowns.** 250.000 HeLa-Leervektor- bzw. RIP3-Zellen wurden in 6 well-Platten eingesät, nach 24 h transfiziert und nach weiteren 48 bzw. 72 h post Transfektion (p.T.) lysiert. Detektiert wurden TRAF2 und Tubulin mit spezifischen Antikörpern. Tubulin dient als Ladekontrolle.

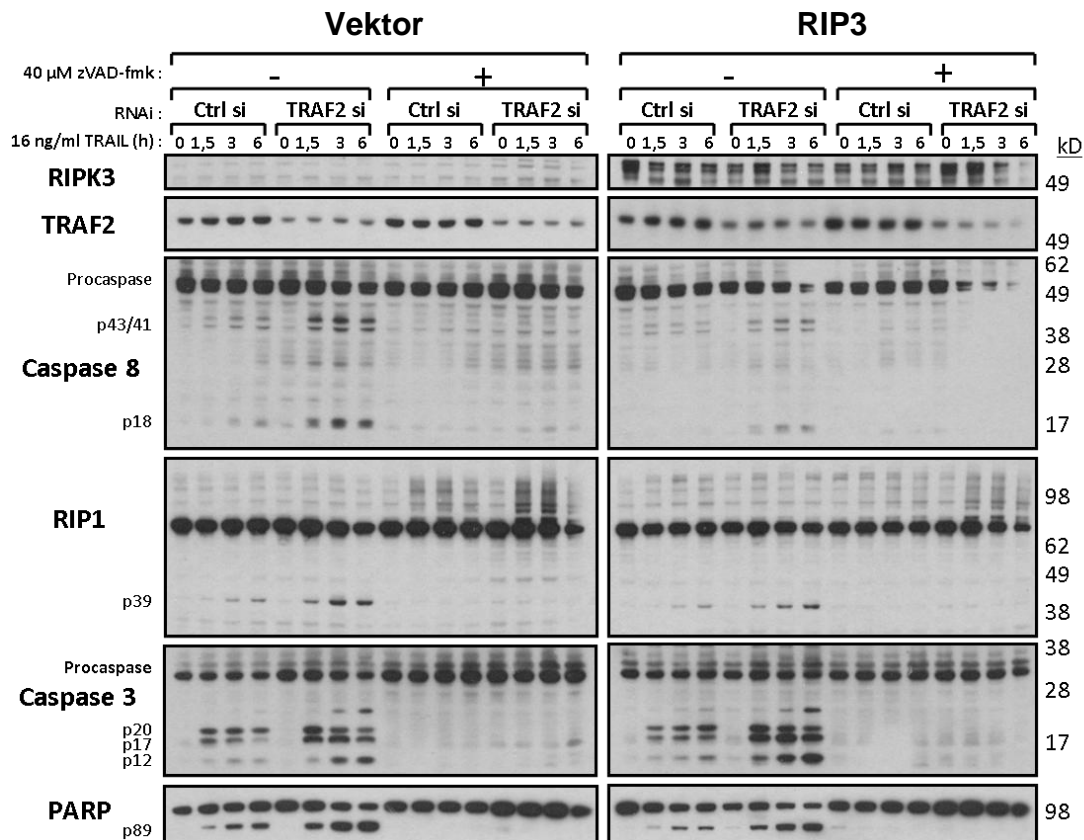
48 Stunden nach Transfektion, wenn die Zellen in den 96 well-Platten mit TRAIL inkubiert wurden, und weitere 24 Stunden später, zur Zeit der Beendigung des Experiments, war der Knockdown von TRAF2 wirksam. Noch nach drei Tagen war das Signal von TRAF2 in den Knockdownzellen im Western Blot wesentlich schwächer im Vergleich zur Kontroll-siRNA (Abb. 4.7).



**Abbildung 4.8. TRAF2-Knockdown sensitiviert HeLa-Zellen ohne und mit RIP3 für TRAIL.** TRAIL-Titration durchgeführt mit 10.000 siRNA-transfizierten Zellen pro Vertiefung in Triplikaten in 96 well-Platten. Färbung mit Kristallviolett und Auslesen im ELISA-Reader. Statistische Auswertung mit GraphPad Software: ungepaarter Student's t-Test. Eines von 5 Experimenten ist gezeigt.

Unter apoptotischen Bedingungen (d.h. kein zVAD-fmk) wirkte der TRAF2-Knockdown in beiden Zellvarianten sensitivierend für den TRAIL-induzierten Zelltod (Abb. 4.8). Außerdem waren die RIP3-exprimierenden Zellen generell etwas sensitiver als die Leervektorzellen: während letztere mit Kontroll-siRNA etwa eine LC50 bei ca. 30 ng/mL TRAIL aufwiesen, war es bei den RIP3-Zellen mit Kontroll-

siRNA bereits ca. 4 ng/mL TRAIL. Erhöhte Sensibilität zeigte sich auch bei den TRAF2-siRNA-Inkubationen: die LC50 beim Leervektor lag bei 4 ng/mL TRAIL und bei den RIP3-Zellen bereits bei 0,5 ng/mL. Durch parallele Lyse TRAIL-behandelter Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von TRAIL wurde mittels anschließendem Western Blot die Caspaseaktivierung und -spaltung in den Leervektor- bzw. RIP3-Expressionszellen analysiert (Abb. 4.9).

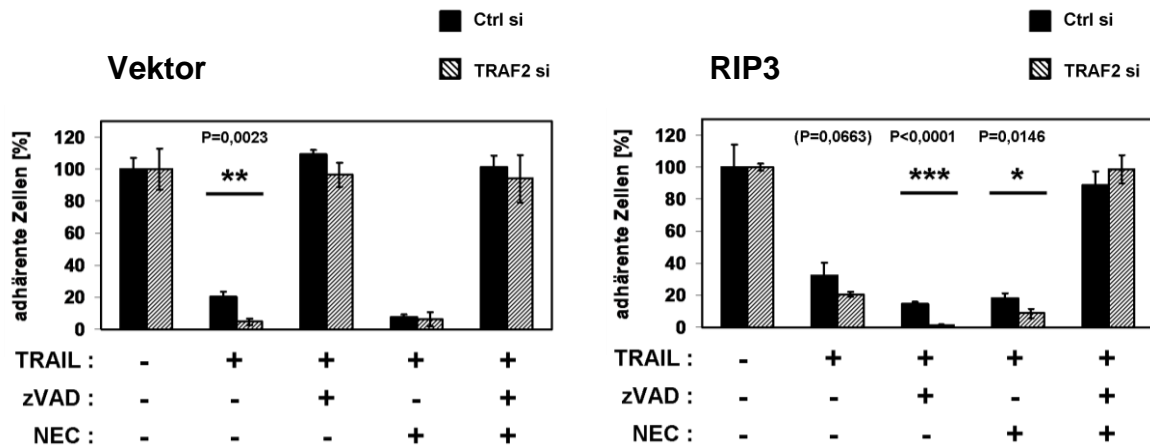


**Abbildung 4.9. Western Blot-Kinetik mit HeLa-Leervektor- bzw. RIP3-Zellen.** 250.000 mit Kontroll- oder TRAF2-siRNA transfizierte Zellen wurden in 6 well-Platten eingesät, 1 h mit zVAD-fmk vorinkubiert, dann für die Zeitpunkte 6 h, 3 h, 1,5 h bzw. 0 h mit TRAIL (16 ng/mL) inkubiert, zur selben Zeit geerntet, lysiert, einer SDS-PAGE (2,5 µg/Spur) und dem Western Blot zugeführt. Gefärbt wurde mit spezifischen Antikörpern gegen die angegebenen Proteine.

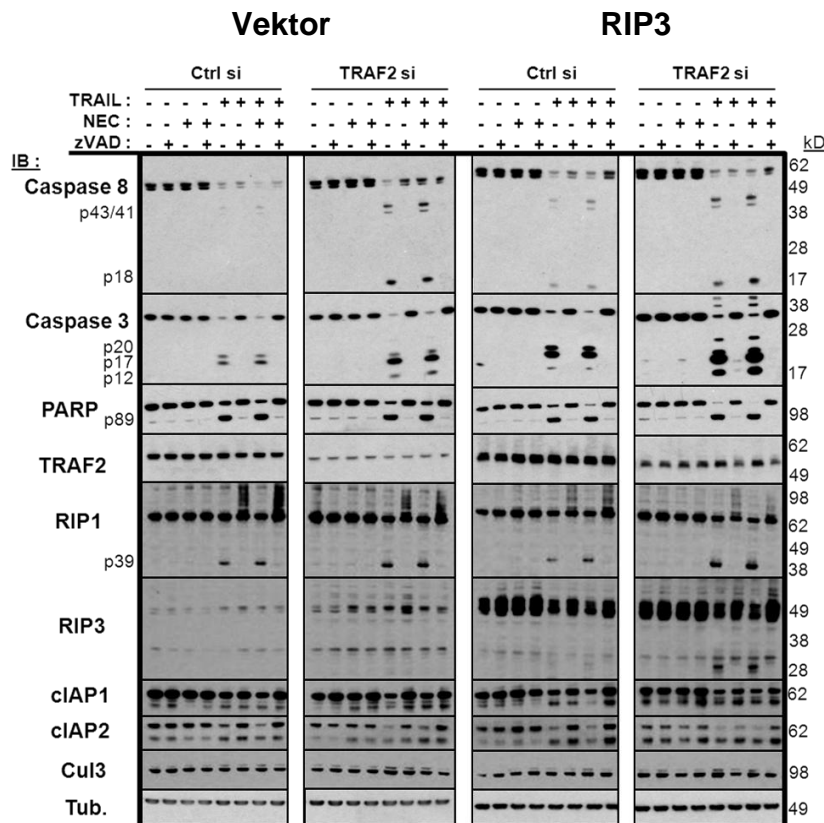
Zwischen den Leervektor- und RIP3-Zellen gab es keine wesentlichen Unterschiede in der Kinetik der Prozessierung von Caspase 8, Caspase 3, RIP1 und der Poly ADP ribose polymerase (PARP). In beiden Zelltypen ist aber eindeutig zu sehen, dass in Anwesenheit von zVAD-fmk jeweils keine Caspase-Aktivierung mehr stattfindet. Generell war die Fragmentierung der Proteine in der Kinetik der TRAF2-Knockdown-Transfektionen sowohl beim Leervektor als auch bei der RIP3-Expression ohne zVAD-fmk jeweils stärker detektierbar als in den jeweiligen Kontroll-siRNA-

Transfektionen, was bestätigte, dass TRAF2-Knockdown beide Zellvarianten für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert.

a.)



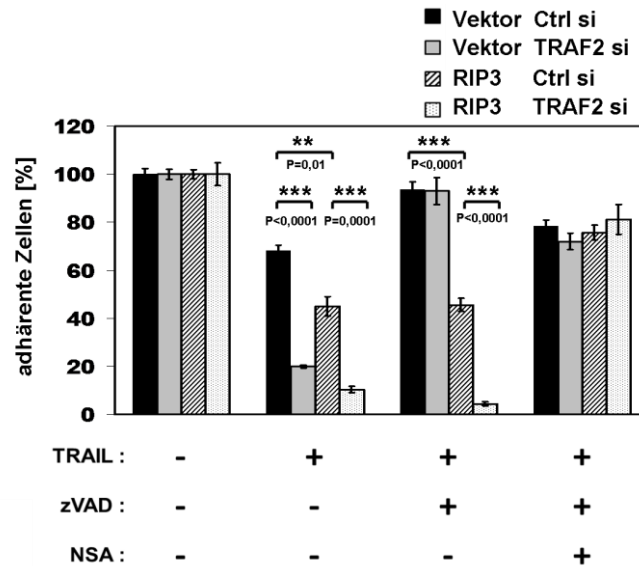
b.)



**Abbildung 4.10. TRAF2-Knockdown verstärkt sowohl die RIP3-unabhängige Apoptose als auch die RIP3-abhängige Nekroptose in HeLa-Zellen.** a.) 10.000 mit TRAF2- oder Kontroll-siRNA transfizierte HeLa-Leervektor- bzw. RIP3-Expressionszellen wurden pro Vertiefung in Triplikaten in 96 well-Platten eingesät, wie angegeben mit zVAD-fmk (40  $\mu$ M), Necrostatin-1 (90  $\mu$ M) oder in Kombination vorinkubiert und dann mit TRAIL (64 ng/mL) stimuliert. Auswertung durch Kristallviolettassay. Signifikante Unterschiede wurden mittels GraphPad Software im Student's t-Test ermittelt. b.) Analog zu a.) behandelte Zellen und zusätzlich zVAD-fmk allein, Necrostatin-1 allein und in Kombination, wurden lysiert (Vollzellysate), per SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und gefärbt mit spezifischen Antikörpern gegen die indizierten Proteine. Jeweils 2,5  $\mu$ g pro Spur wurden aufgetragen TRAIL (64 ng/mL), zVAD-fmk (40  $\mu$ M), Necrostatin-1 (90  $\mu$ M).

Nachdem deutlich geworden war, dass der im Zytotoxizitätsassay beobachtete Zelltod unter caspaseinhibierenden Bedingungen von RIP3 abhängig war, sollte auch die Inhibition des für Nekroptose ebenfalls wichtigen RIP1 untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine konstante Konzentration an TRAIL (64 ng/mL) verwendet. Die Zellen wurden zudem mit zVAD-fmk und/oder Necrostatin-1 inkubiert. Im Ergebnis (Abb. 4.10a) zeigte sich neben der Sensitivierung der HeLa-RIP3-Zellen gegenüber nekroptotischen Bedingungen (TRAIL plus Pancaspaseinhibitor zVAD-fmk), dass beide HeLa-Varianten mit Necrostatin-1 allein nicht schützbar sind gegenüber TRAIL, wohingegen die Kombination aus beiden Inhibitoren beide, unabhängig von RIP3-Expression und TRAF2-Knockdown, zu schützen vermochte. Die RIP3-Expressionszellen hingegen waren auch bei Inkubation mit zVAD-fmk signifikant sensitiviert bei TRAF2-Knockdown gegenüber der Kontroll-siRNA (rechts, Mitte) und ebenfalls signifikant sensitiviert bei TRAIL plus Necrostatin-1 (rechtes Diagramm, zweites Säulenpaar von rechts). Die TRAF2-Knockdown-abhängige Sensitivierung in HeLa-RIP3 (rechtes Diagramm, zweite von links) liegt ebenfalls vor, verfehlte in diesem Versuch aber knapp das Signifikanzniveau  $P < 0,05$ . Molekular findet TRAIL-induzierte Spaltung der Caspase 8 und Caspase 3 sowie ihrer Substrate (C8: C3, RIP1, RIP3; C3: PARP) auch in Anwesenheit von Necrostatin-1 statt (Abb. 4.10b). Außerdem unterbleibt deren Spaltung stets, wenn die Zellen mit zVAD-fmk inkubiert worden waren. Weiterhin ist die Caspase 3-Spaltung jeweils stärker in den Zellen mit TRAF2-Knockdown als in denen mit Kontroll-siRNA-Transfektion. Es ist eine RIP3-Prozessierung erkennbar und im Übrigen deutlich stärker im TRAF2-Knockdown und nur vorhanden, wenn kein zVAD-fmk eingesetzt wurde. Dies gilt ebenso für RIP1, bei dem noch hinzukommt, dass es unter Anwesenheit von zVAD-fmk und dabei ausschließlich unter gleichzeitiger Anwesenheit von TRAIL posttranslational modifiziert zu werden scheint, belegt durch starke Banden oder einen Schmier oberhalb seiner Hauptbande (74 kD). Bei Inkubation mit zVAD-fmk aber ohne TRAIL ist diese Modifikation nicht zu erkennen. Beide cIAP-Proteine (jeweils obere Bande ist spezifisch) werden ebenfalls nur unter apoptotischen Bedingungen prozessiert. Das hier noch aufgeführte Protein Cullin-3 (Cul3) ist eine K63-E3-Ubiquitin-Ligase und stabilisiert an den DISC-rekrutierte Caspase-8-Moleküle durch Ubiquitinierung der p10-Untereinheiten von Caspase 8. Ergänzend zum Einsatz von Necrostatin-1 wurden auch die Kontroll- bzw. TRAF2-

siRNA-Transfektanten statt mit Necrostatin-1 mit Necrosulfonamide in Kombination mit zVAD-fmk und TRAIL inkubiert (Abb. 4.11). Wie Necrostatin-1 war auch NSA in Kombination mit zVAD-fmk in der Lage vor TRAIL-induzierter Nekroptose zu schützen.



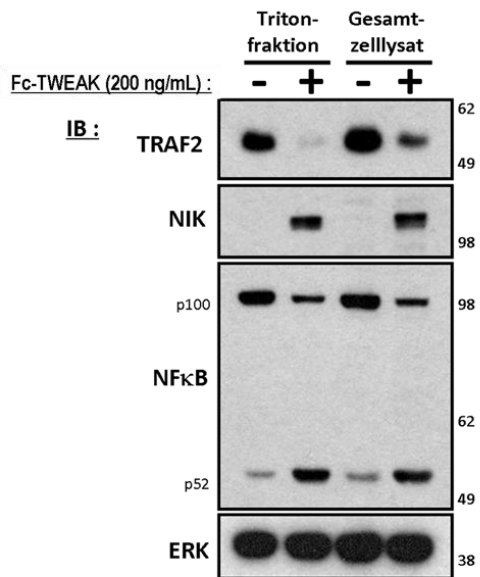
**Abbildung 4.11. Inhibition von MLKL schützt auch bei TRAF2-Knockdown vor Nekroptose.** Kontroll- oder TRAF2-siRNA-transfizierte HeLa-Leer- oder RIP3-Expressionsvektorzellen wurden in 96 well-Platten in Triplikaten ausgesät und in den angegebenen Kombinationen mit TRAIL (64 ng/mL), zVAD-fmk (40  $\mu$ M) und NSA (2,5  $\mu$ M) für 18 h inkubiert. Dann erfolgte ein Kristallviolettassay. Statistik: Student's t-Test.

#### 4.6 Fc-TWEAK rekrutiert zytoplasmatisches TRAF2 in ein Triton X100-unlösliches Kompartiment und sensitiviert HaCaT-Keratinocyten für TRAIL-induzierte Nekroptose.

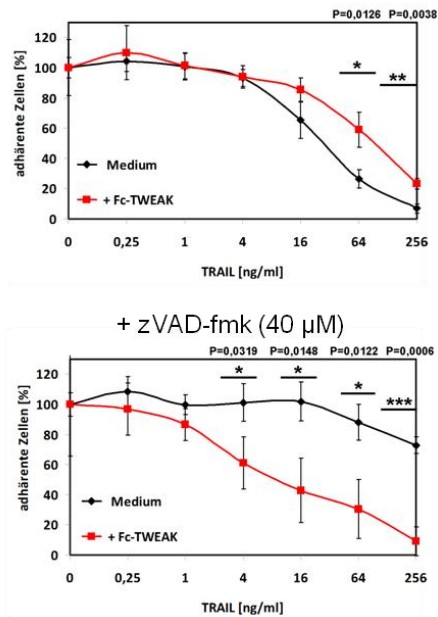
Neben der artifiziellen siRNA-Transfektion besteht auch die Möglichkeit, TRAF2 durch Stimulation von Fn14 mittels Fc-TWEAK durch Rekrutierung an die zytoplasmatische Domäne von Fn14 physiologisch in Zellen zu depletieren. Da TRAF2 im Zytosol an der Degradation von NIK und somit der Inhibition des alternativen NF $\kappa$ B-Signalwegs beteiligt ist, führt die Depletion zytoplasmatischer TRAF2-Pools dazu, dass die NF $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) nach Inkubation der Zellen mit Fc-TWEAK (über Nacht, 200 ng/mL) angereichert wird und die Prozessierung von p100 zu p52 erfolgt (Abb. 4.12a). Beides ist sowohl im Triton- als auch im Volllysat deutlich. TRAF2 wird nach Fc-TWEAK-Inkubation völlig aus der Triton-löslichen Fraktion depletiert und sein Signal ist zudem vergleichsweise schwach im Volllysat,

sodass insgesamt weniger TRAF2 vorhanden zu sein scheint. Die Expression von Fn14 in HaCaT-Zellen wurde per Durchflusszytometrie überprüft (Abb. 4.12b).

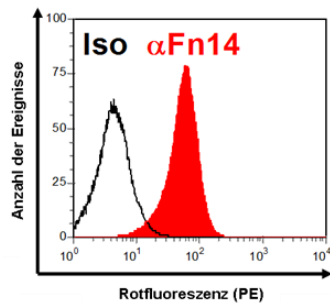
a.)



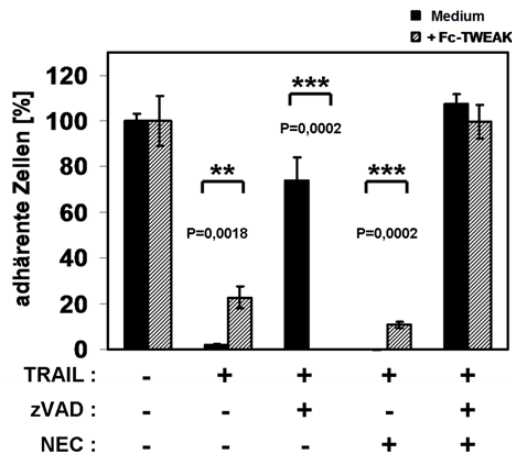
b.)



c.)



d.)

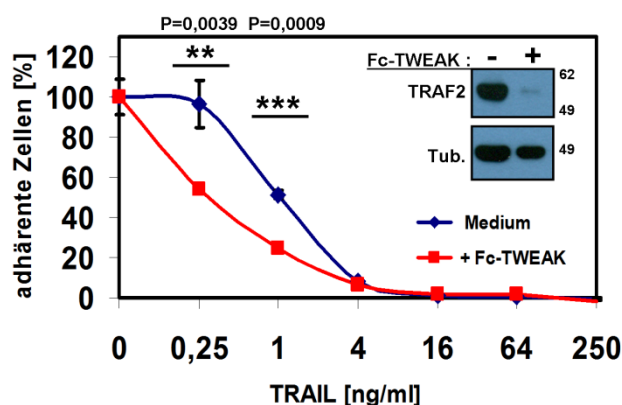


**Abbildung 4.12. Fc-TWEAK rekrutiert TRAF2 in ein Triton X100-unlösliches Kompartiment und sensitiviert HaCaT-Keratinocyten für Nekroptose.** a.) Western Blot von je 250.000 HaCaT-Keratinocyten nach Über-Nacht-Stimulation mit 200 ng/mL Fc-TWEAK. Entweder wurde mit Triton X100-haltigem Puffer lysiert oder mittels Lämmli-Probenpuffer ein Gesamtzelllysat hergestellt. Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen die indizierten Antigene. b.) Zytotoxizitätsassay mit TRAIL-Titration +/- zVAD-fmk. c.) Je 100.000 HaCaT-Zellen wurden mit Fn14-spezifischem Antikörper bzw. einem Isotypkontrollantikörper inkubiert, sekundär mit Biotin-anti-Maus-IgG markiert und tertiär mit Streptavidin/RPE gefärbt. Messung erfolgte im PerCP-Cy5-5-A-Kanal mittels Durchflusszytometer. d.) 10.000 HaCaT-Keratinocyten wurden in Triplikaten in 96 well-Platten ausgesät, über Nacht in Kontrollmedium oder Medium mit 200 ng/mL Fc-TWEAK inkubiert und am nächsten Tag unter Verwendung der angegebenen Inhibitoren mit TRAIL (256 ng/mL) inkubiert. Auswaschen und Färbung mit Kristallviolett erfolgte nach 20 Stunden. Trübungsmessung erfolgte im ELISA-Reader bei 570 nm. Statistische Auswertung: ungepaarter, zweiseitiger Student's t-Test, P-Werte ermittelt mit GraphPad Software.

Die Inkubation mit Fc-TWEAK hatte unter apoptotischen Bedingungen nur geringen Einfluss auf die Zellen (Abb. 4.12c links). Es war sogar häufig so, dass Vorinkubation mit Fc-TWEAK ganz leicht schützende Effekte im Vergleich zur Mediumkontrolle hatte, im abgebildeten Versuch signifikant bei 64 und 256 ng/mL TRAIL. Eine Inhibition der Caspasen und damit des apoptotischen Zelltods durch Koinkubation mit zVAD-fmk (Abb. 4.12c rechts) führte zum weitgehenden Schutz der über Nacht mit Kontrollmedium vorinkubierten Zellen (Abb. 4.12d). Im Vergleich dazu zeigten die mit Fc-TWEAK vorstimulierten HaCaT-Keratinocyten eine signifikante Sensitivierung gegenüber TRAIL-vermittelten Zelltod, bei dem es sich aufgrund des Einsatzes von zVAD-fmk vermutlich um Nekroptose handelte. Analog zu Abbildung 4.3c wurde folglich überprüft, ob Necrostatin-1 den beobachteten Zelltod verhindert, was tatsächlich der Fall war.

#### 4.7 Fc-TWEAK verstärkt TRAIL-induzierte Nekroptose in RIP3-exprimierenden HeLa-Zellen.

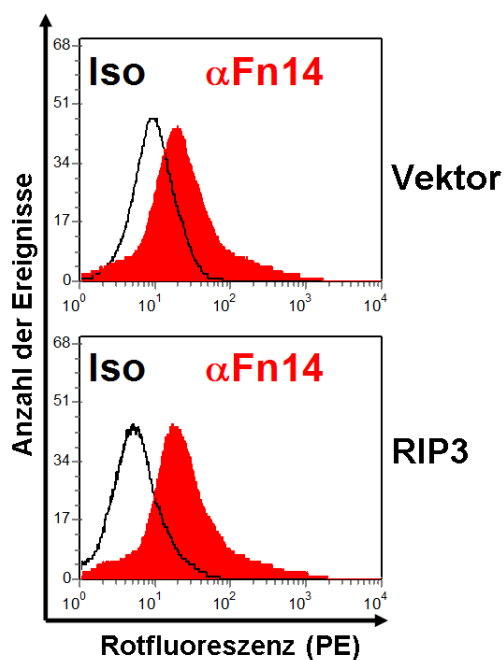
Nachdem Fc-TWEAK in HaCaT-Keratinocyten TRAIL-induziert Nekroptose beförderte wurde zunächst abgeklärt, ob dies auch in einer weiteren Zelllinie, nämlich HT29, der Fall ist. Auch hier zeigte sich dann, dass Fc-TWEAK für die TRAIL-induzierte Nekroptose verstärkend wirkt (Abb. 4.13).



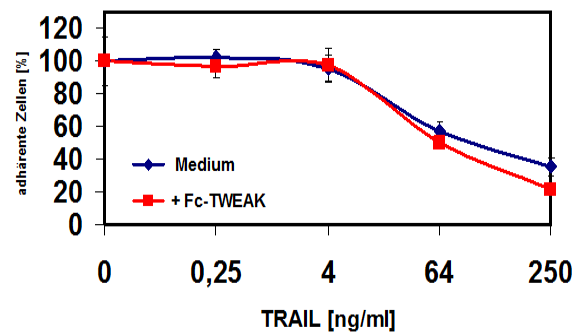
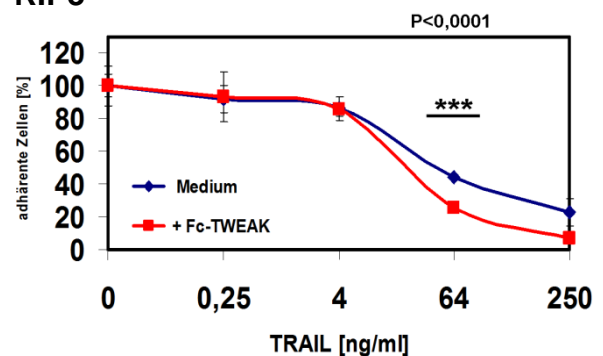
**Abbildung 4.13. Fc-TWEAK sensitiviert HT29 für TRAIL-vermittelten Zelltod.** 10.000 HT29-Zellen wurden in Triplikaten in 96 well-Platten ausgesät, über Nacht mit Kontrollmedium oder 200 ng/mL Fc-TWEAK vorinkubiert, am nächsten Tag mit neuem Medium (+2,5 µg/mL CHX) versehen und in Vierschritten mit TRAIL titriert. Nach 20 Stunden wurden noch adhärenente Zellen mit Kristallviolett gefärbt und die Trübung nach Lösen in Methanol mit dem ELISA-Reader (570 nm) gemessen. Western Blot-Lysate wurden aus 250.000 +/- Fc-TWEAK (200 ng/mL) inkubierten Zellen mit Triton X100-Puffer hergestellt und jeweils 2,5 µg pro Spur aufgetragen.

Weiterhin wurden die bereits beschriebenen HeLa-Leervektor-Zellen mit RIP3-exprimierenden HeLa-Zellen verglichen und analog zu den obigen Versuchen zu HaCaT-Keratinocyten (Abb. 4.12) mit Fc-TWEAK vorbehandelt. Zur Überprüfung, ob diese Linien Fn14 auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurde wiederum eine FACS-Färbung auf Fn14 durchgeführt (Abb. 4.14a). Nach Vorstimulation mit Fc-TWEAK traten in beiden HeLa-Varianten nur wenig sensitivierende Effekte auf (Abb. 4.14), wobei die RIP3-Zellen wiederum signifikant TRAIL-sensitiver waren. Zur Untersuchung einer RIP3-abhängigen, durch Fc-TWEAK-Vorstimulation verstärkten Nekroptose, wurde wiederum mit Inhibitoren gearbeitet (Abb. 4.15).

a.)



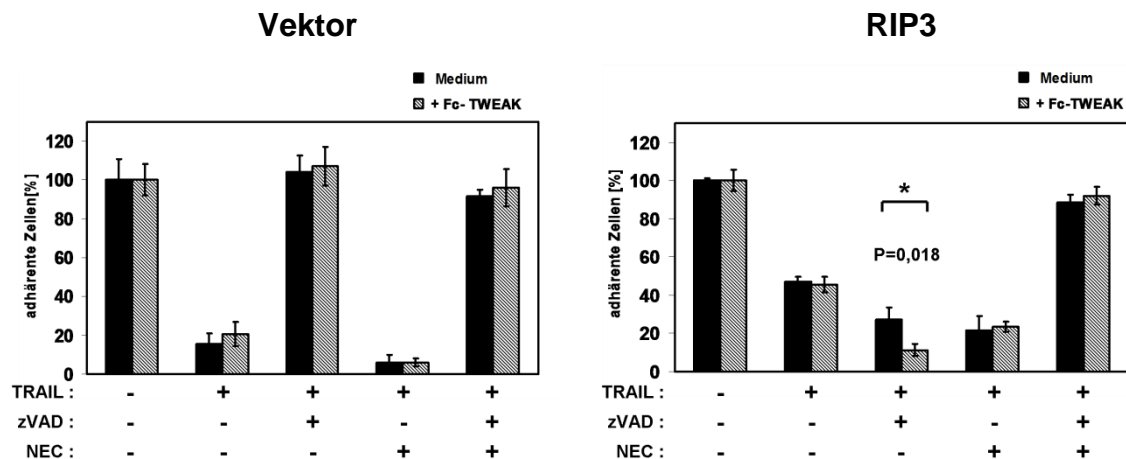
b.)

**Vektor****RIP3**

**Abbildung 4.14. Fc-TWEAK-induzierte Sensitivierung für TRAIL-vermittelten Zelltod in HeLa-Leervektor- bzw. RIP3-Expressionszellen.** a.) Je 100.000 Zellen an HeLa mit Leervektor bzw. HeLa mit RIP3-Expressionsvektor wurden mit Fn14-spezifischem Antikörper bzw. einem Isotypkontrollantikörper inkubiert, sekundär mit Biotin-anti-Maus-IgG markiert und tertiär mit Streptavidin/RPE gefärbt. Messung erfolgte im PerCP-Cy5-5-A-Kanal mittels Durchflusszytometer. b.) Leervektor- bzw. RIP3-Expressionsvektor-transfizierte HeLa in der TRAIL-Titration +/- Vorinkubation mit Fc-TWEAK (200 ng/mL). Je 10.000 Zellen pro Vertiefung wurden in Triplikaten in 96 well-Platten eingesät, vorinkubiert, und am nächsten Tag mit TRAIL titriert. Analyse im Kristallviolettassay.



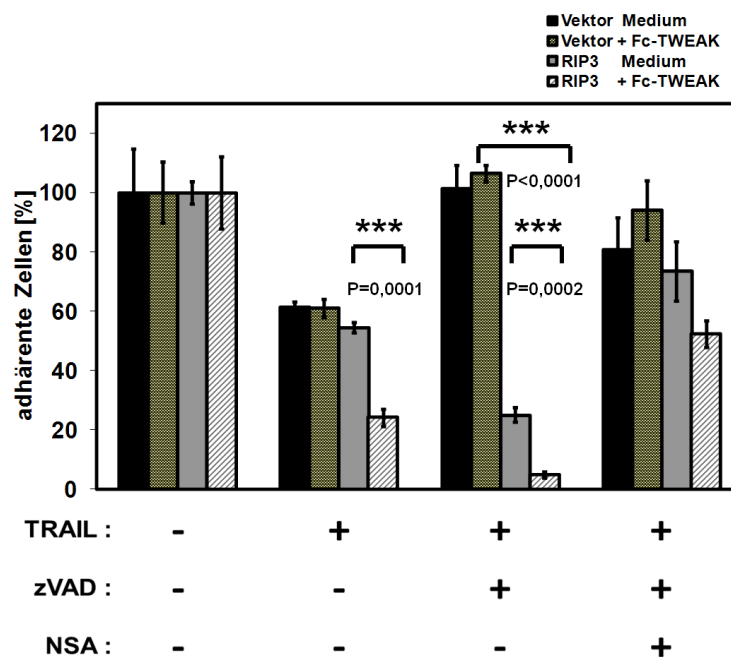
Während sich weiterhin die Leervektorzellen durch Koinkubation mit zVAD-fmk unabhängig von der Fc-TWEAK-Vorinkubation gegen TRAIL-induzierte Apoptose schützen ließen, trat bei den RIP3-Expressionszellen, analog zu den gleichartigen Versuchen mit siRNAs gegen TRAF2, kein Schutz gegen Zelltod ein, sondern im Gegenteil, die Zellen wurden durch zVAD-fmk durch Fc-TWEAK noch stärker sensitiviert. Außerdem wird deutlich, dass im Vergleich der Zellen ohne Fc-TWEAK-gegenüber denen mit Fc-TWEAK-Vorstimulation die RIP3 exprimierenden HeLa-Zellen bei Inkubation mit TRAIL und zVAD-fmk signifikant sensitiver waren, Fc-TWEAK also für einen nichtapoptotischen Zelltod sensitivierte. Dies war abhängig von der RIP3-Expression, da die Sensitivierung bei den Leervektorzellen nicht auftrat. Necrostatin-1 allein, im Gegensatz zur Kombination aus zVAD-fmk und dem RIP1-Inhibitor Necrostatin-1 konnte den TRAIL-vermittelten Zelltod analog zu den anti-TRAF2-RNAi-Versuchen nicht abwenden.



**Abbildung 4.15. Fc-TWEAK sensitiviert RIP3-exprimierende HeLa-Zellen für Nekroptose.** 10.000 Leervektor tragende oder RIP3 exprimierende HeLa-Zellen wurden in Triplikaten in 96 well-Platten ausgesät, vorinkubiert mit Kontrollmedium oder 200 ng/mL Fc-TWEAK. Am nächsten Tag folgten Mediumwechsel, Zugabe der angegebenen Inhibitoren zVAD-fmk (40  $\mu$ M) oder Necrostatin-1 (90  $\mu$ M) oder einer Kombination beider und die Inkubation von TRAIL (64 ng/mL) für 20 Stunden. Noch adhärenente Zellen wurden am nächsten Tag mit Kristallviolett gefärbt und die Trübung der Lösung in Methanol im ELISA-Reader (570 nm) dokumentiert.

Analog zum RIP1-Inhibitor Necrostatin-1 wurde zum Schutz der HeLa-Zellen vor nekroptotischem Zelltod (Abb. 4.15) auch hier der MLKL-Inhibitor Necrosulfonamide (NSA) getestet. NSA war in der Lage, zumindest teilweise TRAIL-induzierten nekroptotischen Zelltod zu verhindern (Abb. 4.16). So sind die RIP3-exprimierenden HeLa-Zellen in der ganz rechten Kolonne (TRAIL+zVAD+NSA) deutlich mehr adhärenent als in der Kolonne ohne NSA (zweite Kolonne von rechts). Durch Einsatz von zVAD-fmk waren nur die Leervektorzellen gegen TRAIL-vermittelten Zelltod

schützbar, während die RIP3 exprimierenden Zellen nekroptotisch wurden, was bei diesen Zellen insgesamt zu einem häufigeren Zelltod führte, als unter apoptotischen (+TRAIL-) Bedingungen (zweite Kolonne von links) und durch die Vorinkubation mit Fc-TWEAK noch verstärkt wurde (zweite Kolonne von rechts, ganz rechts). RIP3-exprimierende HeLa-Zellen waren durch Vorinkubation mit Fc-TWEAK gegenüber TRAIL sensitiviert und signifikant weniger adhären als RIP3-Expressionszellen ohne Vorstimulation mit Fc-TWEAK (zweite Kolonne von rechts). Dieses Phänomen trat mehrmals, aber nicht immer auf in den Versuchen, wo RIP3 exprimierende HeLa-Zellen mit Fc-TWEAK und TRAIL inkubiert wurden. Außerdem lag der durch NSA vermittelte Schutz vor Nekroptose hier bei nur 50-80 %.



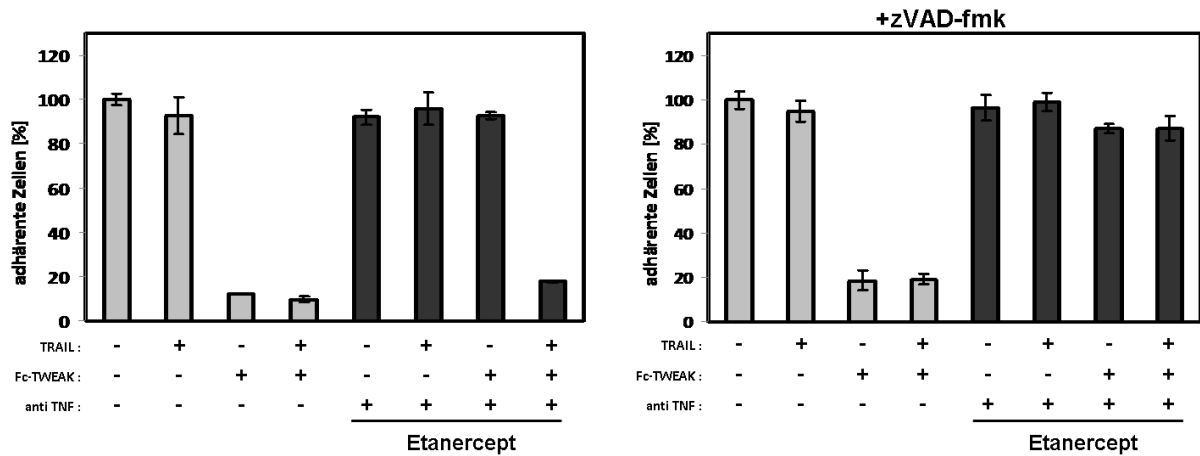
**Abbildung 4.16. Necrosulfonamide schützt HeLa-Zellen partiell vor TRAIL-vermittelter Nekroptose.** 10.000 HeLa-Zellen (Leervektor oder RIP3-Expressionsplasmid tragend) wurden in Triplikaten in 96 well-Platten ausgesät und mit Kontrollmedium oder Fc-TWEAK (200 ng/mL) vorinkubiert. Am nächsten Tag folgten Mediumwechsel, Zugabe von zVAD-fmk (40  $\mu$ M) oder einer Kombination von zVAD-fmk mit Necrosulfonamide (2,5  $\mu$ M) und die Inkubation von TRAIL (64 ng/mL) für 20 Stunden. Adhären gebliebene Zellen wurden am nächsten Tag im Kristallviolettassay analysiert.

#### 4.8 Fc-TWEAK induziert keinen autokrin aktiven Tumornekrosefaktor in HaCaT-Keratinozyten.

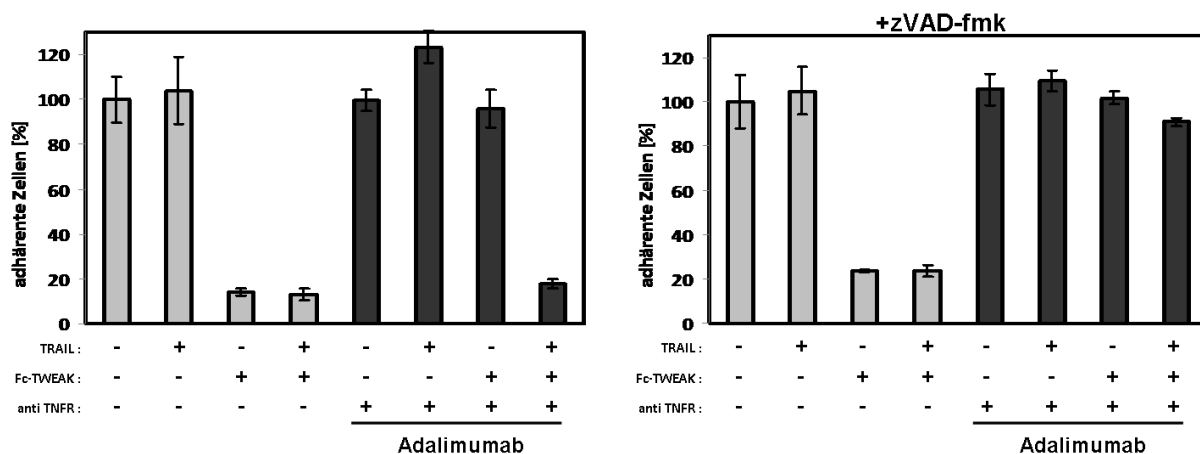
Inkubation mit 200 ng/mL Fc-TWEAK für 20 Stunden vor der eigentlichen Inkubation mit TRAIL in Kombination mit dem Caspaseinhibitor zVAD-fmk (40  $\mu$ M) führte zu einer Sensitivierung von humanen HaCaT-, HT29- und HeLa-RIP3 (Abb. 4.12 ff.) für

Nekroptose. Für die Bindung von TWEAK an seinen Rezeptor Fn14 ist bereits gezeigt worden, dass die beschriebene Rekrutierung von TRAF2 sowie weiterer Proteine und die daraus resultierende NIK-Akkumulation zur Aktivierung des alternativen NF $\kappa$ B-Wegs führen kann.

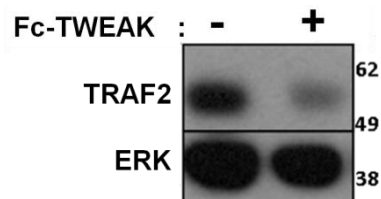
a.)



b.)



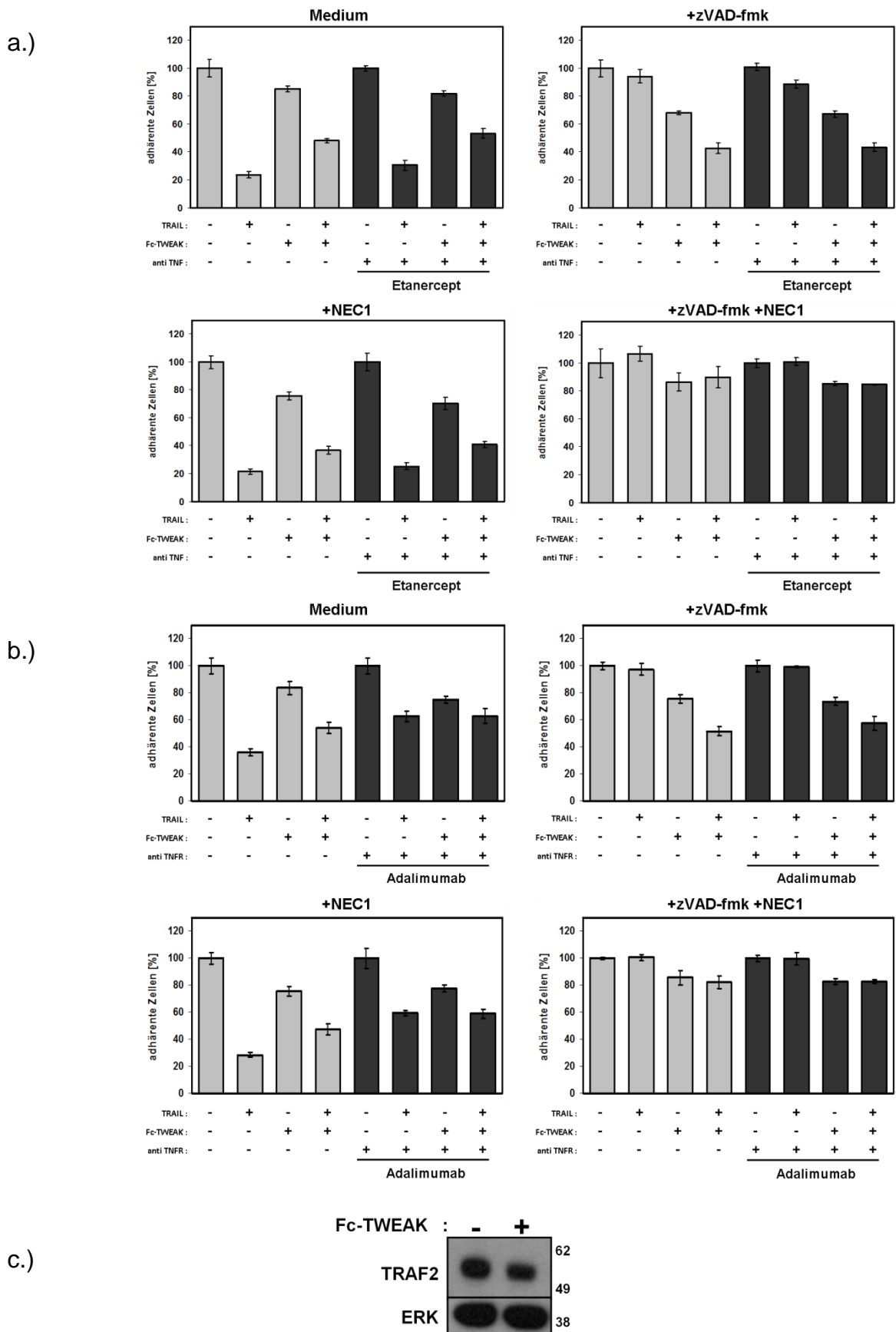
c.)



#### Abbildung 4.17. Fc-TWEAK +/-TRAIL induziert TNF-vermittelten Zelltod in SK-OV-3-Zellen.

10.000 SK-OV-3-Zellen wurden in Triplikaten in 96 well-Platten eingesät, für 16 Stunden mit Normal- oder Fc-TWEAK(200 ng/mL)-Medium vorinkubiert, nach Mediumwechsel mit (a.) Normalmedium oder Medium plus Etanercept (20  $\mu$ g/mL) oder (b.) Medium plus Adalimumab (20  $\mu$ g/mL) oder Medium plus Rituximab (1:1000). Inkubation jeweils ohne (links) oder mit (rechts) zVAD-fmk (40  $\mu$ M) sowie ohne oder mit TRAIL (64 ng/mL) für 20 Stunden. Auswertung erfolgte mittels Kristallviolettassay. c.) Western Blot von Triton X100-Lysaten von je 100.000 Zellen und Färbung gegen TRAF2 bzw. ERK als Ladekontrolle.

Damit ist unter Umständen auch die Produktion von TNF verbunden, sodass Inkubation mit Fc-TWEAK *in vitro* auch die autokrine Stimulation der Zellen mittels TNF zur Folge haben könnte und somit der beobachtete Phänotyp im Kristallviolettassay nicht die Aktivität von TRAIL widerspiegelt. Das Gleiche kann auch für die Verwendung von TRAIL gelten: Stimulation von TRAILR1 / TRAILR2 könnte zur Folge haben, dass autokrin wirkendes TNF gebildet werden würde. So würde nicht TRAIL die Apoptose / Nekroptose induzieren, sondern TNF. Zum Abfangen von möglicherweise gebildetem TNF im Medium wurde (i) löslicher TNF-Rezeptor verwendet in Form des Arzneimittels Etanercept (Enbrel®), ein kommerziell hergestelltes, dimäres Fusionspeptid bestehend aus Fc-Teil eines humanen IgG1 und der Ligandenbindungsdomäne von TNFR2/p75 (chimäres Protein). Zum Blockieren des TNF-Rezeptors wurde (ii) mit Adalimumab (Humira®) ein therapeutischer monoklonaler Antikörper als TNF-Blocker eingesetzt. Um sicherzustellen, dass Adalimumab keinen (unspezifischen) Einfluss auf die Zellen hat, wurde in der Kontrollgruppe ein anderer irrelevanter Antikörper eingesetzt (Rituximab). Neben den Zellen von Interesse mussten auch eine Positivkontrollen verwendet werden, also Zellen, die auf Fn14-Stimulation mit TNF-Synthese und autokriner TNFR-Stimulation, gefolgt von Apoptose / Nekroptose reagieren. Außerdem konnte anhand dieser Zellen auch die Wirkung von Etanercept bzw. Adalimumab überprüft werden. Als solche Positivkontrolle wurden SK-OV-3-Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um eine ovariale Adenokarzinomzelllinie, die durch TWEAK-Stimulation massiv zu TNF-Synthese und -Sekretion angeregt werden kann (Abb. 4.17). Obgleich SK-OV-3-Zellen durch Einsatz von TRAIL kaum in den Zelltod übergehen führt Fc-TWEAK zu über 80 % Adhärenzverlust. Der Einsatz von Etanercept (rechte Diagrammhälfte) kann den allein durch Fc-TWEAK (zweiter von rechts) erzeugten Zelltodphänotyp komplett aufheben. Etanercept schützt demnach die SK-OV-3-Zellen hier vor der Wirkung autokrinen TNFs, der durch Fc-TWEAK-Stimulation entstanden war. Etanercept kann allerdings nicht schützen bei der Doppelinkubation von Fc-TWEAK und TRAIL (64 ng/mL; ganz rechter Balken). Damit wird auch deutlich, dass SK-OV-3-Zellen TRAIL-sensitiv sind und es neben der Wirkung des Fc-TWEAK-induzierten TNFs auch durch TRAIL zum Zelltod kommt. Ein sehr ähnliches Bild ergibt sich für die Inkubation der SK-OV-3-Zellen mit dem Anti-TNFR-Antikörper Adalimumab (Abb. 4.17b links).



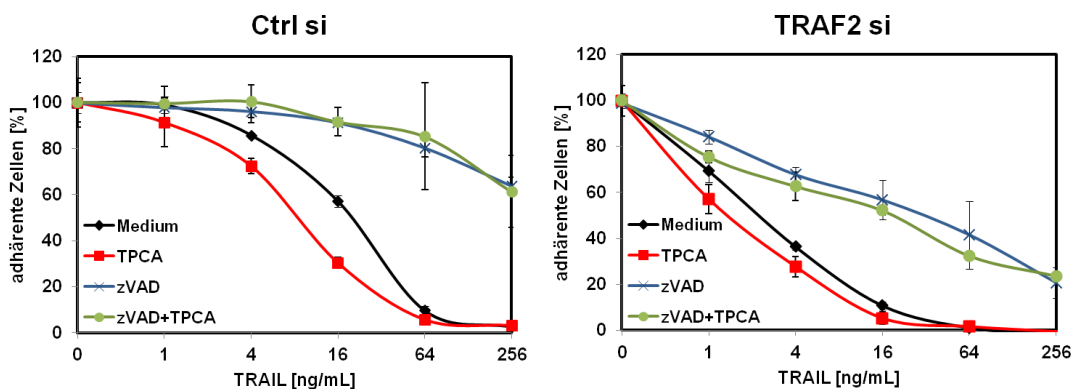
**Abbildung 4.18. Fc-TWEAK -/±TRAIL induziert kein TNF in HaCaT-Keratinocyten.** Versuche durchgeführt wie für Abb. 4.17, aber mit HaCaT-Keratinocyten und zusätzlich, wo angegeben, mit Necrostatin-1 (90 µM) allein oder in Kombination mit zVAD-fmk (40 µM).

Es zeigte sich in Abbildung 4.18, dass in HaCaT-Keratinocyten TNF-Blockade durch Etanercept (a.) als auch Adalimumab (b.) den apoptotischen Crosstalk von Fc-TWEAK und TRAIL nicht beeinflusst. Zusätzlich zu den Inkubationen +/- zVAD-fmk wurde hier auch noch Necrostatin-1 allein und in Kombination mit zVAD-fmk eingesetzt. Weder Etanercept noch Adalimumab zeigen hier Wirkung und da in SK-OV-3-Zellen aber ihre Wirkungsfähigkeit nachgeprüft worden war, steht fest, dass in HaCaT-Keratinocyten aufgrund der Fc-TWEAK(-/+TRAIL)-Inkubation kein autokriner TNF produziert wird.

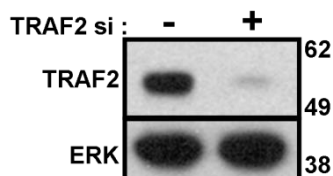
#### 4.9 Knockdown von TRAF2 führt nicht zu kanonischer NF $\kappa$ B-Aktivierung.

Im klassischen NF $\kappa$ B-Signalweg phosphoryliert der IKK-Komplex den Inhibitor von NF $\kappa$ B  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ), was zu dessen Inaktivierung und proteasomalem Abbau führt. Freigewordenes NF $\kappa$ B kann daraufhin in den Zellkern translozieren und als Transkriptionsfaktor verschiedenster Gene wirken, was zu Proliferation, Inflammation und auch z.B. TNF-Induktion führen kann.

a.)



b.)

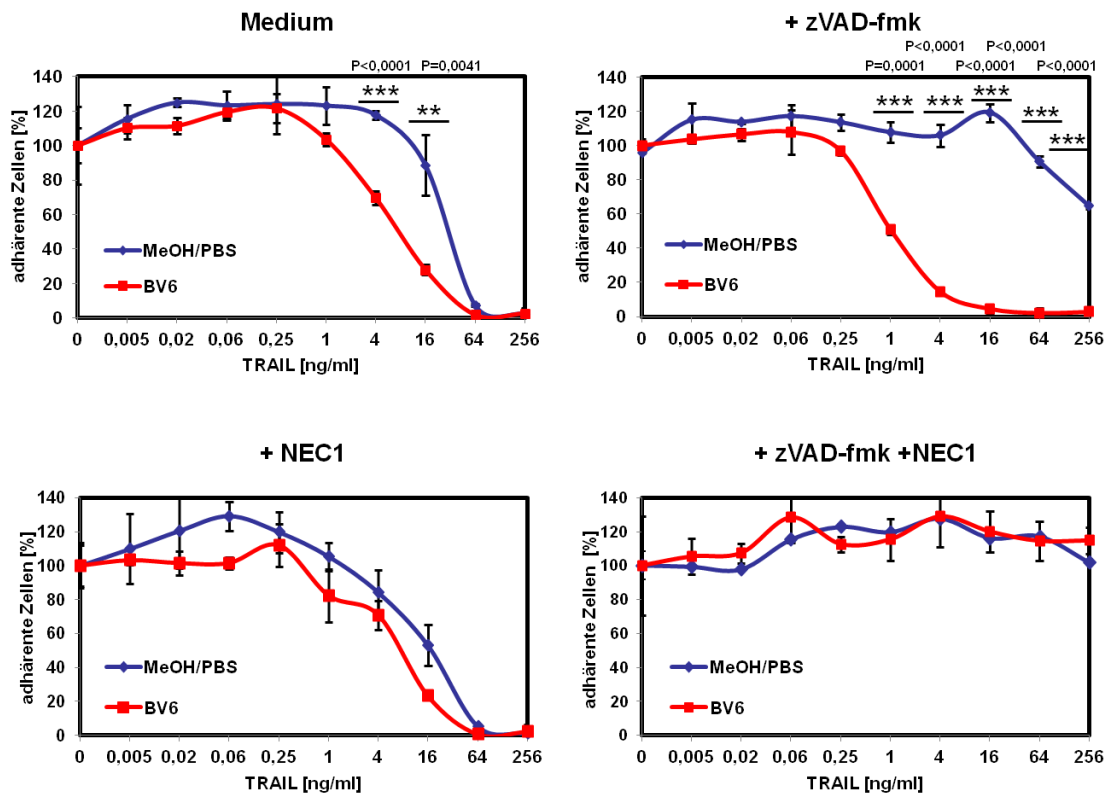


**Abbildung 4.19. TRAF2-Depletion führt nicht zu klassischer NF $\kappa$ B-Aktivierung in HaCaT-Keratinocyten.** a.) HaCaT-Zellen wurden in 60mm-Platten mit Kontroll- oder TRAF2-siRNA transfiziert, am nächsten Tag in 96 well-Platten eingesät und tags darauf mit TRAIL titriert. b.) Western Blot der transfizierten HaCaT-Keratinocyten: 100.000 mit Kontroll- oder TRAF2-siRNA transfizierte Zellen wurden mit Triton X100-Puffer lysiert und im Western Blot analysiert mittels spezifischem TRAF2-Antikörper. ERK dient als Ladekontrolle. Eines von zwei durchgeführten Experimenten.

Um auszuschließen, dass RNAi gegen TRAF2 den klassischen NF $\kappa$ B-Signalweg und die Ergebnisse TRAF2 betreffend beeinflusst, wurde mit TPCA-1 eine Inhibition des klassischen NF $\kappa$ B-Signalweges durchgeführt. [5-(p-Fluorophenyl)-2-ureido]-thiophen-3-carboxamid (TPCA-1) ist ein IKK2-Inhibitor, der die Phosphorylierung und den daraus folgenden Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  und die klassische Aktivierung von NF $\kappa$ B verhindert. Während HaCaT-Keratinocyten, die mit einer irrelevanten Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, durch Einsatz von zVAD-fmk bis zu 70 % adhären bleiben (Abb. 4.19a links), bewirkt Knockdown von TRAF2 die Sensitivierung für Nekroptose unter Caspase-inhibierenden Bedingungen (rechtes Diagramm). Es zeigt sich, dass die Anwesenheit von TPCA-1 keine nennenswerte Veränderung der Kurven bewirkt. Damit wird deutlich, dass Knockdown von TRAF2 nicht durch kanonische NF $\kappa$ B-Aktivierung den TRAIL-induzierten Zelltod verstärkt.

#### **4.10 Das SMAC-Mimetikum BV6 sensitiviert HaCaT-Keratinocyten für TRAIL-vermittelte Apoptose und Nekroptose.**

Der Second mitochondria-derived activator of caspases (SMAC), auch als Direct IAP binding protein with low pI (DIABLO), bekannt, ist ein mitochondriales Protein, welches, ähnlich Cytochrom c, in apoptotischen Zellen vom Mitochondrium ins Zytoplasma transportiert wird und dort XIAP und cIAP1 und cIAP2 hemmt und so den programmierten Zelltod verstärkt. Moleküle, die diese IAP-antagonistische Eigenschaft von SMAC/DIABLO nachahmen, werden als SMAC mimetics bezeichnet und für einen Einsatz in der Krebstherapie entwickelt. BV6 ist ein solches Mimetikum und wurde entweder allein oder in Kombination mit zVAD-fmk als Pancaspaseinhibitor und/oder Necrostatin-1 als RIP1-Inhibitor eingesetzt (Abb. 4.20) und hinsichtlich seiner TRAIL-sensitivierenden Wirkung untersucht. Im Ansatz ohne weitere Inhibitoren oder mit Necrostatin zeigte BV6 eine für TRAIL-vermittelten Zelltod leicht sensitivierende Wirkung. In Anwesenheit von zVAD-fmk hing es an einer starken Sensitivierung der TRAIL-induzierten Apoptose zu beobachten. Das entspricht den Ergebnissen mit TRAF2-Knockdown und TWEAK-Priming und legt nahe, dass TRAF2 und cIAPs, die ja miteinander interagieren können, gemeinsam die TRAIL-induzierte Nekroptose inhibieren.



**Abbildung 4.20. Das SMAC-Mimetikum BV6 sensitiviert HaCaT-Keratinocyten für Apoptose und Nekroptose.** 10.000 Zellen pro Vertiefung wurden in 96 well-Platten eingesät und über Nacht mit Medium plus BV6 (10  $\mu$ M) oder Medium plus eine 1:1-Mischung von Methanol und PBS (Lösungsmittel von BV6). Nach 16 Stunden erfolgte Mediumwechsel unter Ab- bzw. Anwesenheit der angegebenen Inhibitoren zVAD-fmk (40  $\mu$ M), Necrostatin-1 (90  $\mu$ M) oder einer Kombination beider. Nach 20 Stunden erfolgte ein Kristallviolettassay.

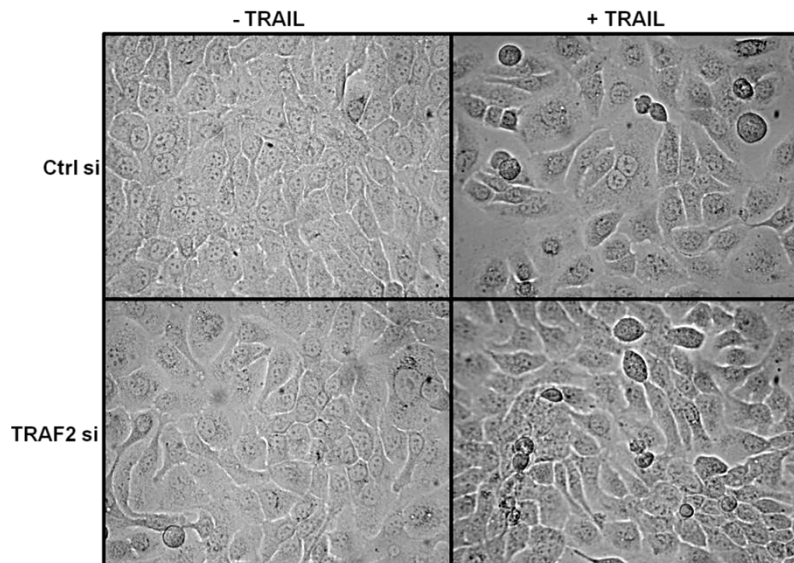
#### 4.11 Immunpräzipitation von Caspase 8-Komplexen.

Es wurde in mit Kontroll- bzw. TRAF2-siRNA transfizierten HaCaT-Keratinocyten durch TRAIL plus zVAD-fmk Nekroptose induziert und dann wurden mittels eines p18-Fragment-spezifischen Antikörpers ausgehend von Zelllysaten Immunpräzipitationen von Caspase 8 durchgeführt. In Abb. 4.21a sieht man einen optischen Vergleich der später lysierten und für die IP verwendeten Zellen. Nach fünf Stunden TRAIL sind bei den Kontroll-siRNA-Transfektanten einige (oben rechts) und bei den TRAF2-Knockdown-Zellen (unten rechts) mehrere tote Zellen zu sehen (mittig und links unten). Die Inkubation fand in Anwesenheit von zVAD-fmk statt, so dass der beobachtete Zelltod nekroptotischer Art sein muss. Abb. 4.21b zeigt den Western Blot der Immunpräzipitation. Deutlich zu erkennen ist, dass TRAF2 als auch cIAP1 und cIAP2 in der IP stark verringert sind, was mit der beobachteten Sensitivierung im Kristallviolettassay unter nekroptotischen Bedingungen korreliert.

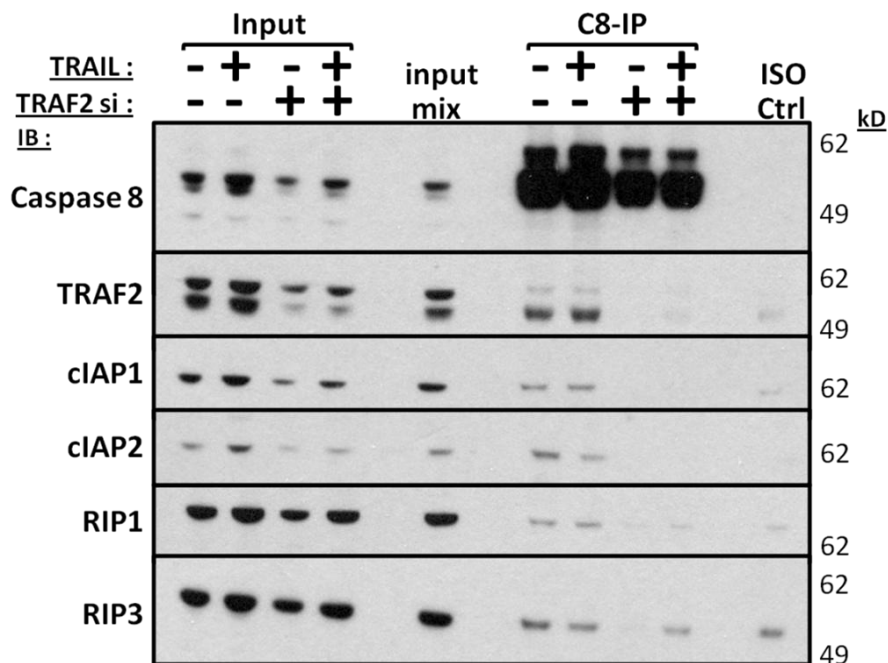


Die Signale von RIP1 und RIP3 sind wenig oder gar nicht verändert in den unterschiedlichen Bedingungen bzw. die Signale sind etwas stärker im Vergleich zu denen der cIAPs und von TRAF2 und Caspase 8.

a.)



b.)



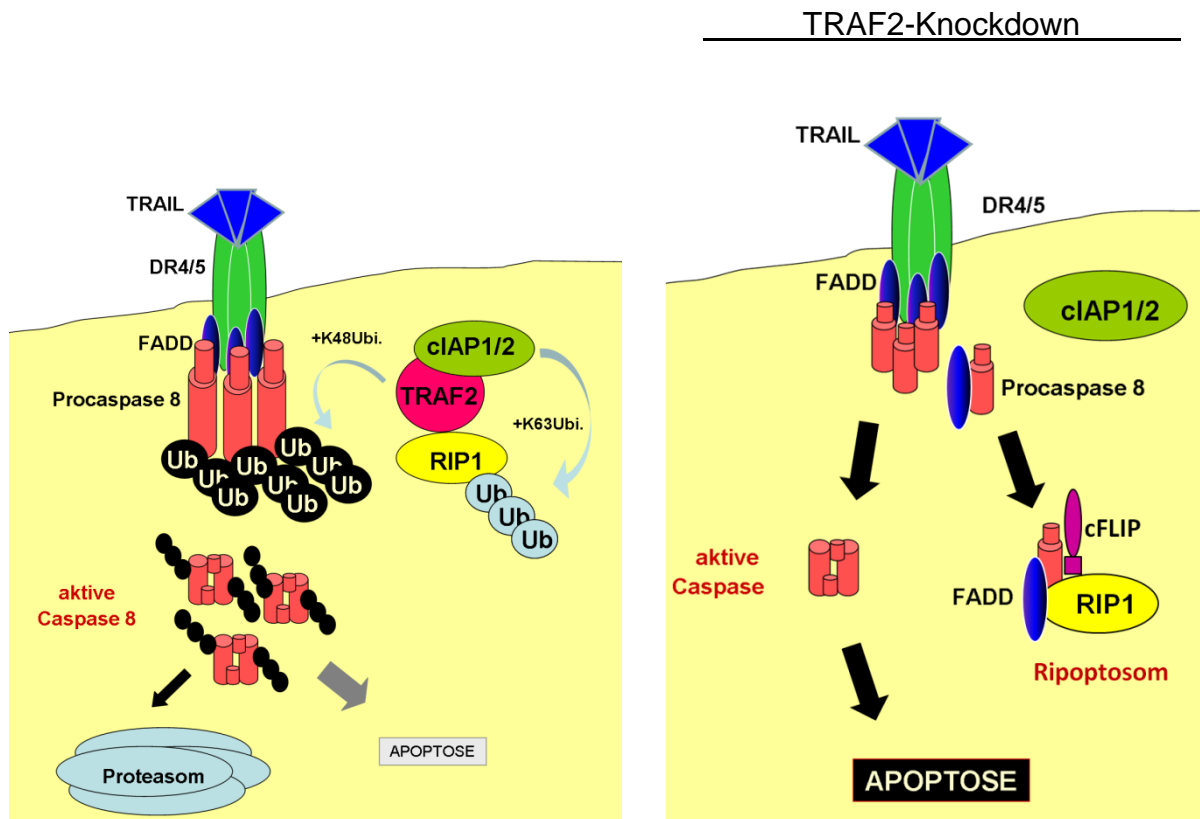
**Abbildung 4.21. Immunpräzipitation von Caspase 8 – Knockdown von TRAF2 depletiert TRAF2, cIAPs sowie RIP1 und RIP3 aus der Koimmunopräzipitation mit Caspase 8.** a.) Lichtmikroskopie (400-fache Vergrößerung) der für die IP verwendeten HaCaT-Zellen unter den indizierten Bedingungen. Jeder Ansatz wurde aus einer zu 90 % dichtgewachsenen p145-Zellkulturschale generiert und mit zVAD-fmk (40 µM) eine Stunde vorinkubiert sowie +/- TRAIL (1000 ng/mL) final für 5 Stunden stimuliert. Die Zellen waren 48 Stunden zuvor mit Kontroll- oder TRAF2-siRNA transfiziert worden. Die Lyse erfolgte mit Triton X100-Puffer. b.) Ergebnis der Caspase 8-Immunpräzipitation mit einem Ziege-anti-p18-Antikörper bzw. einer Ziege-anti-humanIgG-Antikörperkontrolle. Eines von zwei Experimenten ist dargestellt.

## 5. Diskussion

TRAF2 ist ein Adaptormolekül, das cIAP1 und cIAP2 sowohl an die intrazelluläre Domäne von TNFR1 rekrutieren kann (Shu et al. 1996) als auch zu weiteren Todesrezeptoren (Hu et al. 2000; Trauzold et al. 2005) und Nicht-Todesrezeptoren (Davies et al. 2005; Pullen et al. 1999). Dabei spielt TRAF2 eine Rolle in der klassischen NF $\kappa$ B-Aktivierung und bei der JNK-Aktivierung. Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass TRAF2 für die konstitutive Degradation der MAP3-Kinase NIK verantwortlich ist (Abb. 4.12a) und so alternatives NF $\kappa$ B-Signalling inhibiert (Vallabhapurapu et al. 2008; Abb. 1.5). Die TRAF2-rekrutierenden Rezeptoren sind durch TRAF2-Depletion aus dem Zytosol in der Lage, die Degradation von NIK abzuwenden und aktivieren so den alternativen NF $\kappa$ B-Signalweg. Außerdem kann eine Zelle durch die TRAF2-Depletion auch für die TNF-vermittelte Apoptose sensitiviert werden, da so die Rekrutierung der TRAF2-cIAP1-Komplexe an den TNFR1 reduziert wird (Fotin-Mleczek et al. 2002; Vince et al. 2008; Wicovsky et al. 2009).

### 5.1 TRAF2 als Antagonist von Apoptose und Nekroptose in der TRAIL-Signaltransduktion.

Im Kontext der TRAIL-Todesrezeptor-Signaltransduktion wurde bereits gezeigt, dass TRAF2 als K48-E3-Ubiquitinligase für an den DISC rekrutierte Caspase 8 wirken kann und so deren p18-Untereinheit für den proteasomalen Abbau markieren kann (Gonzalvez et al. 2012). Die vorliegende Arbeit behandelt die Rolle von TRAF2 vor allem im Kontext der TRAIL-Signaltransduktion. Es zeigte sich, dass ein Knockdown von TRAF2 die Sensitivität von HaCaT-Keratinocyten gegenüber TRAIL massiv erhöht und deren LC50 um mehr als eine Größenordnung herabsetzt (Abb. 4.2a). Die Verwendung des Pancaspaseinhibitors zVAD-fmk zur Blockade der Apoptose zeigte unter TRAF2-Knockdown-Bedingungen nur einen teilweisen Schutz gegenüber TRAIL (Abb. 4.3a+c), während die mit Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen fast vollkommen schutzbar waren. Deshalb kann angenommen werden, dass nicht nur eine bloße Sensitivierung gegenüber TRAIL stattgefunden hatte, sondern dass sich die Qualität des induzierten Zelltods zumindest teilweise geändert hatte.



**Abbildung 5.1. Modell zur Sensitivierung für Apoptose durch Knockdown von TRAF2.** Links: ohne Knockdown von TRAF2 wirkt dieses sowohl als Adaptor für cIAP1/2 und RIP1 als auch als K48-Ubiquitinligase für Caspase 8, was die Aktivität letzterer herabsetzt, da nach TRAIL-Stimulation gebildete und durch TRAF2 K48-ubiquitinierte Caspase 8-Heterotetramere eine kürzere Halbwertszeit haben und für den proteasomalen Abbau markiert sind. Rechts: Knockdown von TRAF2 führt zum Fehlen der Adaptorfunktion für cIAP1/2 und RIP1, wodurch RIP1 nicht K63-ubiquitiniert ist und es zur Bildung des ebenfalls Caspase 8-aktivierenden Ripoptosoms kommen kann. Außerdem liegt durch TRAF2-Knockdown eine geringere / fehlende K48-Polyubiquitinierung von an den DISC rekrutierter Procaspase 8 vor, wodurch aktivierte Caspase 8 folglich eine längere Halbwertszeit aufweist, was die dokumentierte TRAF2-Knockdown-Sensitivierung nach TRAIL-Stimulus erklären würde. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Erst die zusätzliche Verwendung des RIP1-Inhibitors Necrostatin-1 (Abb. 4.3c) konnte die Zellen unter TRAF2-Knockdownbedingungen in der Anwesenheit von zVAD-fmk vor dem TRAIL-vermittelten Zelltod schützen. Necrostatin-1 allein war dabei nicht in der Lage vor TRAIL zu schützen, was dafür spricht, dass sich die Qualität des beobachteten Zelltods geändert hatte, weg von einer Caspaseabhängigkeit hin zu einer Caspase 8- und/oder RIP1/RIP3-Abhängigkeit. Dass es sich bei einer TRAF2-spezifischen Sensitivierung nicht nur um ein HaCaT-Keratinocyten betreffendes Phänomen handelt, wurde dadurch belegt, dass ähnliche Daten auch in primären Keratinocyten (Karl et al. 2014) und in HeLa-Zellen erhalten wurden (Abb. 4.4a). HeLa-Zellen konnten aber durch Einsatz von zVAD-fmk völlig

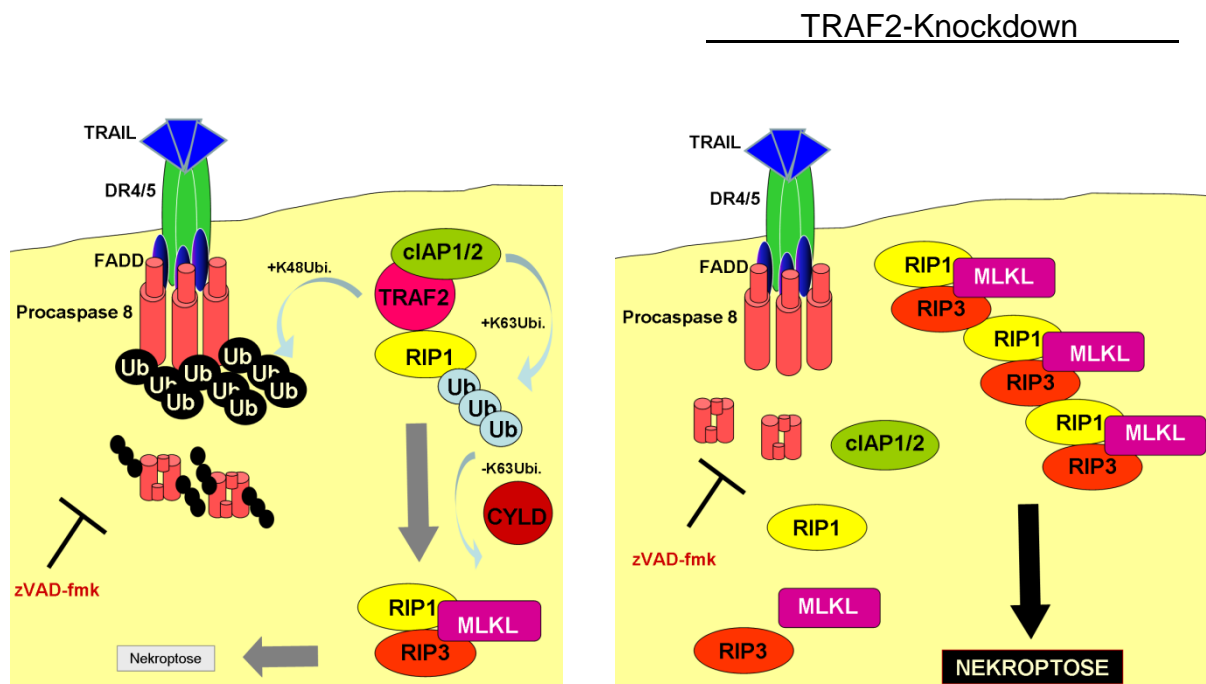
gegenüber TRAIL auch bei TRAF2-Knockdown geschützt werden (Abb. 4.4b). Dies korreliert aber damit, dass HeLa-Zellen, anders als HaCaT-Zellen, keine RIP3-Expression aufweisen (Abb. 4.5d), womit ihnen eines der Schlüsselenzyme (Zhao et al. 2012) für den Caspase-unabhängigen nekroptotischen Zelltod fehlt. Um die Abhängigkeit von der RIP3-Expression zu belegen, wurden HeLa-Zellen, die mit einem Kontrollvektor oder aber einem RIP3-Expressionsvektor transfiziert worden waren, miteinander verglichen. Bereits morphologisch wurde die RIP3-abhängige Nekroptose nach TRAIL-Stimulation unter Anwesenheit des Pancaspaseinhibitors zVAD-fmk deutlich, wie Abb. 4.5b+c belegen: während zVAD-fmk schützend bei HeLa-Leervektorzellen wirkte, wurde eine Sensitivierung der RIP3-exprimierenden Zellen sichtbar. Dass es sich auch hier um Nekroptose handelte, wurde unter anderem auch durch den MLKL-Inhibitor Necrosulfonamide (Sun et al. 2012) bestätigt: die RIP3-exprimierenden HeLa-RIP3 und HT29 waren im Gegensatz zu den nicht in die Nekroptose gehenden HeLa-Leervektorzellen NSA-dosisabhängig schützbare (Abb. 4.6). Es ist belegt, dass RIP3 durch RHIM-abhängige Rekrutierung von RIP1 in einem Caspase 8-, FADD- und cFLIP-haltigen Komplex Apoptose induzieren kann, unabhängig von der Kinaseaktivität von RIP3 und unabhängig von MLKL (Mandal et al. 2014). Dieses Modell würde den hier gemachten Befund erklären. So wäre RIP3 nicht nur ein essentieller Bestandteil des Nekroptosoms im Komplex mit RIP1 und MLKL, sondern auch Adaptorprotein für RIP1 in Hinblick auf den genannten Caspase 8-aktivierenden Komplex. Vor diesem Hintergrund könnte eine relativ hohe Expression von RIP3 auch eine höhere basale Aktivität von Caspase 8 zur Folge haben. Wie sich zeigte, waren RIP3-exprimierende HeLa-Zellen sensitiver gegenüber TRAIL-vermitteltem Zelltod, wenn TRAF2 Knockdown vorlag (Abb. 4.8). Es wurde grob folgende Abstufung in der TRAIL-Sensitivität beobachtet:

**Adhärenz :**

**[HeLa VE] > [HeLa VE TRAF2 si] ≈ [HeLa RIP3] > [HeLa RIP3 TRAF2 si]**

Unter nekroptotischen Bedingungen (TRAIL + zVAD-fmk) erwies sich für die HeLa-RIP3-Zellen Ähnliches wie für die nativ RIP3-exprimierenden HaCaT-Keratinocyten:

eine Sensitivierung für Nekroptose, wenn TRAF2 siRNA-vermittelt depletiert wurde (Abb. 4.10). Diese Sensitivierung wurde erst durch den RIP1-Inhibitor Necrostatin-1 oder den MLKL-Inhibitor Necrosulfonamide (Abb. 4.11) aufgehoben. Damit wird evident, dass Knockdown von TRAF2 die genannten Zellen nicht nur für Apoptose sensitiviert, sondern auch für Nekroptose, sofern diese über das dafür nötige Protein-Repertoire verfügen. Im Umkehrschluss ist TRAF2 also ein Antagonist von beidem: Apoptose und Nekroptose. Durch Einsatz von wildtypisch RIP3-negativen HeLa-Zellen im Vergleich zu HeLa-RIP3- und HaCaT-Keratinocyten als auch HT29-Zellen (Abb. 4.6) wird hier außerdem die essentielle Bedeutung von RIP3 als positiver Nekroptoseregulator bestätigt. Ein Modell zur Bedeutung eines Knockdowns von TRAF2 unter apoptotischen Bedingungen zeigt Abbildung 5.1. Ein Modell zur Wirkung eines Knockdowns von TRAF2 unter nekroptotischen Bedingungen zeigt Abbildung 5.2.

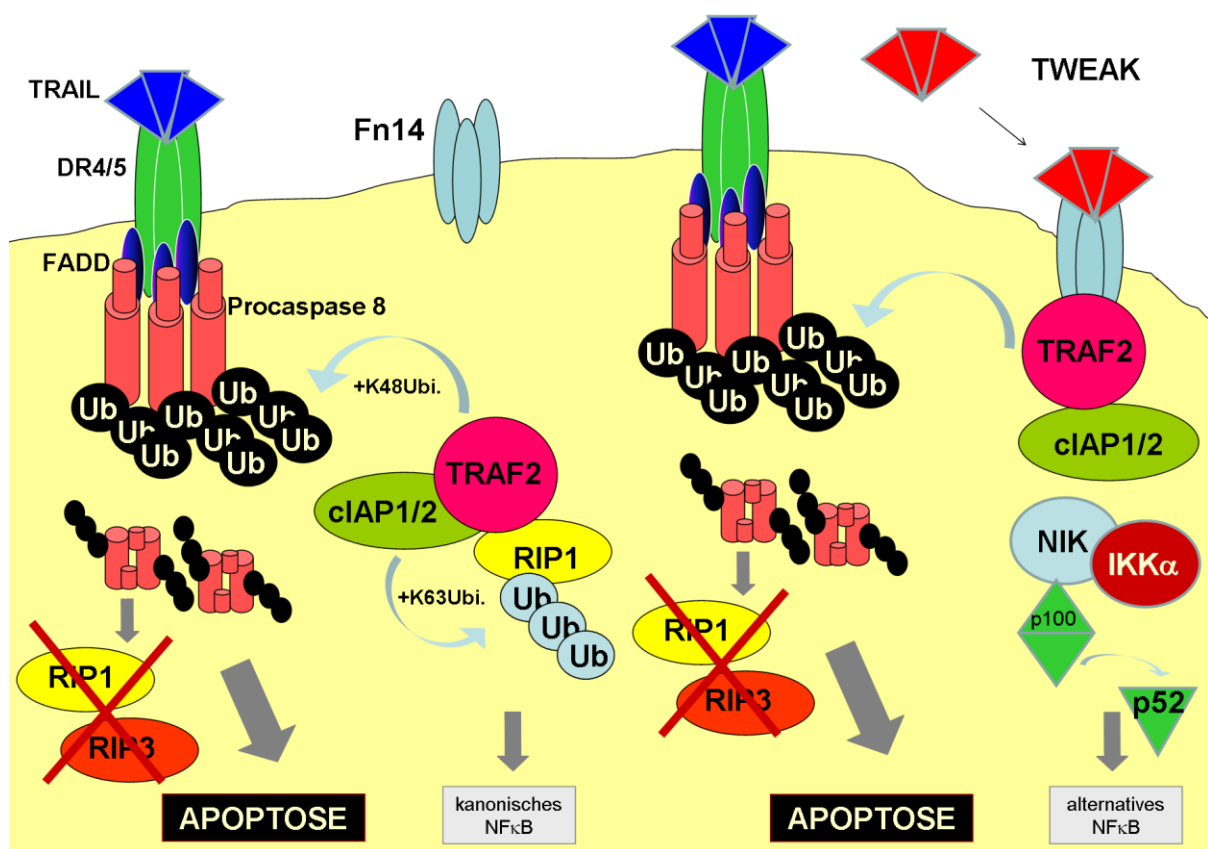


**Abbildung 5.2. Modell zur Sensitivierung für Nekroptose durch Knockdown von TRAF2.** Links: TRAF2 wirkt als Adaptor für cIAP1/2 und RIP1 und außerdem als K48-Ubiquitinligase für Caspase 8. Die Caspase 8-Aktivität wird durch zVAD-fmk inhibiert, wodurch weder RIP1, RIP3 noch CYLD gespalten werden. RIP1 wird vermehrt CYLD-abhängig deubiquitiniert, aggregiert folglich mit RIP3 und MLKL und leitet letztlich die TRAIL-induzierte Nekroptose ein. Rechts: durch Knockdown von TRAF2 fehlt nicht nur die K48-Polyubiquitinierung von an den DISC rekrutierten Procaspase 8-Molekülen, sondern auch die Rekrutierung von cIAP1/2 zu RIP1. Dadurch ist RIP1 nicht K63-polyubiquitiniert und bindet vermehrt RIP3 und MLKL. Es kommt zu einer verstärkten Nekroptose, die aufgrund der zVAD-fmk-inhibierten Caspase 8 auch nicht durch Proteolyse von RIP1, RIP3 und CYLD aufgehalten werden kann. Nähere Erläuterungen siehe Text.

## 5.2 Die Bedeutung Fc-TWEAK-medierter TRAF2-Depletion für die TRAIL-induzierte Apoptose und Nekroptose.

Über TRAF2 wurde in der Fachliteratur vor allem im Kontext der NF $\kappa$ B-Aktivierung berichtet und die damit verbundenen anti-Zelltod-Funktionen erforscht. TRAF2 mediert kanonisches NF $\kappa$ B-Signalling, was zur vermehrten Expression antiapoptotischer und antinekrotischer Proteine (c-FLIP, Ferritin heavy chain) führt (Kreuz et al. 2001; Pham et al. 2004). Darüber hinaus wird aber auch immer deutlicher, dass TRAF2 gemeinsam mit cIAP1 und cIAP2 unabhängig von NF $\kappa$ B Zelltod-antagonistisch aktiv ist. So konnten Fotin-Mleczek et al. 2002 zeigen, dass TNFR2-Stimulation zur Depletion von TRAF2 und cIAP1/2 führt, was eine „Beschleunigung“ TNFR1-abhängiger Caspase 8-Aktivierung zur Folge hatte. Dies führte aber nicht zu einer Inhibition TNFR1-vermittelter NF $\kappa$ B-Aktivierung, was zu erwarten gewesen wäre, würde TRAF2 essentiell für TNFR1-bedingte NF $\kappa$ B-Aktivierung sein. Tatsächlich wurden cIAP1 und cIAP2 für den TNF-Signalweg als K63-polyubiquitinerende Enzyme von RIP1 beschrieben (O'Donnell et al. 2007) und 2012 konnten Gonzalez et al. TRAF2 als K48-Ubiquitinligase für Caspase 8-p18-Untereinheiten nach TRAIL-Stimulus beschreiben und damit erstmals eine direkte antiapoptotische Aktivität von TRAF2 nachweisen. Diese Daten unterstützen das in der vorliegenden Arbeit Gefundene, dass nämlich Knockdown von TRAF2 in einer Sensitivierung der Zellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose resultiert. Außerdem konnten wir (Karl et al. 2014) analog zu Experimenten mit TRAIL auch eine TRAF2-Knockdown-abhängige Sensitivierung für CD95L-vermittelte Apoptose in HaCaT- als auch primären Keratinozyten zeigen. Diese von cIAP1/2 unabhängige Funktion von TRAF2 als Caspase 8-Aktivität-limitierendes Enzym könnte außerdem erklären, warum in Experimenten, in denen TRAF2 durch Fn14-Stimulation mittels Fc-TWEAK depletiert wurde (HaCaT: Abb. 4.12; HeLa-VE / HeLa-RIP3 Abb. 4.14 u. Abb. 4.15), kaum die Apoptose verstärkt wurde, obwohl durch Fc-TWEAK der zytosolische Pool von TRAF2-cIAP1/2 depletiert wird. Auch das cIAP1 und cIAP2 degradierende SMAC-Mimetikum BV6 war im Übrigen nicht in der Lage, die Apoptose von HaCaT-Keratinozyten nennenswert zu verstärken (Abb. 4.20), während es unter nekroptotischen Bedingungen massiv den Zelltod förderte. In

beiden Fällen (Fc-TWEAK und BV6) war die Aktivität von TRAF2 als K48-Ubiquitinligase nicht inhibiert, anders als beim Knockdown von TRAF2, weshalb die Apoptose-inhibierende Funktion von TRAF2 zumindest teilweise auf dessen K48-Ubiquitinligasefunktion zurückzuführen sein könnte. Einsatz von Fc-TWEAK führte zur Akkumulation von NIK und alternativem NF $\kappa$ B-Signalling (Abb. 4.12a), jedoch nicht zu verstärkter TRAIL-abhängiger Apoptose. Teilweise wurden sogar schwache schützende Effekte, vermutlich durch Fc-TWEAK-abhängige NF $\kappa$ B-Aktivierung, dokumentiert (Abb. 4.12d zweites Säulenpaar von links). Damit hat die Verwendung von Fc-TWEAK in einem TRAIL-Kontext andere Konsequenzen als bei TNF, denn nach Fc-TWEAK-Priming steigt die Sensitivierung für TNF-induzierten Zelltod um das 200- bis 1000-Fache (Wicovsky et al. 2009).



**Abbildung 5.3. Modell TRAIL-abhängiger Apoptose in Ab- und Anwesenheit von TWEAK.** Links: Bindung von TRAIL führt zur Aktivierung von Caspase 8 am DISC, wobei die K48-Ubiquitinligaseaktivität von TRAF2 Procaspase 8 für proteasomale Degradation markiert. TRAF2 wirkt außerdem als Adaptor für cIAP1/2, wodurch RIP1 K63-polyubiquitiniert wird. Aktive Caspase 8 restringiert RIP1 und RIP3 und es findet Apoptose statt. Der TRAF2-cIAP1/2-Komplex degradiert NIK und induziert kanonisches NF $\kappa$ B-Signalling. Rechts: Bindung von TWEAK an Fn14 rekrutiert TRAF2-cIAP1/2 an die Zellmembran, was zur Akkumulation von NIK im Zytosol führt und alternatives NF $\kappa$ B-Signalling induziert. Da die Caspase 8-Aktivierung im TRAIL-Kontext anders als bei TNF an der Zellmembran stattfindet, kann TRAF2 Caspase 8 nach TRAIL-Stimulation auch unter TWEAK-Anwesenheit K48-polyubiquitiniert und es findet eine ähnlich starke Apoptose statt wie ohne TWEAK. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Eine Übersicht über die Bedeutung von TWEAK für TRAIL-induzierte Apoptose liefert Abbildung 5.3. Unter Anwesenheit des Pancaspaseinhibitors zVAD-fmk führte Fc-TWEAK-Vorstimulation zu einer massiv gesteigerten TRAIL-induzierten Nekroptose (Abb. 4.12b, Abb. 4.12d Mitte), sofern die behandelten Zellen RIP3 exprimierten. Die Tatsache, dass Fc-TWEAK-Vorstimulation zwar bei TNF sowohl zu einer Sensitivierung für Apoptose als auch zu einer Sensitivierung für Nekroptose führt, jedoch bei TRAIL lediglich sensitivierend für den nekroptotischen Zelltod ist, könnte durch die Unterschiede beider Signalwege in der Induktion der Apoptose erklärt werden. Durch TRAIL wird Caspase 8 hauptsächlich im primären Membran-assoziierten Rezeptorsignalkomplex aktiviert, unabhängig von RIP1. Bei TNF hingegen, erfolgt die Caspase 8-Aktivierung in einem sich sekundär nach TNFR1-Stimulation bildenden zytosolischen Komplex, bestehend aus RIP1, Caspase 8 und FADD. Da dieser Komplex, bzw. Teile von ihm, auch mit RIP3 interagieren und so Nekroptose stimulieren, könnte so auch erklärt werden, warum die Verwendung des SMAC-Mimetikums BV6 kaum Einfluss auf die TRAIL-induzierte Apoptose hat, jedoch massiv Nekroptose fördert (Abb. 4.20). Für Fc-TWEAK musste geklärt werden, ob es direkt für die TRAIL-induzierte Nekroptose sensitiviert ob es durch parakrin / autokrin produziertes TNF die TRAIL-Apoptose verstärkt. Durch TWEAK induzierter, TNF-vermittelter Zelltod wurde tatsächlich bereits beobachtet (Schneider et al. 1999) und ist auch bei SK-OV-3-Zellen der Fall, die als Kontrolle verwendet wurden (Abb. 4.17). Der TWEAK-induzierte, sekundär durch TNF-vermittelte Zelltod konnte durch Einsatz löslichen TNF-Rezeptors (Enbrel®; Etanercept) als auch durch den TNF-Blocker Adalimumab (Humira®) inhibiert werden. Hinsichtlich der Relevanz Fc-TWEAK-induzierter Produktion von TNF konnte für HaCaT-Keratinocyten klargestellt werden, dass es sich bei der beobachteten Sensitivierung nicht um einen sekundären TNF-Effekt handelte, da weder Etanercept noch Adalimumab Einfluss auf das Überleben der Zellen hatten (Abb. 4.18). Dies galt ebenso für analoge Experimente mit CD95L statt TRAIL (Karl et al. 2014) in HaCaT als auch parallel in HeLa-Leervektorzellen und HeLa-RIP3 (nicht gezeigt). Sowohl im Kontext des TRAF2-Knockdowns als auch bei TRAF2-Depletion mittels Fc-TWEAK sind RIP3-exprimierende Zellen im Vergleich zu RIP3-defizienten Zellen meist stärker sensitiviert für TRAIL-vermittelten Zelltod. Dies gilt für RIP3 exprimierende HeLas im Knockdownexperiment (Abb. 4.8 und Abb. 4.10) bzw. im Fc-TWEAK-Experiment (Abb. 4.14 und Abb. 4.15) als auch in HT29, die RIP3-vermittelt stark in die



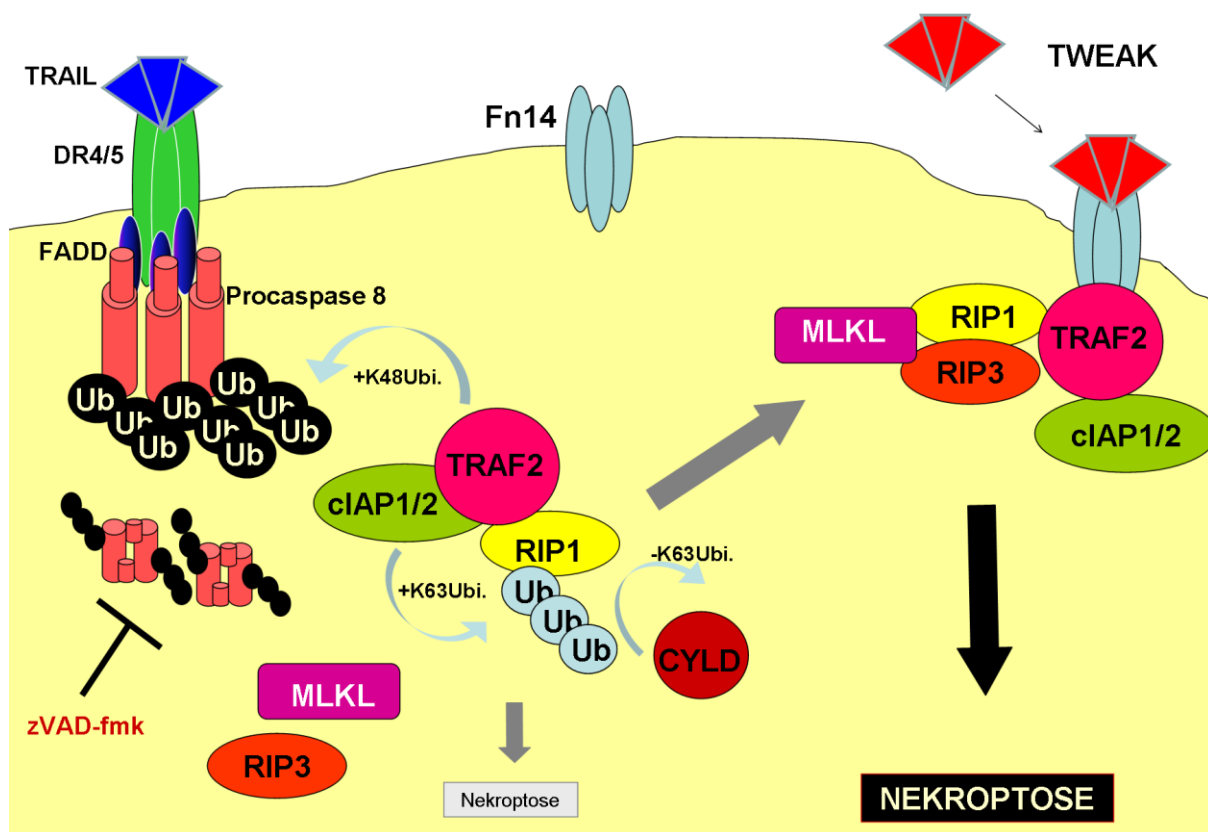
Nekroptose gehen (He et al. 2009; Zhao et al. 2012), und unter apoptotischen Bedingungen gegenüber Fc-TWEAK kaum sensitiviert sind (Abb. 4.13). Diese Resultate können in einer Linie betrachtet werden mit Moujalled et al. (2013), die bereits die Bedeutung von RIP1 anzweifelten und eher RIP3 als essentiell für die Auslösung der Nekroptose ansahen, als auch mit Dondelinger et al. 2013, die für RIP3 auch eine proapoptotische Funktion beschrieben. Letztere sollte auf Grundlage der RIP3-abhängigen Herstellung reaktiver Sauerstoffspezies basieren, was erst zur vollen Aktivierung von Caspase 8 führte, wobei die Autoren eine RIP1-Kinase-Abhängigkeit TNFR1-vermittelter Apoptose unter cIAP1/2-depletierten bzw. TAK1-inhibierten Bedingungen beschreiben. Inhibition von TAK1 soll zur Bildung des Komplexes bestehend aus TNFR1, FADD, Caspase 8 und RIP1 (Komplex 2b) führen, ohne aber den Ubiquitinierungsstatus von RIP1 am Komplex 1 zu beeinflussen, weshalb die Autoren annehmen, dass nicht Ubiquitinierung von RIP1 sondern fehlende Rekrutierung von TAK1 an etwaige Ubiquitinketten von RIP1 den eigentlichen Todessignalinduktor darstellt. Dies wurde im selben Artikel zudem auch bestätigt dadurch, dass Inhibition des RIP1-deubiquitinierenden CYLD nur in cIAP-depletierten Zellen zu Schutz vor Apoptose führte, nicht aber nach Inhibition von TAK1, welches demnach ein antiapoptotisches Protein wäre. TAK1 ist mit der Aktivierung des klassischen NF $\kappa$ B-Signalwegs in Verbindung gebracht worden: aktiviert durch einen K63-Ubiquitinierungskomplex bestehend aus TRAF6 sowie Adaptorproteinen (TAB1/2/3) kann TAK1 IKK $\beta$  phosphorylieren und damit NF $\kappa$ B aktivieren (Wang et al. 2001). Untersuchungen zur Nekroptose im Mausmodell bestätigten die essentielle RIP1:RIP3:MLKL-Achse als Nekroptosom, wobei Depletion von RIP3 oder MLKL in einer nachgeordneten RIP1-abhängigen Apoptose zum Zelltod führte (Remijne et al. 2014). Feoktistova et al. (2011) beschreiben cIAP1 und cIAP2 als essentielle Inhibitoren des sogenannten Ripoptosoms, das aus RIP1, FADD, Caspase 8 und Caspase 10 sowie Isoformen von cFLIP besteht. Dabei stellt RIP1 die Kernkomponente dar und die Aktivität von Caspase 8 wird von cFLIP kontrolliert, was entweder die Induktion der Apoptose oder eine RIP3-abhängige Nekroptose zur Folge hat. Allerdings waren die Experimente dieser Publikation nicht auf eine Todesligand:Todesrezeptor-Interaktion bezogen, sondern die Autoren stimulierten den Toll-like-Rezeptor 3 mit dem synthetischen Liganden poly(I:C) nach Inhibition der cIAPs durch TWEAK oder einen IAP-Antagonisten („compound A“). Allen genannten Quellen ist gemein, dass geringe Aktivität von Caspase 8, fehlende

Stabilisierung von RIP1 am Komplex 1 sowie Expression von RIP3 und MLKL sowie Mangel an IAPs zu Nekroptose oder aber einer Art verspäteter, „sekundärer“ Apoptose führen. Das könnte das auch in der vorliegenden Arbeit dokumentierte Phänomen erklären, dass nach TRAIL-Stimulation unter apoptotischen Bedingungen stark RIP3-exprimierende Zellen sensitiver sind im Vergleich zu RIP3-defizienten Zellen. Jüngst konnte gezeigt werden, dass nur der Komplex aus Caspase 8 und RIP1 in der Lage ist, Bid zu tBid spalten und so mitochondrial-verstärkte Apoptose zu induzieren, was zumindest dafür spricht, dass Typ II-Apoptose (siehe auch Abb. 1.2) der Bildung eines Ripoptosoms bedarf (Chen et al. 2015). TRAF2 rekrutiert cIAP1 und cIAP2 an den Tod-induzierenden Signalkomplex (Vince et al. 2009) und cIAP1/2 polyubiquitinieren dort RIP1 K63-spezifisch, was eine pronekroptotische RIP1-Aktivität antagonisiert (Tenev et al. 2011). Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass eine Depletion von TRAF2 zu einer fehlenden Rekrutierung von cIAP1/2 führt und damit die Formierung eines Ripoptosoms oder Nekroptosoms nach TRAIL- oder CD95L-Bindung nicht ausreichend verhindert werden kann. Das würde die durch Knockdown von TRAF2 oder Fc-TWEAK-abhängige Rekrutierung von TRAF2 in ein Triton X100-unlösliches Kompartiment bewirkte Sensitivierung unter nekroptotischen Bedingungen erklären. Das heißt, wenn TRAF2 fehlt, findet verstärkt Nekroptose statt, weil cIAP1/2 nicht mehr ausreichend RIP1 ubiquitinieren und am Komplex stabilisieren kann, so dass es Komplexe mit RIP3 und MLKL bildet (Abb. 5.4). Oben wurde bereits die Bedeutung von TAK1 hinsichtlich der kanonischen NF $\kappa$ B-Aktivierung ausgeführt und über seine mögliche zweite, antiapoptotische Eigenschaft berichtet, die Bildung des TNFR1-abhängigen Komplex 2b (FADD:RIP1:Caspase 8) zu inhibieren. Da TRAF2 mit TRAF6 Komplexe bildet (Davies et al. 2005), wäre es möglich, dass Depletion von TRAF2 zu einer geringeren Anzahl TAK1-rekrutierender und aktivierender Komplexe führt und so dessen antiapoptotische Eigenschaft fehlt, was zu einer gesteigerten Sensibilität in TRAF2-depletierten Zellen beitragen könnte, zusätzlich zu der K48-Ubiquitinligase-Eigenschaft von TRAF2 hinsichtlich Caspase 8 (Gonzalvez et al. 2012). Laut Kobayashi et al. (2014) ist die Aktivität des RIP1-, TRAF2- und TRAF6-deubiquitinierenden Enzyms CYLD entscheidend für die Stabilität dieser Proteine im Komplex. CYLD wird zum einen durch die Caspase 8-Aktivität kontrolliert, da es ein Caspase 8-Substrat ist (O'Donnell et al. 2011), und zum anderen durch SUMOylierung, die dessen Aktivität inhibiert. SUMOylierung ist neben Ubiquitinierung eine weitere posttranslationale Modifikation, bei der kleine

Proteine der SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier)-Familie an andere Proteine ligiert werden (Mahajan et al. 1997). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass O'Donnell et al. (2011) die CYLD-restringierende Eigenschaft von Caspase 8 gerade in einem ontogenetischen Kontext als die eigentliche Aufgabe von Caspase 8 in Embryogenese und Hämatopoese betrachten, mit anderen Worten: das Initiatorenzym für den programmierten Zelltod Apoptose ist zugleich ein *pro survival*-Enzym, das Nekrose / Nekroptose negativ reguliert. In gleicher Weise antinekroptotisch ist auch die Caspase 8-Aktivität gegen RIP3 zu sehen, welches ebenfalls ein Substrat von Caspase 8 ist (Feng et al. 2007). Auch RIP1 wird gespalten von Caspase 8, allerdings hat dies nicht nur antinekroptotische Auswirkungen, sondern inhibiert auch die NF $\kappa$ B-Aktivierung (Lin et al. 1999). Wang et al. konnten bereits 1998 belegen, dass NF $\kappa$ B-Aktivierung zur Hochregulation antiapoptotischer Proteine führt. Neben cIAP1 und cIAP2 waren dies auch TRAF1 und TRAF2. Außerdem konnte gezeigt werden, dass TRAF2 in die RIP1-abhängige, TRAIL-vermittelte Aktivierung von NF $\kappa$ B involviert ist (Lin et al. 2000). Daher könnte auch eine TRAF2-abhängige Hochregulierung des klassischen NF $\kappa$ B-Signalweges dessen antiapoptotische Eigenschaften erklären. Umgekehrt wäre in diesem Modell der Knockdown von TRAF2 verbunden mit einer reduzierten basalen Expression oder reduzierten Induktion antiapoptotischer bzw. antinekroptotischer Proteine, was die verstärkte TRAIL-vermittelte Apoptose bzw. Nekroptose erklären würde. Wenn dem so wäre, müsste eine Inhibition der klassischen NF $\kappa$ B-Aktivierung ebenfalls in einer Sensitivierung resultieren. In der vorliegenden Arbeit wurde daher durch Einsatz des IKK2-Inhibitors TPCA-1 diese Hypothese überprüft (Abb. 4.19). Es zeigte sich, dass die beobachtete Sensibilisierung von HaCaT-Keratinocyten durch Knockdown von TRAF2 nicht das Resultat veränderter kanonischer NF $\kappa$ B-Aktivierung ist, da TPCA-1 die Sensitivität weder der TRAF2-Knockdown-Zellen noch der Kontroll-siRNA-behandelten Zellen gegenüber TRAIL bzw. TRAIL plus zVAD-fmk beeinflusste. Demnach ist die *pro survival*-Aktivität von TRAF2 hier nicht im Kontext von Geninduktion und Proteinexpression zu sehen, sondern vermutlich vor allem in der K48-Ubiquitinligaseaktivität und der Rekrutierung der cIAPs zu RIP1.

### 5.3 Modifikationen der Komponenten des Nekroptosoms.

Durch Moujalled et al. (2013) wurde bereits gezeigt, dass TNF in der Lage ist, in RIP1-negativen murinen embryonalen Fibroblasten RIP3 zu aktivieren und so Nekroptose auszulösen, was die bisherige Theorie, dass RIP1 essentiell für die DD-abhängige Rekrutierung des Ripopotosoms / Nekroptosoms zu Tod-induzierenden Signalkomplexen ist, in Frage stellte. Allerdings musste RIP3 stark überexprimiert sein, löste allein dadurch aber keine Nekroptose aus, sondern nur nach TNF-Stimulation. Dies galt gleichermaßen für RIP1<sup>-/-</sup>, wie für Caspase 8<sup>-/-</sup> und für Bax<sup>-/-</sup>/Bak<sup>-/-</sup>-MEFs bzw. in Anwesenheit eines Caspaseinhibitors. Neben RIP3 musste allerdings MLKL vorhanden sein, was dessen Bedeutung für die Ausführung der Nekroptose weiter festigt. Letzteres wurde auch in dieser Arbeit belegt durch Verwendung von Necrosulfonamide als MLKL-Inhibitor (Abb. 4.11). Durch Verwendung des RIP1-Kinaseinhibitors Necrostatin-1 unter Anwesenheit von zVAD-fmk konnte jedoch TRAIL-induzierte Nekroptose verhindert werden, was auf eine zentrale Bedeutung von RIP1 zumindest im Kontext von TRAIL-vermitteltem Zelltod verweist. Die angesprochene Essentialität von MLKL konnte bereits gezeigt werden, indem MLKL-defiziente Mäuse generiert wurden, aus denen MEFs, murine dermale Fibroblasten (MDF) und Knochenmark-Makrophagen (BMDM) isoliert wurden und man feststellte, dass diese Zellen völlig unempfindlich gegenüber TNF-induzierter Nekroptose waren, bis MLKL wieder in den Zellen synthetisiert wurde durch Induktion eines für MLKL kodierenden lentiviralen Expressionsvektors (Murphy et al. 2013). Außerdem zeigten die Autoren, dass sich MLKL nicht autophosphoryliert während seiner Aktivierung, sondern an seiner Pseudokinasedomäne durch die (rekombinante) RIP3-Kinasedomäne an S345, S347 und T349 ATP-abhängig phosphoryliert wird. Allerdings konnte zwar die Kristallstruktur von MLKL aufgeklärt, aber nicht der Komplex von MLKL mit RIP1 und RIP3 gezeigt werden. Mittels shRNA-basierendem Silencing von PGAM5 (Wang et al. 2012) stellten die Autoren zudem dessen alleinige Bedeutung für die Nekroptose in Frage, da trotz erfolgreichem Knockdown von PGAM5 die von den Autoren genannte Induktionskette „TNFR1 > RIPK1 > RIPK3 > MLKL“ in MEFs sowie L929-Zellen Nekroptose induzierte, was auf weitere durch MLKL beeinflusste Wege in die Nekroptose hinweist und PGAM5 als alleinigen Induktor der Endstufe der Nekroptose (im Kontext der Drp1-Aktivierung) ausschließt.



**Abbildung 5.4. Modell TRAIL-abhängiger Nekroptose in Ab- und Anwesenheit von TWEAK.** Links: zVAD-fmk inhibiert die Aktivität von Caspase 8. TRAF2 wirkt weiterhin als K48-Ubiquitinligase und als Adaptor für cIAP1/2, wodurch RIP1 K63-polyubiquitiniert wird. Inhibierte Caspase 8 spaltet weder RIP1 und RIP3 noch CYLD. Es findet Nekroptose statt. Rechts: Bindung von TWEAK an Fn14 rekrutiert TRAF2-cIAP1/2 und RIP1 an die Zellmembran, durch CYLD deubiquitiniertes RIP1 bindet RIP3 und MLKL, diese bilden einen amyloiden Nekroptosomkomplex, möglicherweise einhergehend mit MLKL-Trimerisierung. Inhibition der Caspasen führt zu Akkumulation von CYLD, RIP1 und RIP3 nach TRAIL-Stimulation. Es überwiegt im Endeffekt die Deubiquitinierung von RIP1 durch CYLD dessen cIAP1/2-vermittelte K63-Ubiquitinierung und die vorausgegangene Fn14-Stimulation bewirkt massive Nekroptosomaggregation an der Zellmembran. Folglich findet eine stärkere Nekroptose statt. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Durch Aminosäureaustausche konnten Murphy et al. zudem Phosphomimesemutanten von MLKL generieren, die daraufhin in der Lage waren, ohne RIP3-Phosphorylierung Nekroptose zu induzieren und das sowohl in Anwesenheit eines nekroptotischen Stimulus (TNF plus Pancaspaseinhibitor) als auch in dessen Abwesenheit. Die Arbeiten der Autoren legen nahe, dass die Phosphorylierung seitens RIP3 bzw. Phosphomimetik eine konformatorische Änderung der Pseudokinasedomäne zur Folge hat, weswegen MLKL als „molekulare Weiche“ anzusehen wäre. In Experimenten zur Funktionalität von MLKL wurde klar, dass dieses nach RIP3-abhängiger Phosphorylierung im Nekroptosom als Homotrimer an die Zellmembran transloziert, dort transient receptor potential melastatin-related 7

(TRPM-7) bindet und Kalziuminflux bewirkt, was zum Zusammenbruch der Membranintegrität führt (Cai et al. 2014). Auch diese Befunde sind mit den eigenen Ergebnissen in Einklang. In Western Blot-Analysen sowohl von HaCaT-Keratinocyten (Abb. 4.3b) als auch von HeLa-Leervektor- bzw. RIP3-Expressionszellen (Abb. 4.9 und Abb. 4.10) fällt auf, dass unter Caspase-inhibierenden (+zVAD-fmk) Bedingungen jeweils mit fortschreitender Dauer der TRAIL-Inkubation (Abb. 4.9) die Banden oberhalb der RIP1-Hauptbande (74kD) deutlich stärker werden. Dies geschah ausschließlich, wenn zVAD-fmk verwendet wurde. Ähnliche Banden, die auf eine posttranslationale Modifikation hinweisen, wurden bei HeLa-RIP3-Zellen unter denselben Bedingungen auch bei RIP3 sichtbar (Abb. 4.10). Möglicherweise führt die Inhibition der Caspasen zu Polyubiquitinierung von RIP1 und RIP3 und einer daraus resultierenden höheren Stabilität beider Proteine oder es erfolgt eine Komplexbildung von RIP1 und RIP3 zu dem beschriebenen amyloiden Signalkomplex (Li et al. 2012), bestehend aus RIP1 und RIP3, dessen Bildung durch aktive Caspase 8-Moleküle verhindert werden würde. Der Einfluss von TRAF2 bzw. dessen Knockdown auf die beobachteten Modifikationen von RIP1 und RIP3 bleibt widersprüchlich, da im einen Experiment der Knockdown die Modifikation zu verstärken scheint (Abb. 4.9), während im anderen Experiment umgekehrt der Knockdown die Modifikation abschwächt (Abb. 4.10). Zumindest wird deutlich, dass unter TRAIL-Bedingungen sowohl RIP1 als auch RIP3 Substrate von Caspase 8 sind, da beide in Abhängigkeit der TRAIL-induzierten Caspaseaktivität eine Spaltprodukte aufweisen (Abb. 4.10: RIP1 p39; RIP3 bei ca. 30kD). Diese Spaltungen treten nicht auf, wenn zVAD-fmk verwendet wird. Stattdessen werden sowohl RIP1 als auch RIP3 wie geschildert posttranslational modifiziert, was nur die Folge von TRAIL-Stimulation plus Caspaseinhibition sein kann. Die Modifikation ist grundsätzlich in zwei Richtungen interpretierbar: zum einen könnte dadurch die RIP1/RIP3-Aktivität inhibiert werden, z.B. durch K48-Ubiquitinierung. Zum anderen kann es sich aber auch um die konsequente Folge oder die Bedingung der Nekroptosomaktivierung handeln, z.B. durch stabilisierende lineare oder K63-Ubiquitinierung bzw. RIP1/RIP3-Aggregatbildung, die die Nekroptose durch Bildung einer Enzymplattform (enzyme scaffold) verstärkt.

#### 5.4 Modell zur multifunktionalen protektiven Wirkungsweise von TRAF2 im Kontext TRAIL-induzierter Apoptose und Nekroptose.

Sowohl für die Sensitivierung der TRAIL-induzierter Apoptose und Nekroptose in TRAF2-Knockdownzellen als auch für Sensitivierung der Nekroptose durch Fc-TWEAK gilt, dass TRAF2 in den jeweils regulierenden Komplexen nicht in ausreichender Menge vorliegt und so seine beschriebenen antiapoptotischen und antinekroptotischen Eigenschaften fehlen. Caspase 8 ist sowohl Schlüsselenzym der Initiation der Apoptose, agiert aber ebenfalls als Negativregulator der Nekroptose. Da TRAF2 direkt und indirekt über die Rekrutierung von cIAP1/2 an der Verarbeitung eines TRAIL-Stimulus beteiligt ist, war es interessant, zu zeigen, ob die beteiligten Proteine während der Nekroptose im Komplex vorkommen. Daher wurden Immunpräzipitationen von Caspase 8 durchgeführt, die, anders als IPs von RIP1 oder RIP3, nur einen geringen Hintergrund erzeugen. Im TRAF2-Knockdown lagen unter durch TRAIL plus zVAD-fmk induzierten nekroptotischen Bedingungen weder RIP1 noch RIP3 im Komplex mit der inaktivierten Caspase 8 vor und auch TRAF2 sowie cIAP1/2 wurden im Gegensatz zu Bedingungen ohne TRAF2-Knockdown nicht mit Caspase 8 coimmunopräzipitiert (Abb. 4.21). Diese Ergebnisse unterstützen die Ergebnisse aus den Zytotoxizitätsassays: TRAF2-Knockdown bewirkt weniger TRAF2 in Nähe von Caspase 8, was im Einklang mit dem von Gonzalez et al. (2012) etablierten Modell von TRAF2 als K48-Ubiquitinligase gegen Procaspase 8 ist. Deren Halbwertszeit als aktiviertes Enzym ist durch Mangel von TRAF2 verlängert und folglich die Apoptose verstärkt. Aktive Caspase 8 spaltet zudem RIP1 und RIP3, was sowohl NF $\kappa$ B-Aktivierung und damit Expression antiapoptotischer Proteine wie cFLIP, TRAF1 und TRAF2 als auch die Nekroptose verhindert. Die Immunpräzipitation erfolgte allerdings unter nekroptotischen Konditionen: weder cIAP1/2 noch RIP1/3 noch TRAF2 koimmunopräzipitierten hier mit der inhibierten Caspase 8. Da Nekroptose stattfindet, muss das heißen, dass RIP1 und RIP3 komplexiert vorliegen, aber nicht Caspase 8. Es ist denkbar, dass unter nekroptotischen Bedingungen die TRAF2-cIAP1/2-vermittelte stabilisierende K63-Ubiquitinierung von RIP1 fehlt und RIP1 dann eher Komplexe mit RIP3 bildet, was zu einer verstärkten Bildung des Nekroptosoms führt. Allerdings ist die angesprochene RIP1-Stabilisierung vor allem in einem TNF-Kontext bekannt. Möglich ist auch, dass

Komplexe aus TRAF2 und cIAP1/2 generell RIP1 binden und so dessen Komplexierung mit RIP3 verhindern. Fehlt TRAF2, wäre diese Komplexierung gestört, freies RIP1 würde RIP3 binden, sofern Caspasen inaktiv sind akkumulieren und MLKL aktivieren, was letztlich die Zellen für Nekroptose sensibilisierte. Mittels Fc-TWEAK-Vorstimulation wird TRAF2 nicht wie beim Knockdown depletiert, sondern anders in der Zelle verteilt. Man darf daher nicht davon ausgehen, dass diese Umverteilung im Resultat einem Knockdown gleichkommt. Trotzdem wurde bei Verwendung von Fc-TWEAK eine starke Sensitivierung von HaCaT-Keratinocyten erreicht, nachdem TRAF2 durch Fn14 in ein Triton X100-unlösliches Kompartiment transloziert wurde. Die Aktivierung von Caspase 8 findet bei TRAIL anders als bei TNF am primären, membranständigen Rezeptorkomplex statt. Dementsprechend könnte man davon ausgehen, dass Fc-TWEAK-Stimulation nicht nur TRAF2-cIAP1/2 an Fn14 rekrutiert, sondern dass dadurch auch eine räumliche Nähe hergestellt wird, zu nach TRAIL-Bindung an den DISC rekrutierte Caspase 8-Molekülen (vergleiche Abb. 5.3). Daher sollte man erwarten, dass zumindest unter nekroptotischen Bedingungen (TRAIL plus zVAD-fmk) TRAF2-cIAP1/2 in einer Caspase 8-IP mit dieser koimmunopräzipitiert werden können müsste, sofern sie wirklich im selben Kompartiment wären. Letztlich wird klar, dass TRAF2 mehrere Funktionen hat: es reguliert im Verbund mit cIAP1/2 und RIP1 alternatives bzw. kanonisches NF $\kappa$ B-Signalling, hat indirekt antiapoptotische Bedeutung als Adaptorprotein der cIAPs, aber auch direkt als K48-Ubiquitinligase von Caspase 8 und dämpft als cIAP1/2-Adaptor indirekt auch durch RIP1-K63-Ubiquitinierung die Formierung des Nekroptosoms.



## 6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt TRAIL-induzierte Apoptose und Nekroptose in verschiedenen Zelllinien. Im Speziellen wurden die verschiedenen Funktionen des TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) untersucht. Hierzu wurde ein transienter Knockdown etabliert und dessen Wirkung auf die Suszeptibilität der Zellen gegenüber dem Zytokin TRAIL untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown von TRAF2 nicht nur zur Sensitivierung für Apoptose führt, sondern auch in Nekroptose-kompetenten Zellen zu einer Verstärkung der durch Caspaseinhibition mittels zVAD-fmk nach TRAIL-Stimulation induzierten Nekroptose führt. Mittels des Zytokins Fc-TWEAK wurde Fn14-vermittelt TRAF2 aus dem Zytosol in ein Triton X100-unlösliches Kompartiment rekrutiert und dadurch physiologisch depletiert. Dies führte zwar kaum zu gesteigerter TRAIL-abhängiger Apoptose, sensitivierte jedoch analog zum TRAF2-Knockdown RIP3-exprimierende Zellen für Nekroptose. Durch Vergleich RIP3-negativer (HeLa-Leervektor) mit RIP3-exprimierenden Zellen (HeLa RIP3, HT29, HaCaT) konnte die Essentialität von RIP3 für die Nekroptose herausgestellt werden und Einsatz des RIP1-Kinase-Inhibitors Necrostatin-1 sowie des MLKL-Inhibitors Necrosulfonamide belegte die Beteiligung der Nekroptosomkomponenten RIP1 und MLKL. Antagonismus putativen autokrinen TNFs bewies, dass es sich bei dem durch Fc-TWEAK verstärkten Zelltod um einen direkten TRAIL-Effekt handelte und Inhibition kanonischen NF $\kappa$ Bs durch IKK2-Inhibitor TPCA-1, dass die TRAF2-Knockdown-vermittelte Sensitivierung gegenüber TRAIL nicht auf verändertes NF $\kappa$ B-Signalling zurückzuführen ist. Einsatz des SMAC-Mimetikums BV6 rekapitulierte zudem stark das im TRAF2-Knockdown Gesehene und unterstrich die Bedeutung der cIAPs. Immunpräzipitation von Caspase 8 unter nekroptotischen Bedingungen zeigte bei TRAF2-Knockdown eine Depletion von TRAF2 und cIAP1/2 sowie RIP1 und RIP3 aus dem Komplex mit Caspase 8. Insgesamt wird deutlich, dass TRAF2 einerseits antiapoptotisch wirkt als K48-Ubiquitinligase, die die Halbwertszeit aktiver Caspase 8-Komplexe determiniert und andererseits eine antinekroptotische Funktion hat, da es durch Rekrutierung von cIAP1/2 an RIP1 die TRAIL-induzierte Nekroptose verhindert, wenn die Caspasen inhibiert sind.

## 7. Summary

This study focussed on TRAIL-induced apoptosis and necroptosis in a number of different cell lines. In detail, the different functions of TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) were examined. Establishment of a transient TRAF2 knockdown discovered not only sensitization for apoptosis upon treatment with the cytokine TRAIL but also enhanced necroptosis in cells competent for this alternative programmed cell death mode. Physiological recruitment of TRAF2 into a triton x100-insoluble compartment using Fn14 ligand Fc-TWEAK revealed no stronger apoptosis after TRAIL treatment, but featured enhanced necroptosis. Comparing RIP3-negative cells (HeLa) with RIP3-expressing cells (HeLa RIP3, HT29, HaCaT) confirmed necroptosis and the necessity of RIP3 for necroptosis. Using RIP1 kinase inhibitor necrostatin 1 and MLKL inhibitor necrosulfonamide fortified the involvement of the necroptosome components RIP1 and MLKL in TRAIL-induced necroptosis. Antagonizing putative autocrine TNF verified the thesis that the enhanced cell death phenotype observed upon Fc-TWEAK pre-treatment was indeed a genuine TRAIL signalling effect. Inhibition of classical NF $\kappa$ B via TPCA-1 ruled out possibly altered NF $\kappa$ B signalling due to TRAF2 knockdown. SMAC mimetics with BV6 strongly recapitulated the TRAF2 knockdown-induced phenotype in TRAIL-derived apoptosis and necroptosis and emphasizes cIAP1/2 relevance. Under necroptotic conditions, immunoprecipitation of caspase 8 complexes revealed depletion of TRAF2, cIAP1/2, RIP1 and RIP3 upon TRAF2 knockdown. Summarizing, by determining the shelf life of activated caspase 8, TRAF2 directly acts antiapoptotically. Moreover, by recruiting cIAP1/2 to RIP1, TRAF2 inhibits TRAIL-induced necroptosis, under conditions where caspases are inhibited.

## 8. Literaturquellen

**Akazawa, Y.**, J. L. Mott, S. F. Bronk, N. W. Werneburg, A. Kahraman, M. E. Guicciardi, X. W. Meng, S. Kohno, V. H. Shah, S. H. Kaufmann, M. A. McNiven and G. J. Gores (2009). "Death receptor 5 internalization is required for lysosomal permeabilization by TRAIL in malignant liver cell lines." *Gastroenterology* 136(7): 2365-2376 e2361-2367.

**Armitage, R. J.** (1994). "Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands." *Curr Opin Immunol* 6(3): 407-413.

**Austin, C. D.**, D. A. Lawrence, A. A. Peden, E. E. Varfolomeev, K. Totpal, A. M. De Maziere, J. Klumperman, D. Arnott, V. Pham, R. H. Scheller and A. Ashkenazi (2006). "Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(27): 10283-10288.

**Bartke, T.**, D. Siegmund, N. Peters, M. Reichwein, F. Henkler, P. Scheurich and H. Wajant (2001). "p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kappaB-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells." *Oncogene* 20(5): 571-580.

**Bazan, J. F.** (1993). "Emerging families of cytokines and receptors." *Curr Biol* 3(9): 603-606.

**Benetatos, C. A.**, Y. Mitsuuchi, J. M. Burns, E. M. Neiman, S. M. Condon, G. Yu, M. E. Seipel, G. S. Kapoor, M. G. Laporte, S. R. Rippin, Y. Deng, M. S. Hendi, P. K. Tirunahari, Y. H. Lee, T. Haimowitz, M. D. Alexander, M. A. Graham, D. Weng, Y. Shi, M. A. McKinlay and S. K. Chunduru (2014). "Birinapant (TL32711), a bivalent SMAC mimetic, targets TRAF2-associated cIAPs, abrogates TNF-induced NF-kappaB activation, and is active in patient-derived xenograft models." *Mol Cancer Ther* 13(4): 867-879.

**Bertrand, M. J.** and P. Vandenabeele (2011). "The Ripoptosome: death decision in the cytosol." *Mol Cell* 43(3): 323-325.

**Bodmer, J. L.**, P. Schneider and J. Tschopp (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." *Trends Biochem Sci* 27(1): 19-26.

**Boukamp, P.**, R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham and N. E. Fusenig (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." *J Cell Biol* 106(3): 761-771.

**Boulares, A. H.**, A. G. Yakovlev, V. Ivanova, B. A. Stoica, G. Wang, S. Iyer and M. Smulson (1999). "Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells." *J Biol Chem* 274(33): 22932-22940.

**Budd, R. C.**, W. C. Yeh and J. Tschopp (2006). "cFLIP regulation of lymphocyte activation and development." *Nat Rev Immunol* 6(3): 196-204.

**Cai, Z.**, S. Jitkaew, J. Zhao, H. C. Chiang, S. Choksi, J. Liu, Y. Ward, L. G. Wu and Z. G. Liu (2014). "Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis." *Nat Cell Biol* 16(1): 55-65.

- Carswell, E. A.**, L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore and B. Williamson (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(9): 3666-3670.
- Chan, F. K.** and E. H. Baehrecke (2012). "RIP3 finds partners in crime." *Cell* 148(1-2): 17-18.
- 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.**, X. Cheng, M. Zhao, S. Lin, J. Lu, J. Kang and X. Yu (2015). "RIP1-dependent Bid cleavage mediates TNF $\alpha$ -induced but Caspase-3-independent cell death in L929 fibroblastoma cells." *Apoptosis* 20(1): 92-109.
- Chen, G.**, Z. Han, D. Feng, Y. Chen, L. Chen, H. Wu, L. Huang, C. Zhou, X. Cai, C. Fu, L. Duan, X. Wang, L. Liu, X. Liu, Y. Shen, Y. Zhu and Q. Chen (2014). "A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy." *Mol Cell* 54(3): 362-377.
- Cho, Y.**, S. Challa and F. K. Chan (2011). "A RNA interference screen identifies RIP3 as an essential inducer of TNF-induced programmed necrosis." *Adv Exp Med Biol* 691: 589-593.
- Darding, M.** and P. Meier (2011). "IAPs: guardians of RIPK1." *Cell Death Differ* 19(1): 58-66.
- Davies, C. C.**, T. W. Mak, L. S. Young and A. G. Eliopoulos (2005). "TRAF6 is required for TRAF2-dependent CD40 signal transduction in nonhemopoietic cells." *Mol Cell Biol* 25(22): 9806-9819.
- De Valck, D.**, K. Heyninck, W. Van Criekinge, P. Vandenabeele, W. Fiers and R. Beyaert (1997). "A20 inhibits NF- $\kappa$ B activation independently of binding to 14-3-3 proteins." *Biochem Biophys Res Commun* 238(2): 590-594.
- Degterev, A.**, J. Hitomi, M. Germscheid, I. L. Ch'en, O. Korkina, X. Teng, D. Abbott, G. D. Cuny, C. Yuan, G. Wagner, S. M. Hedrick, S. A. Gerber, A. Lugovskoy and J. Yuan (2008). "Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins." *Nat Chem Biol* 4(5): 313-321.
- Degterev, A.**, Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G. D. Cuny, T. J. Mitchison, M. A. Moskowitz and J. Yuan (2005). "Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury." *Nat Chem Biol* 1(2): 112-119.
- Dondelinger, Y.**, M. A. Aguilera, V. Goossens, C. Dubuisson, S. Grootjans, E. Dejardin, P. Vandenabeele and M. J. Bertrand (2013). "RIPK3 contributes to TNFR1-mediated RIPK1 kinase-dependent apoptosis in conditions of cIAP1/2 depletion or TAK1 kinase inhibition." *Cell Death Differ* 20(10): 1381-1392.
- Duckett, C. S.**, R. W. Gedrich, M. C. Gilfillan and C. B. Thompson (1997). "Induction of nuclear factor  $\kappa$ B by the CD30 receptor is mediated by TRAF1 and TRAF2." *Mol Cell Biol* 17(3): 1535-1542.
- Duckett, C. S.** and C. B. Thompson (1997). "CD30-dependent degradation of TRAF2: implications for negative regulation of TRAF signaling and the control of cell survival." *Genes Dev* 11(21): 2810-2821.

- Ehrenschwender, M.**, D. Siegmund, A. Wicovsky, M. Kracht, O. Dittrich-Breiholz, V. Spindler, J. Waschke, H. Kalthoff, A. Trauzold and H. Wajant (2010). "Mutant PIK3CA licenses TRAIL and CD95L to induce non-apoptotic caspase-8-mediated ROCK activation." *Cell Death Differ* 17(9): 1435-1447.
- Ehrenschwender, M.** and H. Wajant (2009). "The role of FasL and Fas in health and disease." *Adv Exp Med Biol* 647: 64-93.
- Eissner, G.**, S. Kirchner, H. Lindner, W. Kolch, P. Janosch, M. Grell, P. Scheurich, R. Andreesen and E. Holler (2000). "Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages." *J Immunol* 164(12): 6193-6198.
- Enari, M.**, H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu and S. Nagata (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." *Nature* 391(6662): 43-50.
- Engels, I. H.**, A. Stepczynska, C. Stroh, K. Lauber, C. Berg, R. Schwenzer, H. Wajant, R. U. Janicke, A. G. Porter, C. Belka, M. Gregor, K. Schulze-Osthoff and S. Wesselborg (2000). "Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis." *Oncogene* 19(40): 4563-4573.
- Evans, P. C.**, E. R. Taylor, J. Coadwell, K. Heyninck, R. Beyaert and P. J. Kilshaw (2001). "Isolation and characterization of two novel A20-like proteins." *Biochem J* 357(Pt 3): 617-623.
- Falschlehner, C.**, T. M. Ganten, R. Koschny, U. Schaefer and H. Walczak (2009). "TRAIL and other TRAIL receptor agonists as novel cancer therapeutics." *Adv Exp Med Biol* 647: 195-206.
- Feng, S.**, L. Ma, Y. Yang and M. Wu (2006). "Truncated RIP3 (tRIP3) acts upstream of FADD to induce apoptosis in the human hepatocellular carcinoma cell line QGY-7703." *Biochem Biophys Res Commun* 347(3): 558-565.
- Feng, S.**, Y. Yang, Y. Mei, L. Ma, D. E. Zhu, N. Hoti, M. Castanares and M. Wu (2007). "Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain." *Cell Signal* 19(10): 2056-2067.
- Feoktistova, M.**, P. Geserick, B. Kellert, D. P. Dimitrova, C. Langlais, M. Hupe, K. Cain, M. MacFarlane, G. Hacker and M. Leverkus (2011). "cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms." *Mol Cell* 43(3): 449-463.
- Fortes, G. B.**, L. S. Alves, R. de Oliveira, F. F. Dutra, D. Rodrigues, P. L. Fernandez, T. Souto-Padron, M. J. De Rosa, M. Kelliher, D. Golenbock, F. K. Chan and M. T. Bozza (2012). "Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production." *Blood* 119(10): 2368-2375.
- Fotin-Mleczek, M.**, F. Henkler, A. Hausser, H. Glauner, D. Samel, A. Graness, P. Scheurich, D. Mauri and H. Wajant (2004). "Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1 regulates CD40-induced TRAF2-mediated NF-kappaB activation." *J Biol Chem* 279(1): 677-685.

- Fotin-Mleczek, M.**, F. Henkler, D. Samel, M. Reichwein, A. Hausser, I. Parmryd, P. Scheurich, J. A. Schmid and H. Wajant (2002). "Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8." *J Cell Sci* 115(Pt 13): 2757-2770.
- Galluzzi, L.**, I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, Y. Shi, H. U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino and G. Kroemer (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." *Cell Death Differ* 19(1): 107-120.
- Gerspach, J.**, D. Muller, S. Munkel, O. Selchow, J. Nemeth, M. Noack, H. Petrul, A. Menrad, H. Wajant and K. Pfizenmaier (2006). "Restoration of membrane TNF-like activity by cell surface targeting and matrix metalloproteinase-mediated processing of a TNF prodrug." *Cell Death Differ* 13(2): 273-284.
- Gerspach, J.**, K. Pfizenmaier and H. Wajant (2011). "Therapeutic targeting of CD95 and the TRAIL death receptors." *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 6(3): 294-310.
- Geserick, P.**, M. Herlyn and M. Leverkus (2014). "On the TRAIL to overcome BRAF-inhibitor resistance." *J Invest Dermatol* 134(2): 315-318.
- Gonzalvez, F.** and A. Ashkenazi (2010). "New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL." *Oncogene* 29(34): 4752-4765.
- Gonzalvez, F.**, D. Lawrence, B. Yang, S. Yee, R. Pitti, S. Marsters, V. C. Pham, J. P. Stephan, J. Lill and A. Ashkenazi (2012). "TRAF2 Sets a threshold for extrinsic apoptosis by tagging caspase-8 with a ubiquitin shutoff timer." *Mol Cell* 48(6): 888-899.
- Hayden, M. S.** and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." *Cell* 132(3): 344-362.
- He, S.**, L. Wang, L. Miao, T. Wang, F. Du, L. Zhao and X. Wang (2009). "Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha." *Cell* 137(6): 1100-1111.
- He, W.**, Q. Wang, J. Xu, X. Xu, M. T. Padilla, G. Ren, X. Gou and Y. Lin (2012). "Attenuation of TNFSF10/TRAIL-induced apoptosis by an autophagic survival pathway involving TRAF2- and RIPK1/RIP1-mediated MAPK8/JNK activation." *Autophagy* 8(12): 1811-1821.
- Holler, N.**, R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed and J. Tschopp (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." *Nat Immunol* 1(6): 489-495.
- Hsu, H.**, H. B. Shu, M. G. Pan and D. V. Goeddel (1996). "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways." *Cell* 84(2): 299-308.

- Hu, H. M.**, K. O'Rourke, M. S. Boguski and V. M. Dixit (1994). "A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40." *J Biol Chem* 269(48): 30069-30072.
- Hu, W. H.**, H. Johnson and H. B. Shu (1999). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways." *J Biol Chem* 274(43): 30603-30610.
- Ikner, A.** and A. Ashkenazi (2011). "TWEAK induces apoptosis through a death-signaling complex comprising receptor-interacting protein 1 (RIP1), Fas-associated death domain (FADD), and caspase-8." *J Biol Chem* 286(24): 21546-21554.
- Imre, G.**, S. Larisch and K. Rajalingam (2011). "Ripoptosome: a novel IAP-regulated cell death-signalling platform." *J Mol Cell Biol* 3(6): 324-326.
- Inoue, J.**, T. Ishida, N. Tsukamoto, N. Kobayashi, A. Naito, S. Azuma and T. Yamamoto (2000). "Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling." *Exp Cell Res* 254(1): 14-24.
- Irmeler, M.**, V. Steiner, C. Ruegg, H. Wajant and J. Tschopp (2000). "Caspase-induced inactivation of the anti-apoptotic TRAF1 during Fas ligand-mediated apoptosis." *FEBS Lett* 468(2-3): 129-133.
- Irmeler, M.**, M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French and J. Tschopp (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." *Nature* 388(6638): 190-195.
- Iwai, K.** (2011). "Linear polyubiquitin chains: a new modifier involved in NFkappaB activation and chronic inflammation, including dermatitis." *Cell Cycle* 10(18): 3095-3104.
- Jin, Z.**, Y. Li, R. Pitti, D. Lawrence, V. C. Pham, J. R. Lill and A. Ashkenazi (2009). "Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling." *Cell* 137(4): 721-735.
- Jost, P. J.**, S. Grabow, D. Gray, M. D. McKenzie, U. Nachbur, D. C. Huang, P. Bouillet, H. E. Thomas, C. Borner, J. Silke, A. Strasser and T. Kaufmann (2009). "XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis." *Nature* 460(7258): 1035-1039.
- Kaiser, W. J.**, H. Sridharan, C. Huang, P. Mandal, J. W. Upton, P. J. Gough, C. A. Sehon, R. W. Marquis, J. Bertin and E. S. Mocarski (2013). "Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL." *J Biol Chem* 288(43): 31268-31279.
- Karl, I.**, M. Jossberger-Werner, N. Schmidt, S. Horn, M. Goebeler, M. Leverkus, H. Wajant and T. Giner (2014). "TRAF2 inhibits TRAIL- and CD95L-induced apoptosis and necroptosis." *Cell Death Dis* 5: e1444.
- Kavuri, S. M.**, P. Geserick, D. Berg, D. P. Dimitrova, M. Feoktistova, D. Siegmund, H. Gollnick, M. Neumann, H. Wajant and M. Leverkus (2011). "Cellular FLICE-inhibitory protein (cFLIP) isoforms block CD95- and TRAIL death receptor-induced gene induction irrespective of processing of caspase-8 or cFLIP in the death-inducing signaling complex." *J Biol Chem* 286(19): 16631-16646.
- Kobayashi, T.**, K. C. Masoumi and R. Massoumi (2014). "Deubiquitinating activity of CYLD is impaired by SUMOylation in neuroblastoma cells." *Oncogene*.

- Kohlhaas, S. L.**, A. Craxton, X. M. Sun, M. J. Pinkoski and G. M. Cohen (2007). "Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis." *J Biol Chem* 282(17): 12831-12841.
- Kreuz, S.**, D. Siegmund, J. J. Rumpf, D. Samel, M. Leverkus, O. Janssen, G. Hacker, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht, P. Scheurich and H. Wajant (2004). "NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP." *J Cell Biol* 166(3): 369-380.
- Kreuz, S.**, D. Siegmund, P. Scheurich and H. Wajant (2001). "NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling." *Mol Cell Biol* 21(12): 3964-3973.
- Kroemer, G.**, L. Galluzzi and C. Brenner (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." *Physiol Rev* 87(1): 99-163.
- Lalaoui, N.**, A. Morle, D. Merino, G. Jacquemin, E. Iessi, A. Morizot, S. Shirley, B. Robert, E. Solary, C. Garrido and O. Micheau (2011). "TRAIL-R4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells through AKT." *PLoS One* 6(5): e19679.
- Lane, J. D.**, J. Lucocq, J. Pryde, F. A. Barr, P. G. Woodman, V. J. Allan and M. Lowe (2002). "Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis." *J Cell Biol* 156(3): 495-509.
- Lee, Y. J.**, S. Y. Jeong, M. Karbowski, C. L. Smith and R. J. Youle (2004). "Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis." *Mol Biol Cell* 15(11): 5001-5011.
- Leverkus, M.**, M. Neumann, T. Mengling, C. T. Rauch, E. B. Brocker, P. H. Krammer and H. Walczak (2000). "Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes." *Cancer Res* 60(3): 553-559.
- Leverkus, M.**, M. R. Sprick, T. Wachter, A. Denk, E. B. Brocker, H. Walczak and M. Neumann (2003). "TRAIL-induced apoptosis and gene induction in HaCaT keratinocytes: differential contribution of TRAIL receptors 1 and 2." *J Invest Dermatol* 121(1): 149-155.
- Leverkus, M.**, M. R. Sprick, T. Wachter, T. Mengling, B. Baumann, E. Serfling, E. B. Brocker, M. Goebeler, M. Neumann and H. Walczak (2003). "Proteasome inhibition results in TRAIL sensitization of primary keratinocytes by removing the resistance-mediating block of effector caspase maturation." *Mol Cell Biol* 23(3): 777-790.
- Li, J.**, T. McQuade, A. B. Siemer, J. Napetschnig, K. Moriwaki, Y. S. Hsiao, E. Damko, D. Moquin, T. Walz, A. McDermott, F. K. Chan and H. Wu (2012). "The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis." *Cell* 150(2): 339-350.
- Lin, Y.**, A. Devin, A. Cook, M. M. Keane, M. Kelliher, S. Lipkowitz and Z. G. Liu (2000). "The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of IkappaB kinase and c-Jun N-terminal kinase." *Mol Cell Biol* 20(18): 6638-6645.
- Lin, Y.**, A. Devin, Y. Rodriguez and Z. G. Liu (1999). "Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis." *Genes Dev* 13(19): 2514-2526.



- Locksley, R. M.**, N. Killeen and M. J. Lenardo (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* 104(4): 487-501.
- Mahajan, R.**, C. Delphin, T. Guan, L. Gerace and F. Melchior (1997). "A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2." *Cell* 88(1): 97-107.
- Malinin, N. L.**, M. P. Boldin, A. V. Kovalenko and D. Wallach (1997). "MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1." *Nature* 385(6616): 540-544.
- Mandal, P.**, S. B. Berger, S. Pillay, K. Moriwaki, C. Huang, H. Guo, J. D. Lich, J. Finger, V. Kasparcova, B. Votta, M. Ouellette, B. W. King, D. Wisnoski, A. S. Lakdawala, M. P. DeMartino, L. N. Casillas, P. A. Haile, C. A. Sehon, R. W. Marquis, J. Upton, L. P. Daley-Bauer, L. Roback, N. Ramia, C. M. Dovey, J. E. Carette, F. K. Chan, J. Bertin, P. J. Gough, E. S. Mocarski and W. J. Kaiser (2014). "RIP3 induces apoptosis independent of pronecrotic kinase activity." *Mol Cell* 56(4): 481-495.
- Martin, S. J.** and C. M. Henry (2013). "Distinguishing between apoptosis, necrosis, necroptosis and other cell death modalities." *Methods* 61(2): 87-89.
- Meng, X. W.**, K. L. Peterson, H. Dai, P. Schneider, S. H. Lee, J. S. Zhang, A. Koenig, S. Bronk, D. D. Billadeau, G. J. Gores and S. H. Kaufmann (2011). "High cell surface death receptor expression determines type I versus type II signaling." *J Biol Chem* 286(41): 35823-35833.
- Micheau, O.**, S. Lens, O. Gaide, K. Alevizopoulos and J. Tschopp (2001). "NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP." *Mol Cell Biol* 21(16): 5299-5305.
- Miyamoto, S.** and I. M. Verma (1995). "Rel/NF-kappa B/I kappa B story." *Adv Cancer Res* 66: 255-292.
- Moujalled, D. M.**, W. D. Cook, T. Okamoto, J. Murphy, K. E. Lawlor, J. E. Vince and D. L. Vaux (2013). "TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1." *Cell Death Dis* 4: e465.
- Moujalled, D. M.**, W. D. Cook, J. M. Murphy and D. L. Vaux (2014). "Necroptosis induced by RIPK3 requires MLKL but not Drp1." *Cell Death Dis* 5: e1086.
- Müller-Sienert, N.**, L. Dietz, P. Holtz, M. Kapp, G. U. Grigoleit, C. Schmuck, H. Wajant and D. Siegmund (2011). "SMAC mimetic BV6 induces cell death in monocytes and maturation of monocyte-derived dendritic cells." *PLoS One* 6(6): e21556.
- Murphy, J. M.**, P. E. Czabotar, J. M. Hildebrand, I. S. Lucet, J. G. Zhang, S. Alvarez-Diaz, R. Lewis, N. Lalaoui, D. Metcalf, A. I. Webb, S. N. Young, L. N. Varghese, G. M. Tannahill, E. C. Hatchell, I. J. Majewski, T. Okamoto, R. C. Dobson, D. J. Hilton, J. J. Babon, N. A. Nicola, A. Strasser, J. Silke and W. S. Alexander (2013). "The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism." *Immunity* 39(3): 443-453.
- Neumann, S.**, T. Bidon, M. Branschadel, A. Krippner-Heidenreich, P. Scheurich and M. Doszczak (2012). "The transmembrane domains of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors 1 and 2 co-regulate apoptotic signaling capacity." *PLoS One* 7(8): e42526.

- Newton, K.**, M. L. Matsumoto, I. E. Wertz, D. S. Kirkpatrick, J. R. Lill, J. Tan, D. Dugger, N. Gordon, S. S. Sidhu, F. A. Fellouse, L. Komuves, D. M. French, R. E. Ferrando, C. Lam, D. Compaan, C. Yu, I. Bosanac, S. G. Hymowitz, R. F. Kelley and V. M. Dixit (2008). "Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies." *Cell* 134(4): 668-678.
- O'Malley, W. E.**, Achinstein, B & Shear, M.J. (1962). "Action of bacterial polysaccharide on tumors. II. Damage of Sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide, and induced tolerance." *J. Natl. Cancer Inst.* 29: 1169-1175.
- Oberst, A.**, C. P. Dillon, R. Weinlich, L. L. McCormick, P. Fitzgerald, C. Pop, R. Hakem, G. S. Salvesen and D. R. Green (2011). "Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis." *Nature* 471(7338): 363-367.
- O'Donnell, M. A.** and A. T. Ting (2007). "NFkappaB and ubiquitination: partners in disarming RIPK1-mediated cell death." *Immunol Res* 54(1-3): 214-226.
- O'Donnell, M. A.**, E. Perez-Jimenez, A. Oberst, A. Ng, R. Massoumi, R. Xavier, D. R. Green and A. T. Ting (2011). "Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD." *Nat Cell Biol* 13(12): 1437-1442.
- Pan, G.**, J. Ni, Y. F. Wei, G. Yu, R. Gentz and V. M. Dixit (1997). "An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL." *Science* 277(5327): 815-818.
- Park, Y. C.**, V. Burkitt, A. R. Villa, L. Tong and H. Wu (1999). "Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2." *Nature* 398(6727): 533-538.
- Parlato, S.**, A. M. Giammarioli, M. Logozzi, F. Lozupone, P. Matarrese, F. Luciani, M. Falchi, W. Malorni and S. Fais (2000). "CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway." *EMBO J* 19(19): 5123-5134.
- Peter, M. E.** and P. H. Krammer (2003). "The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond." *Cell Death Differ* 10(1): 26-35.
- Pham, C. G.**, C. Bubici, F. Zazzeroni, S. Papa, J. Jones, K. Alvarez, S. Jayawardena, E. De Smaele, R. Cong, C. Beaumont, F. M. Torti, S. V. Torti and G. Franzoso (2004). "Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species." *Cell* 119(4): 529-542.
- Pullen, S. S.**, M. E. Labadia, R. H. Ingraham, S. M. McWhirter, D. S. Everdeen, T. Alber, J. J. Crute and M. R. Kehry (1999). "High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization." *Biochemistry* 38(31): 10168-10177.
- Regnier, C. H.**, C. Tomasetto, C. Moog-Lutz, M. P. Chenard, C. Wendling, P. Basset and M. C. Rio (1995). "Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma." *J Biol Chem* 270(43): 25715-25721.
- Remijsen, Q.**, V. Goossens, S. Grootjans, C. Van den Haute, N. Vanlangenakker, Y. Dondelinger, R. Roelandt, I. Bruggeman, A. Goncalves, M. J. Bertrand, V. Baekelandt, N. Takahashi, T. V. Berghe and P. Vandenabeele (2014). "Depletion of RIPK3 or MLKL blocks

- TNF-driven necroptosis and switches towards a delayed RIPK1 kinase-dependent apoptosis." *Cell Death Dis* 5: e1004.
- Robinson, N.**, S. McComb, R. Mulligan, R. Dudani, L. Krishnan and S. Sad (2012). "Type I interferon induces necroptosis in macrophages during infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *Nat Immunol* 13(10): 954-962.
- Rothe, M.**, M. G. Pan, W. J. Henzel, T. M. Ayres and D. V. Goeddel (1995). "The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins." *Cell* 83(7): 1243-1252.
- Rothe, M.**, S. C. Wong, W. J. Henzel and D. V. Goeddel (1994). "A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor." *Cell* 78(4): 681-692.
- Salvesen, G. S.** and V. M. Dixit (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 10964-10967.
- Schmidt, E.**, J. Gutberlet, D. Siegmund, D. Berg, H. Wajant and J. Waschke (2009). "Apoptosis is not required for acantholysis in pemphigus vulgaris." *Am J Physiol Cell Physiol* 296(1): C162-172.
- Schneider, P.**, R. Schwenzler, E. Haas, F. Muhlenbeck, G. Schubert, P. Scheurich, J. Tschopp and H. Wajant (1999). "TWEAK can induce cell death via endogenous TNF and TNF receptor 1." *Eur J Immunol* 29(6): 1785-1792.
- Schneider-Brachert, W.**, V. Tchikov, J. Neumeyer, M. Jakob, S. Winoto-Morbach, J. Held-Feindt, M. Heinrich, O. Merkel, M. Ehrenschwender, D. Adam, R. Mentlein, D. Kabelitz and S. Schutze (2004). "Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles." *Immunity* 21(3): 415-428.
- Shu, H. B.**, M. Takeuchi and D. V. Goeddel (1996). "The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 13973-13978.
- Siegmund, D.**, S. Klose, D. Zhou, B. Baumann, C. Roder, H. Kalthoff, H. Wajant and A. Trauzold (2007). "Role of caspases in CD95L- and TRAIL-induced non-apoptotic signalling in pancreatic tumour cells." *Cell Signal* 19(6): 1172-1184.
- Silke, J.**, T. Kratina, P. G. Ekert, M. Pakusch and D. L. Vaux (2004). "Unlike Diablo/smac, Grim promotes global ubiquitination and specific degradation of X chromosome-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and neither cause apoptosis." *J Biol Chem* 279(6): 4313-4321.
- Smith, C. A.**, T. Farrah, und R. G. Goodwin. (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." *Cell* 76: 959-962.
- Sun, L.**, H. Wang, Z. Wang, S. He, S. Chen, D. Liao, L. Wang, J. Yan, W. Liu, X. Lei and X. Wang (2012). "Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase." *Cell* 148(1-2): 213-227.
- Sun, X.**, J. Lee, T. Navas, D. T. Baldwin, T. A. Stewart and V. M. Dixit (1999). "RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase." *J Biol Chem* 274(24): 16871-16875.

- Sun, X.**, J. Yin, M. A. Starovasnik, W. J. Fairbrother and V. M. Dixit (2002). "Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3." *J Biol Chem* 277(11): 9505-9511.
- Tang, W.**, W. Wang, Y. Zhang, S. Liu, Y. Liu and D. Zheng (2009). "TRAIL receptor mediates inflammatory cytokine release in an NF-kappaB-dependent manner." *Cell Res* 19(6): 758-767.
- Tenev, T.**, K. Bianchi, M. Darding, M. Broemer, C. Langlais, F. Wallberg, A. Zachariou, J. Lopez, M. MacFarlane, K. Cain and P. Meier (2011). "The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs." *Mol Cell* 43(3): 432-448.
- Traubold, A.**, C. Roder, B. Sipos, K. Karsten, A. Arlt, P. Jiang, J. I. Martin-Subero, D. Siegmund, S. Muerkoster, L. Pagerols-Raluy, R. Siebert, H. Wajant and H. Kalthoff (2005). "CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells." *FASEB J* 19(6): 620-622.
- Trebing, J.**, J. A. Arana, S. Salzmann and H. Wajant (2014) "Analyzing the signaling capabilities of soluble and membrane TWEAK." *Methods Mol Biol* 1155: 31-45.
- Vallabhapurapu S**, Matsuzawa A, Zhang W, Tseng PH, Keats JJ, Wang H, Vignali DA, Bergsagel PL, Karin M. (2008). "Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling." *Nat Immunol.* 9(12):1364-70.
- Valmiki, M. G.** and J. W. Ramos (2009). "Death effector domain-containing proteins." *Cell Mol Life Sci* 66(5): 814-830.
- Vanden Berghe, T.**, A. Linkermann, S. Jouan-Lanhouet, H. Walczak and P. Vandenabeele (2014). "Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways." *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(2): 135-147.
- Vaux, D. L.** and J. Silke (2003). "Mammalian mitochondrial IAP binding proteins." *Biochem Biophys Res Commun* 304(3): 499-504.
- Venuprasad, K.**, M. Zeng, S. L. Baughan and R. Massoumi (2015). "Multifaceted role of the ubiquitin ligase Itch in immune regulation." *Immunol Cell Biol*.
- Vercammen, D.**, R. Beyaert, G. Denecker, V. Goossens, G. Van Loo, W. Declercq, J. Grooten, W. Fiers and P. Vandenabeele (1998). "Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor." *J Exp Med* 187(9): 1477-1485.
- Veyer, D. L.**, C. Maluquer de Motes, R. P. Sumner, L. Ludwig, B. F. Johnson and G. L. Smith (2014). "Analysis of the anti-apoptotic activity of four vaccinia virus proteins demonstrates that B13 is the most potent inhibitor in isolation and during viral infection." *J Gen Virol* 95(Pt 12): 2757-2768.
- Vince, J. E.**, D. Chau, B. Callus, W. W. Wong, C. J. Hawkins, P. Schneider, M. McKinlay, C. A. Benetatos, S. M. Condon, S. K. Chunduru, G. Yeoh, R. Brink, D. L. Vaux and J. Silke (2008). "TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFalpha." *J Cell Biol* 182(1): 171-184.

- Vince, J. E.**, D. Pantaki, R. Feltham, P. D. Mace, S. M. Cordier, A. C. Schmukle, A. J. Davidson, B. A. Callus, W. W. Wong, I. E. Gentle, H. Carter, E. F. Lee, H. Walczak, C. L. Day, D. L. Vaux and J. Silke (2009). "TRAF2 must bind to cellular inhibitors of apoptosis for tumor necrosis factor (tnf) to efficiently activate nf- $\kappa$ b and to prevent tnf-induced apoptosis." *J Biol Chem* 284(51): 35906-35915.
- Vince, J. E.**, W. W. Wong, N. Khan, R. Feltham, D. Chau, A. U. Ahmed, C. A. Benetatos, S. K. Chunduru, S. M. Condon, M. McKinlay, R. Brink, M. Leverkus, V. Tergaonkar, P. Schneider, B. A. Callus, F. Koentgen, D. L. Vaux and J. Silke (2007). "IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF $\alpha$ -dependent apoptosis." *Cell* 131(4): 682-693.
- Wachter, T.**, M. Sprick, D. Hausmann, A. Kerstan, K. McPherson, G. Stassi, E. B. Brocker, H. Walczak and M. Leverkus (2004). "cFLIPL inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated NF- $\kappa$ B activation at the death-inducing signaling complex in human keratinocytes." *J Biol Chem* 279(51): 52824-52834.
- Wajant, H.** (2003). "Death receptors." *Essays Biochem* 39: 53-71.
- Wajant, H.**, F. Henkler and P. Scheurich (2001). "The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators." *Cell Signal* 13(6): 389-400.
- 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.
- Walczak, H.**, M. A. Degli-Esposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart, K. A. Schooley, C. A. Smith, R. G. Goodwin and C. T. Rauch (1997). "TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL." *EMBO J* 16(17): 5386-5397.
- Wang, C.**, L. Deng, M. Hong, G. R. Akkaraju, J. Inoue and Z. J. Chen (2001). "TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK." *Nature* 412(6844): 346-351.
- Wang, C. Y.**, M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel and A. S. Baldwin, Jr. (1998). "NF- $\kappa$ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation." *Science* 281(5383): 1680-1683.
- Wang, H.**, L. Sun, L. Su, J. Rizo, L. Liu, L. F. Wang, F. S. Wang and X. Wang (2014). "Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3." *Mol Cell* 54(1): 133-146.
- Wang, Z.**, H. Jiang, S. Chen, F. Du and X. Wang (2012). "The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways." *Cell* 148(1-2): 228-243.
- Wertz, I. E.** and V. M. Dixit (2010). "Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system." *Cell Death Differ* 17(1): 14-24.
- Wicovsky, A.**, N. Muller, N. Daryab, R. Marienfeld, C. Kneitz, S. Kavuri, M. Leverkus, B. Baumann and H. Wajant (2007). "Sustained JNK activation in response to tumor necrosis

factor is mediated by caspases in a cell type-specific manner." *J Biol Chem* 282(4): 2174-2183.

**Wicovsky, A.**, F. Henkler, S. Salzmann, P. Scheurich, C. Kneitz and H. Wajant (2009). "Tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 enhances proinflammatory TNF receptor-2 signaling and modifies TNFR1-TNFR2 cooperation." *Oncogene* 28(15): 1769-1781.

**Wicovsky, A.**, S. Salzmann, C. Roos, M. Ehrenschwender, T. Rosenthal, D. Siegmund, F. Henkler, F. Gohlke, C. Kneitz and H. Wajant (2009). "TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling." *Cell Death Differ* 16(11): 1445-1459.

**Wiley, S. R.**, K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith and et al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." *Immunity* 3(6): 673-682.

**Wright, A.**, W. W. Reiley, M. Chang, W. Jin, A. J. Lee, M. Zhang and S. C. Sun (2007). "Regulation of early wave of germ cell apoptosis and spermatogenesis by deubiquitinating enzyme CYLD." *Dev Cell* 13(5): 705-716.

**Wurstle, M. L.**, M. A. Laussmann and M. Rehm (2009). "The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome." *Exp Cell Res* 318(11): 1213-1220.

**Yu, P. W.**, B. C. Huang, M. Shen, J. Quast, E. Chan, X. Xu, G. P. Nolan, D. G. Payan and Y. Luo (1999). "Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NFkappaB." *Curr Biol* 9(10): 539-542.

**Zhang, D. W.**, J. Shao, J. Lin, N. Zhang, B. J. Lu, S. C. Lin, M. Q. Dong and J. Han (2009). "RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis." *Science* 325(5938): 332-336.

**Zhang, G.** (2004). "Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding." *Curr Opin Struct Biol* 14(154-160).

**Zhao, J.**, S. Jitkaew, Z. Cai, S. Choksi, Q. Li, J. Luo and Z. G. Liu (2012). "Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(14): 5322-5327.

**Zhou, A. Y.**, R. R. Shen, E. Kim, Y. J. Lock, M. Xu, Z. J. Chen and W. C. Hahn (2013). "IKKepsilon-mediated tumorigenesis requires K63-linked polyubiquitination by a cIAP1/cIAP2/TRAF2 E3 ubiquitin ligase complex." *Cell Rep* 3(3): 724-733.

## 9. Anhang

### 9.1 Lebenslauf

Stand: April 2015

seit 06/2014	Postdoc-Position am Uniklinikum Schleswig-Holstein, Standort Lübeck: LIED - Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie. Forschungsschwerpunkt bullöse Autoimmun-dermatosen.
03/2011–05/2014	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Uniklinikum Würzburg. Anfertigung einer Doktorarbeit an der Hautklinik zum Thema todesrezeptorassoziierte Signalkomplexe: „Die Bedeutung von TRAF2 in TRAIL-induzierter Apoptose und Nekroptose“.
10/2008–02/2011	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Robert Koch-Institut. Molekularbiologie von <i>Legionella pneumophila</i> . Bestimmung und Analyse neuer Virulenzfaktoren.
12/2007–08/2008	Externe Diplomarbeit am Institut für Virologie & Immunbiologie des Würzburger Uniklinikums. „Klonierung und Charakterisierung eines pAAV-Vektorsystems zum Knockdown des humanen Dopamintransporters und Etablierung der Stereotaktischen Injektion von Vektoren in das Mausgehirn.“
10/2004–10/2007	Hauptstudium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg.
03/2007–04/2007	Department of Zoology, University of Cambridge, UK: Studien zu Ethologie, Physiologie und Ökologie der Krabbenspinne <i>Misumenops nepenthicola</i> , in Brunei Darussalam, Borneo.
10/2002–09/2004	Grundstudium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt.
07/2002–08/2002	Ehrenamtliches Praktikum im Wasservogelreservat „Wallnau“ auf Fehmarn.
07/2001–03/2002	Grundwehrdienst beim Fernmelderegiment 930 in Gerolstein.
06/2001	Abitur am Städtischen Rurtal-Gymnasium Düren.
1981	Am 11. Dezember in Bad Langensalza geboren.

## 9.2 Publikationen

### 9.2.1 Fachartikel

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in nachfolgendem Fachartikel veröffentlicht:

**Karl I.**, Joßberger-Werner M., Schmidt N., Horn S., Goebeler M., Leverkus M., Wajant H., Giner T. (2014). TRAF2 inhibits TRAIL- and CD95L-induced apoptosis and necroptosis. *Cell Death & Disease*. 2014 Oct 9;5:e1444. doi: 10.1038/cddis.2014.404.

Derzeit eingereichte Manuskripte:

Lima A.L., **Karl I.**, Giner T., Poppe H., Schmidt M., Presser D., Goebeler M., Bauer B. Keratinocytes and neutrophils are important sources of proinflammatory molecules in acne inversa. *British Journal of Dermatology* 2015, April 2015 eingereicht.

### 9.2.2 Posterpräsentationen und Kongressvorträge

**Karl I.** & Giner T. CARP2 und seine Rolle in Todesrezeptor-vermittelten Signalwegen und Apoptose. Vortrag auf der 1. ADF Winter School, Schneefernerhaus, Zugspitze, Januar 2012.

**Karl I.**, Joßberger-Werner M., Wajant H., Giner T. Partners in life and death – caspase 8 complexes. Vortrag und Poster auf dem 23. Deutschen Hautkrebskongress 2013 und ADO-Jahrestagung in Essen. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* Volume 11, Issue 9, pages 900–964, September 2013.

**Karl I.**, Joßberger-Werner M., Giner T. Death Receptor stimulation - a signal to die for?! Poster auf der PROMOMED 2013, Uniklinikum Würzburg, Mai 2013.



---

**Karl I.**, Joßberger-Werner M., Schmidt N., Horn S., Basse S., Goebeler M., Leverkus M., Wajant H., Giner T. TRAF2 inhibits death receptor-induced apoptosis and necroptosis in keratinocytes. Poster auf der 41. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Köln im März 2014. *Experimental Dermatology* 2014. DOI: 10.1111/exd.12314

**Karl I.**, Schmidt N., Horn S., Goebeler M., Leverkus M., Giner T. The necroptosis-sensitizing effect of TRAF2 knockdown upon TRAIL stimulation is a genuine TRAIL signalling effect and can be mimicked by TWEAK. Vortrag und Poster auf der 42. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Ulm im März 2015. *Experimental Dermatology* 2015. DOI: 10.1111/exd.12623

**Karl I.**, Dworschak J., Probst C., Komorowski L., Zillikens D., Schmidt E. Specific and sensitive detection of serum autoantibodies against novel recombinant forms of the BP180 ectodomain in patients with bullous pemphigoid and mucous membrane pemphigoid. Vortrag und Poster auf der 42. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Ulm im März 2015. *Experimental Dermatology* 2015. DOI: 10.1111/exd.12623

Basse S., **Karl I.**, Schmidt N., Goebeler M., Houben R., Giner T. Exposure of melanoma cell lines to TRAIL induces an ameboid-like phenotype. Poster auf der 42. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Ulm im März 2015. *Experimental Dermatology* 2015. DOI: 10.1111/exd.12623

### 9.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Ampere
Ak	Antikörper
APAF1	apoptotic protease activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BID	BH3 interacting domain death agonist
BSA	Bovines Serumalbumin
CARD	caspase-associated recruitment domain
Caspase	cysteinyI-aspartate specific protease
CD95	apoptosis-mediating surface antigen (FAS)
CD95L	apoptosis-mediating surface antigen (FAS ligand)
cFLIP	cellular FLICE-like inhibitory protein
CHX	Cycloheximid
cIAP	cellular inhibitor of apoptosis protein
DcR	decoy receptor
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DR	death receptor
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated death domain (Protein)
FCS	fötales Kälberserum

---

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fn14	Fibroblast growth factor-inducible 14 (TWEAK-Rezeptor)
g	Gramm
h	Stunde(n)
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IKK	Inhibitor of kappa-B Kinase
IL	Interleukin
I $\kappa$ B $\alpha$	Inhibitor of kappa-B alpha
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
kD	Kilodalton
L	Liter
LT	Lymphotoxin
M	molar (Mol/Liter)
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute(n)
NEMO	NF $\kappa$ B essential modifier
NF $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
NIK	NF $\kappa$ B-inducing kinase
PAGE	Polyakrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
RelB	reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
RING	really interesting new gene
RIP	receptor interacting protein
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodezylsulfat
SMAC	second mitochondria-derived activator of caspase
tBID	truncated BID
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

---

TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R1/2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1/2
TPCA-1	2-[(Aminocarbonyl)amino]-5-(4-fluorophenyl)-3-thiophencarboxamid
TRADD	TNFR-associated death domain
TRAF	TNFR-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAILR	TNF-related apoptosis inducing ligand receptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEAK	TNF-related weak inducer of apoptosis
V	Volt
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
zVAD-fmk	Z-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluoromethylketon