

Das Adapterprotein TRAF2 und seine Bedeutung für die Todesrezeptor-vermittelte Signaltransduktion

**The adaptor protein TRAF2 and its meaning for the death receptor induced
signal transduction**

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

vorgelegt von
Jennifer Kreckel

geb. 27.06.1990 in Wiesbaden-Dotzheim

Würzburg, 2019

Eingereicht am: 16. Dezember 2019

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Charlotte Förster,
Dekanin der Fakultät für Biologie

Gutachter: Prof. Dr. Harald Wajant

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Müller

Tag des Promotionskolloquiums: 04. März 2020

Doktorurkunde ausgehändigt am:

I. EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG

Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5

der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Das Adapterprotein TRAF2 und seine Bedeutung für die Todesrezeptor-vermittelte Signaltransduktion**“ eigenständig, d. h. insbesondere selbständig 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.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „**The adaptor protein TRAF2 and its meaning for the death receptor induced signal transduction**“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

Würzburg, _____

Datum

Unterschrift

II. INHALTSVERZEICHNIS

I. EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG.....	2
II. INHALTSVERZEICHNIS	3
1. Zusammenfassung	6
2. Summary	8
3. Einleitung	9
3.1. Die TNF Superfamilie (TNFSF)	9
3.1.1. Liganden der TNFSF	9
3.1.2. Rezeptoren der TNFRSF	10
3.2. Das Todesrezeptor-vermittelte Signalnetzwerk.....	12
3.2.1. Signaltransduktion nach Stimulation des TRAILR1, TRAILR2 und CD95 ...	13
3.2.2. Signaltransduktion des TNFR1	15
3.3. Der NFκB-Signalweg.....	18
3.4. Die Apoptose: Mechanismus des kontrollierten Zelltodes.....	19
3.4.1. Molekulare Bausteine der Apoptose: Caspasen.....	19
3.4.2. Der Signalweg der Apoptose	20
3.5. Die Proteinfamilie der TRAFs.....	21
3.5.1. Aufgaben von TRAF1	23
3.5.2. Aufgaben von TRAF2	24
3.6. Zielsetzung.....	25
4. Material	26
4.1. Verwendete Zelllinien.....	26
4.2. Verwendete Liganden der TNFSF	27
4.3. Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte	28
4.4. Puffer und Lösungen.....	30
4.5. Antikörper.....	32

4.6. Chemikalien und anwendungsfertige Kits	34
4.7. Software	35
5. Methoden	36
5.1. Zellkultur	36
5.1.1. Produktion von Fusionsproteinen	36
5.1.2. Generierung stabiler Zelllinien	37
5.2. Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA)	38
5.3. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT)-Vitalitätstest	38
5.4. Immuno-Blotting	39
5.4.1. Herstellung von Totalzelllysaten	39
5.4.2. Immunpräzipitation (IP)	40
5.4.3. Gelelektrophorese	40
5.4.4. Transfer auf die Membran und Entwicklung mit <i>Enhanced Chemiluminescence</i> (ECL)	41
5.5. Caspase-8-Aktivitätstest	42
6. Ergebnisse	43
6.1. Die TRAIL-induzierte Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges ist in HCT116-Zellen unabhängig von der Caspase-8-Aktivität	43
6.2. Deletion von TRAF2 reduziert die proinflammatorische Signalgebung in HCT116-PI3Kmut-Zellen und hat keinen Effekt auf den Todesrezeptor-induzierten Zelltod ...	50
6.3. TRAF2-Defizienz führt zu erhöhter Todesrezeptor-induzierter Caspase-8 Spaltung	60
6.4. Das SMAC Mimetik BV6 beschleunigt die Prozessierung der Procaspase-8 und zeigt einen geringfügigen Effekt auf die Todesrezeptor-induzierte proinflammatorische Signalgebung	66
7. Diskussion	71
7.1. Die Rolle von TRAF2 im NFκB-Signalweg der Todesrezeptoren	74
7.2. TRAF2 und seine Rolle in der Induktion der Apoptose	78
III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	81

V. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	83
VI. QUELLENVERZEICHNIS	87
VII.PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	100
I. Während der Promotion entstandene Publikationen.....	100
II. Vor der Promotion entstandene Publikationen.....	100
DANKSAGUNG	101

1. Zusammenfassung

Während die Rolle des *tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor (TRAF)2* in der Signaltransduktion der TRAF-interagierenden Rezeptoren der *TNF Receptor (TNFR)- Superfamily (TNFRSF)* bereits in der Vergangenheit umfassend erforscht wurde, ist die Rolle und Funktion dieses Adapterproteins für die Signalgebung der Todesrezeptoren nicht vollständig aufgeklärt. Die unklare Funktion der *Really Interesting New Gene (RING) E3 Ligase Domäne* in TRAF2 und die Abhängigkeit von Caspasen für die Aktivierung des klassischen *nuclear factor κ B (NF κ B)*-Signalweges führten in dieser Arbeit zur Herstellung von CRISPR/Cas9 *knockout (KO)* Zellen, bei denen TRAF2 in der Kolorektalkarzinomzelllinie HCT116 als auch in den Fibrosarkomzellen HT1080 ausgeschaltet wurde. Diese Zellen wurden zuvor so modifiziert, dass die Apoptose „downstream“ der Caspase-8-Aktivierung nicht weiter induzierbar war. HCT116-Zellen exprimierten hierzu ein mutiertes Allel der *Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)* und HT1080-Bcl2-TNFR2 Zellen das anti-apoptotische Protein *B-cell lymphoma 2 (Bcl2)*.

Im Fokus dieser Arbeit waren die Todesrezeptoren TNFR1, *TNF-Related Apoptosis Inducing Receptor (TRAILR)1/2* und *Cluster of Differentiation(CD)95*. In den TRAF2-KO Zelllinien war der alternative NF κ B Signalweg konstitutiv aktiv und der TNFR1-induzierte klassische NF κ B-Signalweg inhibiert. Die proinflammatorische Signalgebung in Form der Interleukin (IL)8 Produktion war in den CD95-artigen Todesrezeptoren signifikant, aber nicht vollständig, reduziert und erfolgte Caspase-8-Aktivität unabhängig. Der Effekt der TRAF2-Deletion konnte durch eine Rekonstitution von TRAF2, jedoch nicht durch eine Überexpression von TRAF1 wiederhergestellt werden.

Des Weiteren führte die TRAF2-Defizienz zu einer verstärkten Procaspase-8-Prozessierung nach Aktivierung von Todesrezeptoren, die überraschenderweise mit einer Reduktion der Caspase-8-Aktivität einherging. Die Prozessierung der Procaspase-8, jedoch nicht die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges wurde vermutlich durch eine verringerte Rekrutierung von *cellular inhibitor of apoptosis protein (cIAP)1* an den TNFR1 erreicht. Die Expression der anti-apoptotischen Proteine *FADD-like ICE (FLICE) Inhibitory Protein (FLIP)_{Long(L)}*, *FLIP_{Short(S)}* und *cIAP1* wurde nicht von der TRAF2-Depletion beeinflusst.

Somit konnte in dieser Arbeit ein nicht-obligatorischer Effekt von TRAF2 auf die Regulation der proinflammatorischen Todesrezeptor-vermittelten Signaltransduktion nachgewiesen werden, die durch TRAF1 nicht ersetzt werden kann. Des Weiteren wurde eine bisher nicht beschriebene, stabilisierende Wirkung von TRAF2 auf die Capsase-8-Aktivität gezeigt.

2. Summary

The role of tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor (TRAF)2 in signaltransduction of TRAF-interacting receptors of the TNF Receptor (TNFR)-Superfamily (TNFRSF) is well-studied during the last decades. The role and the function of this adapter protein for the signaling of death receptors, however, still remains largely unclear. Ambiguous E3 ligase function of their TRAF2-Really Interesting New Gene (RING) domain and the dependency from caspase-8 for classical nuclear factor κ B (NF κ B) activation resulted in this work in the generation of TRAF2-Knockout (KO) CRISPR/Cas9 cells both in the colorectal carcinoma cell line HCT116 and in the fibrosarcoma cell line HT1080. These cell lines were previously modified to gain apoptosis-resistance downstream the activation of caspase-8. Therefore, HCT116 cells expressed a mutated allele of the phosphoinositide-3-kinase (PI3K) and HT1080-TNFR2 cells expressed the anti-apoptotic protein B-cell lymphoma 2 (Bcl2).

Focus of this study was the death receptors TNFR1, *TNF-Related Apoptosis Inducing Receptor* (TRAILR)1/2 and Cluster of Differentiation (CD)95. TRAF2-KO cells displayed a constitutive active alternative NF κ B pathway and inhibition of the TNFR1-induced classical NF κ B pathway. The stimulation of proinflammatory signaling in the form of upregulation of interleukin (IL)8 production was reduced partially but significantly in CD95-type death receptors and in a caspase-8-activity independent way. The reconstitution of TRAF2 but not an overexpression of TRAF1 was able to reverse the effects of TRAF2 deficiency.

Additionally, the TRAF2-depletion increased DR-induced procaspase-8-processing, surprisingly resulting in the downregulation of caspase-8-activity. Processing of procaspase-8, but not the activation of the classical NF κ B-pathway were presumably achieved by an inhibition of the recruitment of cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1) to the TNFR1. Expression of the anti-apoptotic proteins FLICE Inhibitory Protein (FLIP)_{Long(L)}, FLIP_{Short(S)} and cIAP1 were unaffected by TRAF2-depletion.

Taken together, this work was able to show a non-obligate effect of TRAF2 in the regulation of DR-induced proinflammatory signaling, which was not restorable by TRAF1. Furthermore, we saw a stabilizing effect of TRAF2 on caspase-8 activity, which was not described previously.

3. Einleitung

3.1. Die TNF Superfamilie (TNFSF)

Bereits vor mehreren Dekaden wurde von William B. Coley die Immunantwort gegen Karzinome entdeckt (Coley, 1936). In der Geschichte der TNFSF wurden zunächst Lymphotoxin (LT) und TNF als Produkt von Lymphozyten und Makrophagen identifiziert, welche die Lyse von speziellen Zelltypen, insbesondere von Tumorzellen bewirkten (Granger et al., 1969; Carswell et al., 1975). Die Einordnung als eigene Proteinfamilie, der TNFSF, geschah nach der Entdeckung von Ähnlichkeiten in der *complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA) von LT α und TNF (Gray et al., 1984; Pennica et al., 1984). Die aktuell 19 Mitglieder umfassende Liganden-Familie der TNFSF weisen Ähnlichkeiten in der *TNF Homology Domain* (THD) auf, die im Abschnitt 3.1.1. näher erläutert werden (Locksley et al., 2001).

Auf natürliche Weise werden Rezeptoren der TNFRSF von ihren TNFSF-Liganden aktiviert (Locksley et al., 2001; Bodmer et al., 2002), mittlerweile werden zudem auch Antikörper bzw. Antikörper-Fusionsproteine zur Aktivierung dieser Rezeptoren genutzt (Wajant, 2015).

3.1.1. Liganden der TNFSF

Die Liganden der TNFSF besitzen eine konservierte Domäne, die THD. Durch die THD lagern sich die Liganden-Monomere bevorzugt zu Homotrimeren zusammen, um in dieser Form an ihre(n) Rezeptor(en) binden zu können (Bodmer et al., 2002). Wenige Liganden der TNFSF bilden auch Dimere oder Heterotrimere (Androlewicz et al., 1992; Wajant, 2015). Mit Ausnahme von LT α werden Liganden der TNFSF als Transmembranproteine des Typs II exprimiert. An die THD grenzt eine sogenannte *stalk region*, die Schnittstellen für Proteasen enthalten kann und die THD von der Transmembrandomäne trennt. Nach Proteasespaltung können TNFSF-Liganden daher von der membranständigen in eine lösliche Form übergehen (Abb.1) (Wajant, 2015).

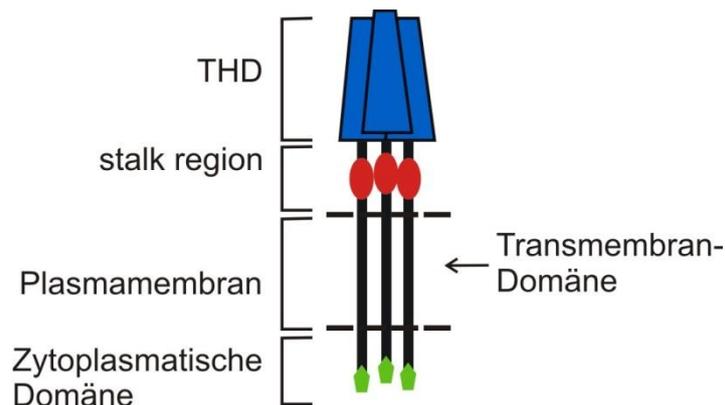


Abbildung 1: Schematische Darstellung der TNFSF Liganden.

Der Ligand ist als Homotrimer aufgebaut, welches durch die THD gebildet wird. Er ist in der Plasmamembran verankert und besitzt eine zytoplasmatische Domäne. Durch Spaltung in der *stalk region* kann der Ligand von der membranständigen in die lösliche Form übergehen.

3.1.2. Rezeptoren der TNFRSF

Die Mitglieder der TNFRSF verbindet ein gemeinsames strukturelles Merkmal, die *Cystein Rich Domain* (CRD), welche sich in mehreren Kopien im extrazellulären Teil der TNFRSF befindet (Zhang, 2004). Die CRDs haben die Aufgabe, die Bindung des Liganden an den Rezeptor zu vermitteln (Smith et al., 1994) sowie bei Abwesenheit von Liganden Di- oder Trimere des Rezeptors zu bilden (Chan et al., 2000). Am N-terminaleen Bereich der Rezeptoren der TNFRSF befindet sich die *pre-ligand assembly domain* (PLAD). Aufgabe der PLAD ist die spontane Bildung von Rezeptor-Dimeren in Abwesenheit von Liganden, um die Rezeptoraffinität zu erhöhen. Dabei haben PLAD-PLAD Interaktionen selber eine geringe Affinität, welche ein dynamisches Gleichgewicht zwischen vielen Rezeptor-Monomeren und wenigen Rezeptor-Dimeren bewirkt. Obwohl die Affinität in Rezeptor-Dimeren für den Liganden erhöht ist, reicht die ligandenfreie Dimerisierung nicht aus, um eine starke Aktivierung der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion zu induzieren (Wajant, 2014, 2015).

Wie für TNFSF-Liganden gibt es auch von einigen Rezeptoren der TNFRSF lösliche Varianten. Der extrazelluläre Teil wird durch proteolytische Spaltung abgetrennt. Die löslichen Rezeptoren von CD27, CD30, CD40, TNFR1 und TNFR2 können somit die Sensitivität von Zellen gegenüber korrespondierender Liganden durch Abnahme der

membranständigen Rezeptoren oder Neutralisation löslicher Liganden beeinflussen (Gruss und Dower, 1995; Aderka, 1996; Garton et al., 2006).

Aufgrund struktureller und funktioneller Unterschiede der Rezeptoren der TNFRSF, insbesondere im intrazellulären Teil, erfolgt eine Unterteilung in drei Gruppen: Die Gruppe der TRAF-interagierenden Rezeptoren, die *Decoy* Rezeptoren und die Todesrezeptoren (Abb. 2) (Wajant, 2015).

TRAF-interagierende Rezeptoren zeichnen sich unter anderem durch ihre robuste Induktion der Inflammation aus. Sie enthalten je nach Rezeptor ein bis drei Bindestellen für Adapterproteine (die *TRAF-binding site* (Tbs)) der TRAF-Familie.

Über die *Decoy*-Rezeptoren ist vor allem bekannt, dass sie für die Regulation der Aktivität anderer Mitglieder der TNFRSF verantwortlich sind. Mitglieder der Todesrezeptor-Untergruppe sind wie die TRAF-interagierenden Rezeptoren ebenfalls in der Lage eine inflammatorische Antwort zu induzieren, können aber auch die Induktion programmierter Zelltod-Prozesse (Apoptose, Nekroptose) auslösen. Dieser wird primär durch eine Todesdomäne am Rezeptor induziert (Wajant, 2015).

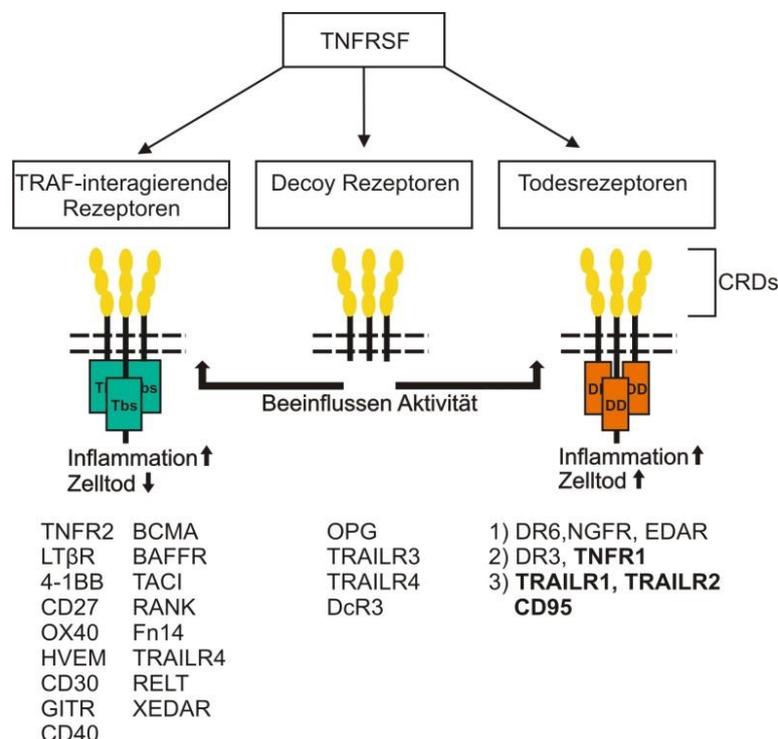


Abbildung 2: Mitglieder und Untergruppen der TNFRSF.

Gemeinsames strukturelles Merkmal der TNFRSF ist die CRD. Die Einteilung in die Gruppe der TRAF-interagierenden Rezeptoren, den Decoy-Rezeptoren oder den Todesrezeptoren erfolgt nach der intrazellulären Domäne und somit auch nach der funktionellen Ausrichtung (Inflammation, Regulation, Zelltod). Die Rezeptoren TNFR1, TRAILR1 und TRAILR2 sind hervorgehoben und im Fokus dieser Arbeit.

3.2. Das Todesrezeptor-vermittelte Signalnetzwerk

Der Begriff der Todesrezeptoren wurde erstmals 1997 mit Verweis auf die Apoptose-induzierenden Mitglieder der TNFRSF, TNFR1, CD95, *death receptor* (DR)3, TRAILR1 und TRAILR2 verwendet. Diese sind in der Lage, den Zelltod durch Rekrutierung von *Fas7-associated surface antigen (Fas)-associated death domain* (FADD) und der Procaspase-8 direkt an den Rezeptorkomplex (CD95, TRAILR1 und TRAILR2) oder indirekt durch Rekrutierung dieser Proteine in einen induzierten Komplex im Zytosol (TNFR1, DR3) zu induzieren. Aufgrund der zwei unterschiedlichen Wege, den Zelltod zu initiieren, werden die Todesrezeptoren in drei Gruppen unterteilt.

TNFR1 und DR3 bilden eine Gruppe, die zunächst die *TNF-Receptor Associated Death Domain* (TRADD) rekrutiert und den FADD-Caspase-8 Komplex erst im Zytoplasma bildet. TRAILR1, TRAILR2 und CD95 bilden die zweite Gruppe, die zunächst FADD und Caspase-8 rekrutiert und somit direkt den Signalweg der Apoptose induziert (Siegmond et al., 2017). Der *low-affinity nerve growth factor receptor* (p75NGFR), *ectodysplasin A receptor* (EDAR) und DR6 gehören ebenfalls zu den Todesrezeptoren, da sie eine Todesdomäne aufweisen und den Zelltod induzieren können, jedoch verläuft dieser FADD-Caspase-8 unabhängig. Somit bilden diese Rezeptoren eine eigene dritte Gruppe (Wajant, 2003). Da in dieser Arbeit der TNFR1, TRAILR1, TRAILR2 und CD95 im Vordergrund stehen, werden die induzierten Signalwege dieser Rezeptoren in diesem Kapitel weiter erläutert.

Im direkten Vergleich zwischen TNFR1-induzierter Signalgebung und CD95-artiger Signalgebung wird klar, dass die primär an den Rezeptor rekrutierten Komplexe Ausschlag über die präferierte Funktion der Rezeptorgruppen geben. Wird bei TRAILR1/2 und CD95 in kürzester Zeit ein Zelltod-induzierender Komplex und erst im Zytoplasma der NFκB-Signalweg induziert, agiert TNFR1 in vivo eher als Initiator inflammatorischer Prozesse und weniger als Auslöser des Zelltodes. Die Apoptose wird beim TNFR1 nicht am Rezeptorkomplex induziert, sondern durch einen sekundär im Zytoplasma gebildeten Komplex, der die Caspase-8 aktiviert (Micheau und Tschopp, 2003; Fullsack et al., 2019).

Bei beiden Signalwegen wird zusätzlich zur Apoptose auch die Nekroptose induziert. Das Nekroptose-induzierende Signalwegprotein *Receptor Interacting Protein* (RIP) kann ebenfalls sowohl an den DR als auch als Teil des zytosolischen Caspase-8-

aktivierenden Komplexes rekrutiert werden (Pasparakis und Vandenabeele, 2015). Die Nekroptose wird charakterisiert durch das Anschwellen der Organellen, erhöhtes Zellvolumen und die Zerstörung der Plasmamembran, der eine Inflammation folgt (Vanden Berghe et al., 2014).

In diesem Kapitel wird zunächst detailliert auf die Signaltransduktion von TNFR1, CD95 und TRAIL1/2 eingegangen und anschließend erneut die einzelnen Signalwege der NFκB-Aktivierung und der Apoptose-induktion näher behandelt. Zudem werden die Adapterproteine der TRAF-Familie weiter beschrieben.

3.2.1. Signaltransduktion nach Stimulation des TRAILR1, TRAILR2 und CD95

CD95, TRAILR1 und TRAILR2 bilden eine gemeinsame Untergruppe der Todesrezeptoren, da an ihrem DR-*death ligand* (DL) Komplex das Adapterprotein FADD rekrutiert wird (Abb.3). Im weiteren Verlauf der Signaltransduktion rekrutiert FADD mit seiner *Death Effector Domain* (DED) die Initiatorcaspase Procaspase-8 (p55/53) und bildet im Komplex mit DL und DR den *Death inducing signaling complex* (DISC). Zusätzliche Procaspase-8 Moleküle werden an den DISC rekrutiert, damit Procaspase-8 Dimere ihre enzymatische Aktivität entfalten können: Autokatalyse lässt p43/p41 Intermediate der Caspase-8 entstehen (Wang et al., 2008). Die Nekroptose kann ebenso durch CD95, TRAILR1 und TRAILR2 vermittelt werden. Hierbei werden FADD-vermittelt RIP-RIP3 Komplexe im Zytoplasma gebildet (Geserick et al., 2008; Tsuchiya et al., 2015).

Für die Aktivierung des CD95-, TRAILR1- und TRAILR2-induzierten NFκB-Signalweges ist die Bildung des DISC obligat. Da auf Grundlage der Forschungsergebnisse diverser Arbeitsgruppen unterschiedliche Rollen von RIP und TRAF2 in der NFκB-Aktivierung gezeigt wurden, liegt die Vermutung zweier Signalwege nahe: Ein RIP-abhängiger, vermutlich TRAF2 unterstützter Signalweg, der Caspase-8 unabhängig ist und durch den RIP-TRADD-TRAF2 Komplex vermittelt wird und ein Signalweg, der von der Caspase-3-induzierten *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1* (MEKK1) Aktivierung abhängig ist und somit durch Caspase-8 Inhibitoren wie *N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp* (zVAD)-*fluoromethyl* ketone (FMK) und *Z-IE(OMe)TD(OMe)* (zIETD)-FMK blockiert werden kann (Siegmond et al., 2017)

Erst kürzlich konnte von Lafont et al. die Beteiligung des *linear ubiquitin chain assembly complex* (LUBAC) an der TRAIL-induzierten Genexpression und des Zelltodes nachgewiesen werden, welche bisher unter den Todesrezeptoren hauptsächlich als TNFR1-Signalkomponente vermutet wurde. Wie beim TNFR1 geschieht die Rekrutierung des LUBAC durch TRAF2 und RIP, jedoch überraschenderweise nicht im zytoplasmatische Signalkomplex von TRAILR1/2, sondern bereits auch im Plasmamembran-assoziierten Signalkomplex (Lafont et al., 2017). Dies zeigt auch, dass das aktuelle Modell der CD95-artigen Todesrezeptor-induzierten Signalgebung bis heute nicht vollständig ist (Wajant, 2017).

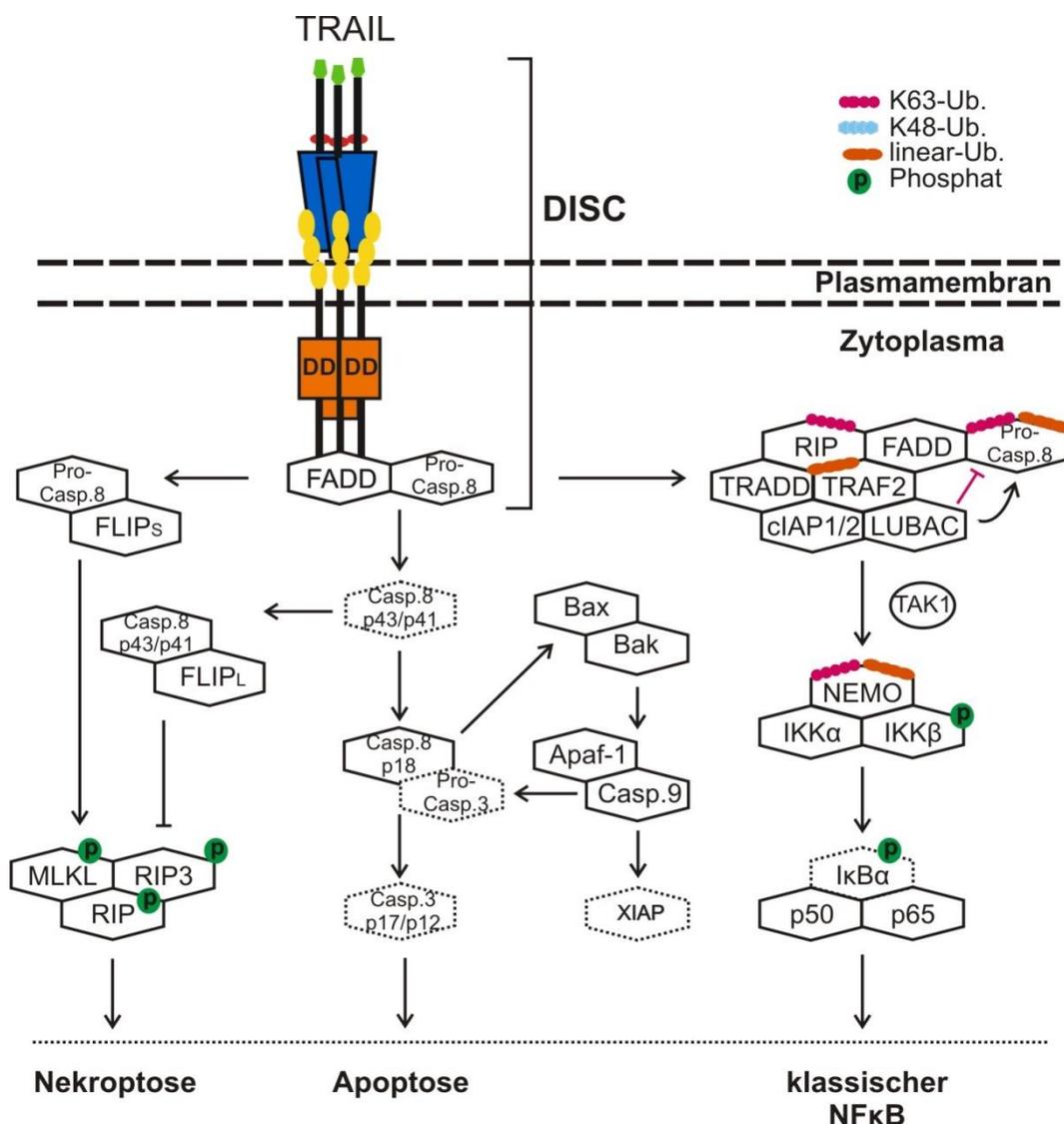


Abbildung 3: Schema der durch TRAIL und CD95L induzierten Signalwege.

Nach Bindung durch den Liganden bildet der DL-DR Komplex den DISC. Autokatalyse der Procaspase-8 führt zur Bildung eines Caspase-8 Intermediates. Nach erneuter Prozessierung entsteht die aktive Caspase-8, die im weiteren Verlauf

Effektorcaspasen wie die Caspase-3 spaltet. Die Aktivierung der Effektorcaspasen führt zur Induktion der Apoptose, wenn diese nicht durch andere Signalwegkomponenten inhibiert wird. Die intrinsische Apoptose kann bei Vorkommen bestimmter Faktoren ebenfalls die Apoptose induzieren. *Bcl2 associated protein X* (Bax) und *Bcl2 agonist/killer* (Bak) aktivieren die Freisetzung von proapoptotischen Proteinen aus dem Mitochondrium, wie z.B. Zytochrom-c. Dieses wiederum induziert einen Komplex aus *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1) und Caspase-9, der die Apoptose durch Caspase-3-Aktivierung und die Degradation anti-apoptotischer Proteine induziert. FLIP_L und FLIP_S können die Apoptose durch Bindung an die Caspase-8 inhibieren. Hierbei kann der Zelltod jedoch auch durch die Nekroptose bei FADD-RIP-RIP3 Komplexbildung induziert werden. Durch den Komplex aus FLIP_S mit der Procaspase-8 werden die Zellen zur Nekroptose sensitiviert und durch den Caspase-8 p43/41-FLIP_L-Komplex inhibiert. Durch Rekrutierung von TRAF2, cIAP1 und dem LUBAC wird der klassische NFκB-Signalweg aktiviert, indem RIP und *NFκB essential modulator* (NEMO) ubiquitiniert werden. Zudem wird die Prozessierung der Procaspase-8 inhibiert.

3.2.2. Signaltransduktion des TNFR1

Die wichtigsten TNFR1-gesteuerten Signalwege (Abb. 4) werden durch die Bindung von löslichen oder membranständigen TNF an den Rezeptor stimuliert. Durch DD-DD vermittelten Interaktionen des TNFR1 und der zytoplasmatischen Proteinen TRADD und RIP wird der Komplex I gebildet. Dieser Membran-assoziierte Komplex bildet sich innerhalb von Sekunden und aktiviert den klassischen NFκB-Signalweg. Die Expression der durch diesen Signalweg regulierten Proteine beginnt in weniger als einer Stunde (Brenner et al., 2015).

Ist RIP abwesend, wird die Rekrutierung von TRADD und TRAF2 an den TNFR1 verstärkt. In Abwesenheit von TRADD findet die Rekrutierung von TRAF2 schwächer statt, die RIP Rekrutierung ist hingegen verstärkt (Zheng et al., 2006; Fullsack et al., 2019).

Das Adapterprotein TRAF2 bindet mit hoher Affinität an TRADD und mit geringerer Affinität an RIP. Somit werden TRAF2-Homotrimere oder TRAF1-TRAF2-Heterotrimere via RIP und/oder TRADD an den TNFR1 rekrutiert. Zusätzlich mit TRAF2 werden die zytoplasmatischen Proteine cIAP1 oder cIAP2 an den TNFR1 korekrutiert (Wajant und Scheurich, 2011).

Die Modifikation diverser Komponenten des TNFR1-Signalweges mit Ubiquitin findet unter anderem durch cIAPs statt. Speziell RIP wird hierbei mit K63-Ubiquitinketten

versehen und erhält somit Bindestellen für die E3-Ligase LUBAC. Der LUBAC modifiziert anschließend RIP mit linearen Ubiquitinketten, was wiederum die Rekrutierung der *Mitogen-Activated Protein 3 Kinase (MAP3K) transforming growth factor-β (TGF-β)-activated kinase-1 (TAK-1)* erlaubt, welche den klassischen NFκB-Signalweg durch Phosphorylierung von IKK2 des IKK Komplexes aktiviert. Die Transkription von FLIPs, cIAP2, A20 und TRAF1 wird durch diesen Signalweg reguliert. Die Aktivierung der MAPK-Kaskaden durch den Komplex 1 kann ebenso den Signalweg der Jun-Kinase und p38 induzieren (Wajant und Scheurich, 2011; Brenner et al., 2015).

Mit steigender Dauer der Stimulation internalisiert der TNFR1-Signalkomplex und dies geht einher mit der Freisetzung der an den TNFR1-gebundenen Signalmoleküle. Dieser Komplex könnte als Einheit vom TNFR1 dissoziieren und dadurch zusammen mit FADD, Caspase-8 oder RIP3 den Komplex II bilden. Werden Caspase-8 und FADD an diesen zytoplasmatischen Komplex gebunden, kann der Signalweg der Apoptose ausgelöst und diese unter bestimmten Voraussetzungen induziert werden. Hierbei kommt es zur Reifung der Caspase-8 von der Procaspase-8 zum $(p18-p10)_2$ Heterotetramer, das Effektorcaspasen wie die Caspase-3 aktivieren kann. Die Apoptose-Induktion wird typischerweise unterdrückt durch konstitutive oder induzierte Expression von FLIP-Proteinen oder der K63-Ubiquitinierung von RIP. Solange FLIP exprimiert wird und RIP ubiquitiniert wird, wird in der Zelle die Apoptose inhibiert. Zur Apoptose-Induktion können Zellen mit einer Behandlung mit Cycloheximide (CHX) zur Unterdrückung der FLIP-Expression oder dem *second mitochondria-derived activator of apoptosis (SMAC)*-Mimetik BV6 zur Reduktion von cIAP1 und cIAP2 sensitiviert werden. FLIP_L kann auch die Induktion der Nekroptose durch den Komplex IIb inhibieren, indem es im heterodimeren Komplex mit Caspase-8 RIP und RIP3 spaltet. Bei dem Komplex IIb wird die Nekroptose durch Akkumulation von RIP und RIP3 induziert (Brenner et al., 2015; Annibaldi und Meier, 2018).

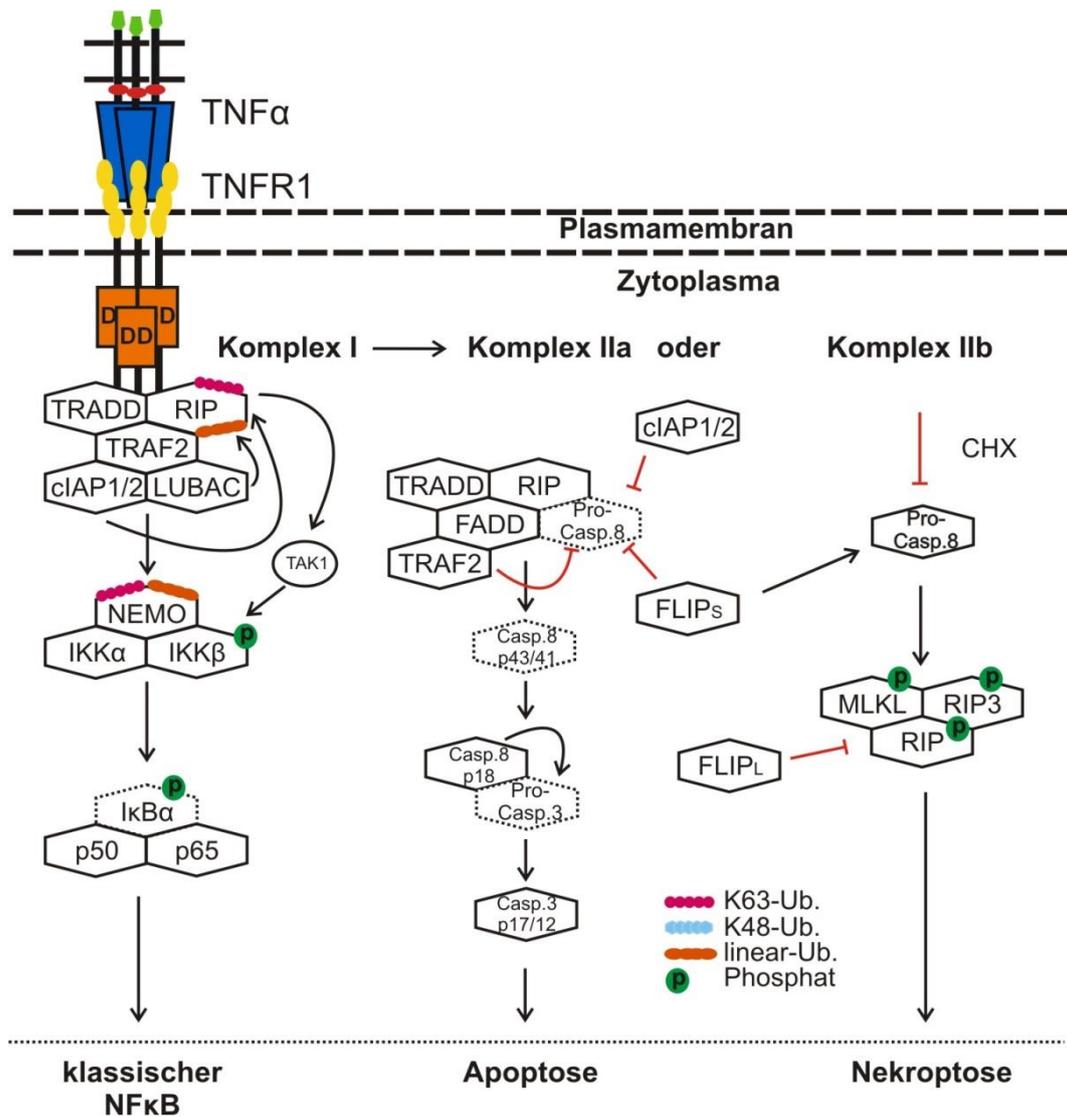


Abbildung 4: TNFR1-assoziierte Signalwege.

Nach Stimulation des TNFR1 mit TNF wird zunächst der NFκB-aktivierende Komplex I durch Rekrutierung von TRADD und RIP an den Rezeptorkomplex gebildet. Hierbei werden anschließend zunächst TRAF2-cIAP1/2 rekrutiert, gefolgt vom LUBAC. Ubiquitinierung und Phosphorylierung führen zu einer Aktivierung des IKK mit anschließender Degradation von IκBα. Mit der Internalisierung des TNFR1-Komplexes werden die Signalwegkomponenten in das Zytoplasma freigesetzt und können nun den Zelltod-induzierenden Komplex II mit dem Protein FADD bilden. Hierbei kommt es zur Prozessierung von Initiator- und Effektorcaspasen (hier in Form von Caspase-8 und Caspase-3) und zur Induktion der Apoptose (Komplex IIa). Der Komplex IIb kann bei Expression von RIP, RIP3 und MLKL die Nekroptose induzieren, vorausgesetzt, die Prozessierung der Procaspase-8 wird inhibiert.

3.3. Der NFκB-Signalweg

Gene für die Funktion des Immunsystems sowie der Differenzierung und Proliferation werden durch dimere Transkriptionsfaktoren der NFκB-Familie reguliert (Beg et al., 1995). NFκB-Dimere setzen sich aus fünf verschiedenen Untereinheiten zusammen: p65 (RelA), RelB, cRel, p50 (Teil des Precursorproteins p105) und p52 (Teil des Precursorproteins p100). Im unstimulierten Zustand befinden sich diese Dimere im Zytoplasma, unfähig über ihre Kernlokalisationssequenz zum Nukleus zu gelangen, da diese über einen Inhibitor maskiert wird. Der NFκB-Signalweg unterscheidet sich in zwei Varianten, die nach der Art, wie die Dimere im Zytoplasma festgehalten werden unterteilt werden können (Wajant und Scheurich, 2011).

Beim klassischen NFκB-Signalweg wird das Dimer intermolekular blockiert und befindet sich in einem ternären Komplex mit dem *Inhibitor of κB* (IκB). Bei Rezeptoren der TNFRSF wird der klassische NFκB-Signalweg durch TRAF-Adapterproteine aktiviert, wodurch der *IκB kinase* (IKK) Komplex, bestehend aus IKK1, IKK2 und dem NEMO, gebildet wird. Der IKK-Komplex phosphoryliert IκB-Proteine, weshalb diese dann proteasomal degradiert werden (Scheidereit, 2006; Hayden und Ghosh, 2008; Wajant und Scheurich, 2011).

Zur Aktivierung des alternativen NFκB-Signalwegs ist bei Rezeptoren der TNFRSF die TRAF2/TRAF3 Degradation von Nöten, die zu einer Akkumulation der *NFκB inducing kinase* (NIK) mit anschließender IKK1-Aktivierung führt. Der alternative NFκB-Signalweg wird anschließend durch Phosphorylierung von p100 durch IKK1 vermittelt. Die Kernlokalisationssequenz wird durch eine intramolekulare, inhibitorische Domäne maskiert. Es besteht ein binärer Komplex, bei dem p50 und p52 als Vorläuferproteine mit einem Molekulargewicht von 105 Kilodalton (kDa) oder 100 kDa vorliegen, in der die inhibitorische Domäne im C-terminalen Bereich integriert ist. Erst bei Spaltung des Vorläuferproteins kann p50 oder p52 zum Nukleus translozieren (Scheidereit, 2006; Hayden und Ghosh, 2008; Wajant und Scheurich, 2011).

3.4. Die Apoptose: Mechanismus des kontrollierten Zelltodes

Der Begriff der Apoptose wurde durch Kerr, Wyllie und Currie geprägt und beschreibt eine Form des Zelltodes, bei der die *Deoxyribonucleic acid* (DNA) fragmentiert wird (Kerr et al., 1972). Morphologisch wird die Apoptose, zusätzlich zur DNA-Fragmentation, charakterisiert durch Kondensation des Zytoplasmas und des Chromatins, das Abrunden der Zellen, Aufblähen der Membran, Kollabieren des Zytoskeletts und die Bildung von apoptotischen Körpern, die anschließend vom Immunsystem phagozytiert werden (Wyllie et al., 1980).

Zunächst war Apoptose ein Begriff in der deskriptiven Zellbiologie, bis Sulston und Horvitz in ihren Studien des programmierten Zelltodes in *C.elegans* einen molekularen Mechanismus der Apoptose entdeckten (Sulston und Horvitz, 1977). Im Jahr 1993 wurden erstmals Ähnlichkeiten zwischen einer Cystein-Protease aus dem in *C.elegans* kodierten Gen *cell death abnormal* (*ced*)-3 und des humanen IL1 β -konvertierenden Enzyms entdeckt (Cerretti et al., 1992; Thornberry et al., 1992; Yuan et al., 1993). Eine Überexpression dieses Enzyms konnte in Säugetierzellen die Apoptose induzieren (Miura et al., 1993) und ist heute als Caspase-1 bekannt. Elf humane Caspasen wurden bis heute entdeckt, Caspase 1-10 und Caspase-14 (Li und Yuan, 2008).

3.4.1. Molekulare Bausteine der Apoptose: Caspasen

Cysteinylyl aspartat specific proteinases (Caspasen) werden als Zymogene synthetisiert, die aus einer Prodomäne, einer p20 und einer p10 großen Untereinheit, aufgebaut sind (Abb.5). Aktivierung des Zymogens durch proteolytische Spaltung entfernt die Prodomäne und trennt die beiden Untereinheiten voneinander (Li und Yuan, 2008). Die Caspasen können nach ihrer Prodomäne charakterisiert werden und in Initiator- und Effektorcaspasen unterteilt werden. Effektorcaspasen besitzen eine kurze Prodomäne, zu Ihnen zählen die Caspasen 3, 6, 7. Initiatorcaspasen exprimieren große Prodomänen, die als Protein-Protein-Interaktionsdomäne dienen. Caspase-8 und -10 haben eine DED, die Caspasen 1, 2, 4, 5, 9, 11 und 12 haben eine *caspase recruitment domain* (CARD) als Prodomäne (Li und Yuan, 2008).



Abbildung 5: Struktur der humanen Caspasen.

Die humanen Caspasen teilen sich die Untereinheiten p10 und p20 sowie eine Prodomäne als strukturelles Merkmal. Während die Effektorcaspasen Casp-3, 6 und 7 eine kurze Prodomäne aufweisen, verfügen die Initiatorcaspasen über Protein-Protein Interaktionsdomänen. Die Caspasen-8 und -10 exprimieren zwei DEDs, die Caspasen 1,2,4,5,9,11 und 12 die CARD.

Sowohl Initiator- als auch Effektorcaspasen sind in der Lage, Caspase-Substrate zu spalten. So ist zum Beispiel bekannt, dass die Caspase-8 *Cylindromatosis* (CYLD) spalten kann, um die Zelle gegenüber Nekroptose zu schützen (O'Donnell et al., 2011). Ein weiteres Caspase-8-Substrat ist RIP. Die Spaltung dieses Proteins blockiert die TNF-induzierte NFκB-Aktivierung und lenkt die Signaltransduktion in Richtung Apoptose-Induktion. Das Spaltprodukt von RIP reguliert die Interaktion zwischen TRADD und FADD (Lin et al., 1999). Das Spektrin α-Fodrin wird durch die Caspasen-3 und -8 gespalten (Vanags et al., 1996; Janicke et al., 1998). TRAF1 kann durch die Caspasen-3,-6,-8 und-10 ebenfalls zu zwei Fragmenten von ca. 28 und 22 kDa gespalten werden (Leo et al., 2001), wodurch TRAF1 wie auch RIP von einem Modulator zu einem Inhibitor der NFκB-Aktivierung umgewandelt werden (Henkler et al., 2003).

3.4.2. Der Signalweg der Apoptose

Wie bereits in diesem Kapitel erläutert, wird die Apoptose durch ein Protein-Protein-Interaktionsmodul in der extrazellulären Domäne der Todesrezeptoren induziert: der DD. Hierbei wird die Rekrutierung diverser Adapterproteine induziert, die zu einer Aktivierung von Caspasen führt (Siegmond et al., 2017). Zelltypabhängig ist die direkte Aktivierung der Caspase-8/Caspase-3 Achse ausreichend, um die Apoptose zu initiieren. Diese Zellen werden als Typ I Zellen bezeichnet. Ist die Caspase-8-vermittelte Caspase-3-Aktivierung alleine nicht ausreichend, spricht man von Typ II Zellen (Li und Yuan, 2008). Hierbei muss zur Apoptoseinduktion das Signal durch das Mitochondrium amplifiziert werden. Durch ein intrinsisches Signal, wie zum Beispiel Schäden an der DNA, Infektionen oder Zellstress werden pro-apoptotische

Proteine der *Bcl2 homology domain3 (BH3) only* Familie aktiviert, die wiederum die Proteine Bax und Bak binden können. Falls keine anti-apoptotischen Proteine wie Bcl-2 vorliegen, können Bak und Bax oligomerisieren und Poren in der Membran des Mitochondriums bilden. Das dabei austretende Zytochrom-c aktiviert Apaf-1, welcher nach Homo-Oligomerisierung einen Caspase-aktivierenden Komplex bildet, der die Initiatorcaspase-9 und die Effektorcaspasen-3 und -7 rekrutiert. Der Komplex aus Apaf-1 und der Caspase-9 wird auch als Apoptosom bezeichnet. Zusätzlich zu Zytochrom-c wird auch der SMAC freigesetzt. Dieser neutralisiert IAPs durch Bindung an deren *baculovirus IAP repeat 3 (BIR3)*. Die dadurch erleichterte Aktivierung der Effektorcaspasen erlaubt dann die Apoptose (Bratton und Salvesen, 2010). Die extrinsische Apoptose kann die Zytochrom-c-Freisetzung ebenfalls unterstützen, indem die aktive Caspase-8 den *BH3 interacting domain death agonist (Bid)* in seine verkürzte Form, *truncated Bid (tBid)* spaltet. Dieses kann, wie die anderen Mitglieder der BH3 Familie auch, anti-apoptotische Proteine inhibieren und Bax/Bak aktivieren (Westphal et al., 2011).

Der Apoptose unterliegen Kontrollmechanismen, die die Dauer der Apoptose-Induktion limitieren. Unter anderem kann die autokatalytische Spaltung durch FLIP_L und FLIP_S reguliert werden. Diese sind in ihrem Aufbau der Caspase-8 ähnlich und können mit dieser dimerisieren. Da die enzymatische Aktivität der Caspase-8 von der Dimerisierung abhängt, blockieren diese Prozesse die Aktivierung der Caspase-8 teilweise oder gar vollständig. Im Fall von FLIP_S findet in Heterodimeren mit der Procaspase-8 keine Spaltung mehr statt. Heterodimere aus der Procaspase-8 mit FLIP_L können gespalten werden und Intermediate (Caspase-8 p43/41, FLIP_L p41) bilden, diese haben jedoch eine eingeschränkte Aktivität (Safa, 2012; Tsuchiya et al., 2015).

3.5. Die Proteinfamilie der TRAFs

Als Adapterprotein für den TNRF2 wurden TRAF1 und TRAF2 als erste Mitglieder der TRAF-Familie entdeckt (Rothe et al., 1994). Die Familie der TRAFs setzt sich aus sechs Mitgliedern, TRAF1-6, zusammen. Von den 29 Mitgliedern der TNFRSF können 20 TRAF2 direkt an ihre intrazellulären Domänen binden, einige der verbleibenden Mitglieder rekrutieren TRAF indirekt (Silke und Brink, 2010). Die

Mitglieder der TRAF-Familie sind wie folgt aufgebaut: Eine konservierte C-terminale Domäne, die TRAF Domäne, ist ein strukturelles Merkmal aller TRAFs und besteht aus etwa 200 Aminosäuren. Die TRAF Domäne wird wiederum unterteilt in eine konservierte C-terminalen TRAF Domäne und einer *coiled coil* N-terminalen TRAF Domäne (Rothe et al., 1994). Vor der N-TRAF Domäne befindet sich bei fast allen Mitgliedern der TRAF-Familie die RING Domäne und mehrere Zink Finger. Ausnahme bildet TRAF1: dieses hat nur ein Zink Finger Motiv und keine RING Domäne (Abb. 6) (Wajant et al., 1999) .

Protein-Protein-Interaktionen wie die Oligomerisierung der TRAFs oder die Bindung an andere Signalwegkomponenten werden durch die TRAF Domäne gesteuert. Somit ist eine zentrale Rolle der TRAF-Familie als Adapterprotein, die Bildung von Rezeptor-assoziierten Signalkomplexen zu unterstützen (Wajant et al., 2001; Ha et al., 2009; Xie, 2013). Die RING Domäne enthält eine katalytische Ubiquitin-Ligase Domäne und kann in weiteren E3-Ubiquitin-Ligasen, wie zum Beispiel den Bindungspartner der TRAFs, den cIAPs, aufgefunden werden (Rothe et al., 1995; Silke und Brink, 2010).

TRAF2 kann direkt an die zytoplasmatische Domäne von TRAF-interagierenden Rezeptoren binden und sowohl TRAF1 als auch cIAPs indirekt an diese Rezeptoren rekrutieren. Kristallstrukturanalysen haben gezeigt, dass TRAF1 und TRAF2 die Bildung von Heterotrimeren präferieren und cIAP-Moleküle stärker binden als TRAF2-Homotrimere. TRAF1-Homodimere interagieren jedoch nur schwach mit cIAPs (Fotin-Mleczek et al., 2004; Mace et al., 2010; Zheng et al., 2010).

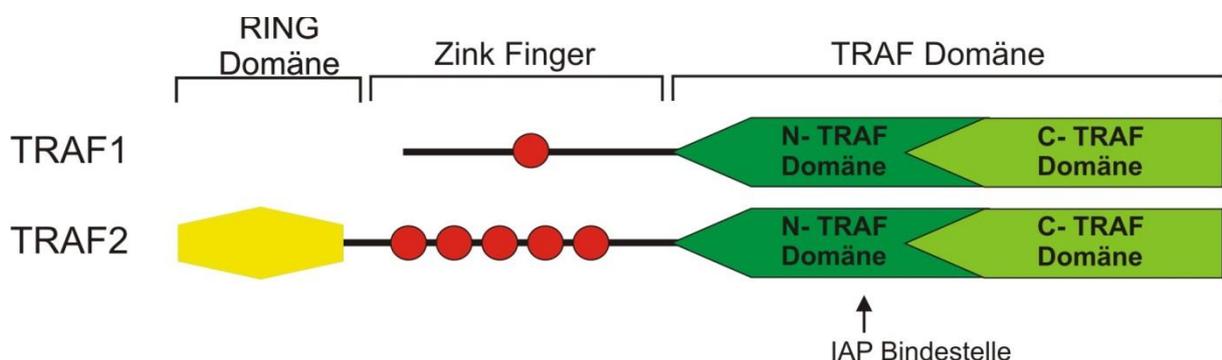


Abbildung 6: Struktureller Aufbau von TRAF1 und TRAF2.

Die Mitglieder der TRAF-Familie verbindet die TRAF Domäne als strukturelle Gemeinsamkeit. Die RING Domäne wird von allen Mitgliedern der TRAF-Familie, mit Ausnahme von TRAF1, exprimiert. Die E3-Ligase-Aktivität wird durch die RING Domäne vermittelt. Mitglieder der TRAF-Familie unterscheiden sich zudem durch ihre

Anzahl an Zink Fingern. Während TRAF1 einen Zink Finger beinhaltet, verfügt TRAF2 über fünf dieser Motive.

3.5.1. Aufgaben von TRAF1

Unter allen TRAFs ist die Expression von TRAF1 am stärksten limitiert und reguliert (Zapata et al., 2000). TRAF1 ist ein NFκB-regulierter Faktor und eine wichtige Komponente der TNFRSF-Signaltransduktion. Die Expression von TRAF1 ist in unstimulierten Zellen schwach und kann durch verschiedene pro-inflammatorische Faktoren wie IL1, Lipopolysaccharid oder Rezeptoren der TNFRSF induziert werden (Lee und Choi, 2007). Sowohl durch den klassischen als auch durch den alternativen NFκB-Signalweg kann die TRAF1-Expression stark induziert werden und ist in Lymphomen mit konstitutiver NFκB-Aktivierung daher hoch (Zhang et al., 2007).

TRAF1 reguliert die Stabilität von TRAF2-clAP1 und TRAF2-clAP2-Komplexen und verhindert somit die Rezeptor-induzierte TRAF2-Degradation nach Stimulation einiger Mitglieder der TNFRSF, wie zum Beispiel TNFR2 und dem *Fibroblast growth factor-inducible 14* (Fn14) (Wicovsky et al., 2009a; Wicovsky et al., 2009b).

Der Einfluss der TRAF1-Expression auf die Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges durch ein Mitglied der TNFRSF hängt von der Fähigkeit der TRAF1-TRAF2 Heterotrimere zur Interaktion mit dem Rezeptor ab (Fotin-Mleczek et al., 2004; Guo et al., 2009; McPherson et al., 2012). Obwohl TRAF1 nicht an TRAF3 bindet, einer Komponente des Komplexes der den alternativen NFκB-Signalweg reguliert (TRAF2-TRAF3-clAP1), spielt TRAF1 eine Rolle in dessen Regulation. So konnte bereits ein TRAF1-abhängiger Anstieg der Kerntranslokation von p52 und RelB in TNFR1-stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Hierbei wurde das Substrat p100 verstärkt exprimiert, das Verhältnis von p100 zu p52 blieb jedoch unverändert (Choudhary et al., 2013).

TRAF1 kann Caspase-abhängig gespalten werden, wodurch es von einem selektiven Modulator der TNFR-Signaltransduktion zu einem generellen Inhibitor der NFκB-Aktivierung konvertiert wird (Henkler et al., 2003).

3.5.2. Aufgaben von TRAF2

Der alternative NFκB-Signalweg wird bei Rezeptoren der TNFRSF durch TRAFs reguliert. In der unstimulierten Zelle binden sowohl TRAF2 als auch TRAF3 konstitutiv an NIK. Hierbei rekrutiert TRAF2 cIAP1 und cIAP2, welche wiederum NIK durch K48-Polyubiquitinierung zur proteosomalen Degradation markieren. Der alternative NFκB-Signalweg wird erst bei Akkumulation von NIK aktiviert. Dies folgt nach Rekrutierung des TRAF2-TRAF3-cIAP Komplexes an bestimmte TRAF-interagierende Rezeptoren der TNFRSF wie TNFR2. Ohne das Vorkommen dieses Komplexes im Zytoplasma akkumuliert NIK, was wiederum IKK1 aktiviert und so den alternativen NFκB-Signalweg startet. Im Rezeptorkomplex induzieren die cIAPs die Degradation von TRAF2 und TRAF3 durch K48-Polyubiquitinierung (Matsuzawa et al., 2008; Gardam et al., 2011; Varfolomeev et al., 2012).

Im TNFR1-gesteuerten Signalnetzwerk bilden TRAF1-TRAF2-cIAP Komplexe Antagonisten der Caspase-8-Aktivierung und inhibieren somit die Induktion der Apoptose (Wang et al., 1998). Der Wegfall von TRAF2-Komplexen durch TRAF-interagierende Rezeptoren sensitiviert die Zellen gegenüber der Apoptose (Vince et al., 2008; Wicovsky et al., 2009b). TRAF2 ist außerdem nicht nur ein negativer Regulator der Todesrezeptor-induzierten Apoptose, sondern auch ein Antagonist für TRAIL- und CD95L-induzierter Nekroptose (Karl et al., 2014).

Ob TRAF2 als K48-Ubiquitin-Ligase aktiv ist oder nicht, ist immer noch ungeklärt. Neuere Studien geben Hinweise auf eine K48-Ubiquitin-Aktivität von TRAF2, die zuständig für die Markierung der aktiven Caspase-8 zur proteosomalen Degradation ist (Vince et al., 2007; Vince et al., 2008; Gonzalez et al., 2012). Diese Beobachtungen mit der Struktur-basierten Unfähigkeit von TRAF2 zur Interaktion mit E2-Enzymen in Einklang zu bringen, fällt jedoch schwer (Yin et al., 2009).

Im klassischen NFκB-Signalweg werden cIAP1 und cIAP2 über TRAF2 an den TNFRSF-Rezeptor-Signalkomplex rekrutiert. Mit deren RING Domäne kann wiederum RIP ubiquitiniert werden und somit der NFκB-Signalweg aktiviert werden. Außerdem rekrutiert TRAF2 in Verbindung mit cIAP1 oder cIAP2 den LUBAC (Au und Yeh, 2007; Lafont et al., 2017).

3.6. Zielsetzung

In meiner Arbeit beschäftigte ich mich vor allem mit der Rolle und der Funktion des Adapterproteins TRAF2 für die Todesrezeptoren. Hierbei war der Fokus zunächst auf die Regulation des klassischen NFκB-Signalweges durch CD95-artige Todesrezeptoren gelegt und wurde mit der Regulation der TNFR1-induzierten Signaltransduktion verglichen. Durch das Zusammenspiel zwischen der Regulation des klassischen NFκB-Signalweges und der Apoptose-Induktion nach Caspase-8-Aktivierung war TRAF2 für mich besonders interessant, da es ein wichtiges Bindeglied zur Rekrutierung weiterer Signaltransduktionsproteine darstellt. Da Zellen mit TRAF2-KO Apoptose-sensitiv sind, wurde der TRAF2-*Knockout* in den Apoptose-resistenten Zelllinien HCT116-PI3Kmut und HT1080-Bcl2-TNFR2 durchgeführt. Da die Apoptoresistenz in diesen Typ II-Zellen „*downstream*“ der Caspase-8-Aktivierung begründet liegt, ermöglichen die Zellen Untersuchung der TNFR1, CD95 und TRAILR1/2 gesteuerten Signalwege „*upstream*“ der Caspase-3-Aktivierung, inkl. der Caspase-8-Aktivierung. Die Aufgabe des Adapterproteins TRAF1 konnte durch TRAF2-KO-Zellen mit Überexpression des TRAF1-Proteins untersucht werden.

4. Material

4.1. Verwendete Zelllinien

Die Zelllinien HCT116-PI3Kwildtypisch(wt) und HCT116-PI3Kmutiert(mut) wurden bereits 2005 durch Samuels et al. beschrieben (Samuels et al., 2005) und freundlicherweise von Bert Vogelstein (Howard Hughes Medical Institute, Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt. Dieser stellte die Zellen mit der Methode „gene targeting“ her und erzielte in einem der beiden Allele die Mutation „H1047R“ zur konstitutiven Aktivierung der PI3Kinasedomäne. Das verbliebene, unbehandelte Allel wurde nach Hirata et al. und Kohli et al. durch ein Adeno-assoziiertes Virus zerstört, damit Zelllinien mit nur einem funktionsfähigen Allel, entweder HCT116-PI3Kwt oder HCT116-PI3Kmut entstehen konnten (Hirata et al., 2002; Kohli et al., 2004).

HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen wurden im Labor von Harald Wajant durch Transfektion von HT1080-Bcl2 *green fluorescent protein* (GFP)-Zellen wie in Kreuz et al. beschrieben hergestellt. Hierbei wurde das Bcl2(GFP)-Fusionsprotein in die HT1080 Zellen über Elektroporation eingebracht und durch Geneticin(G418)-Resistenz auf positive Klone selektioniert (Kreuz et al., 2004).

Sowohl die Zelllinien HCT116-PI3Kmut TRAF2-KO als auch HT1080-Bcl2-TNFR2 TRAF2-KO wurden von Daniela Siegmund im Labor von Harald Wajant unter Verwendung des *GeneArt Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) Nuklease (CD4 Reporter) Vektor Plasmids hergestellt. Die Zelllinien wurden mit dem Plasmid kodierend für zwei TRAF-spezifische guide ribonucleic acid (gRNA) und dem Enzym Cas9 transfiziert. Die Sequenzen für die gRNA wurden dem Anhang von Mali et al. entnommen (Mali et al., 2013) (http://arep.med.harvard.edu/human_crispr).

Die Zelllinien HCT116-PI3Kmut pEGZ, HCT116-PI3Kmut pEGZ-FLIP_L und HCT116-PI3Kmut pEGZ-FLIP_S wurden ebenfalls von Daniela Siegmund unter Verwendung der HCT116-PI3Kmut-Zelllinie und einem retroviralen Vektor, pEGZ, nach Geserick hergestellt (Geserick et al., 2008). Sowohl die TRAF1-Überexpression als auch die TRAF2-Rekonstitution wurden mit *Sleeping Beauty* (SB) Konstrukten von Daniela Weisenberger generiert. Das Plasmid kodiert für das SB-Transposon und wird in Cui et al. näher beschrieben (Cui et al., 2002). Der resultierende Vektor wird als pT2-

SVNeo-MCS bezeichnet. Für TRAF1- (NCBI Ref. NM AK315476.1) und TRAF2- (NCBI Ref. NM_021138.3) kodierende DNA Fragmente wurden in den Vektor pTRE-Tight eingefügt und über BamHI und NotI (TRAF1) oder BamHI und XbaI (TRAF2) die Plasmide pTRE Tight-TRAF1 und pTRE-Tight-TRAF2 gebildet. Um die Regulation von TRAF1 und TRAF2 beeinflussen zu können, wurde zusätzlich ein Amplikon mit einem Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivatorprotein "tTA-Advanced" aus dem Plasmid pTet-Off-Advance eingefügt. Somit wurde das Plasmid pT2-SVNeo-Tetoff-TRE-TRAF1 generiert.

Die Zelllinien HCT116-PI3Kmut TRAF2re, HCT116-PI3Kmut TRAF1 und HCT116-PI3Kmut TRAF2-KO TRAF1 wurden auf Basis dieser Plasmide eigenständig generiert und daher wird dieser Prozess im Methodenteil näher erläutert.

Für die Produktion diverser Fusionsproteine wurde die Zelllinie HEK293 aus dem institutseigenen Vorrat verwendet. Diese Zelllinie exprimiert bereits eine Resistenz für das selektive Antibiotikum Geneticin.

4.2. Verwendete Liganden der TNFSF

Das in dieser Arbeit verwendete TRAIL, KillerTRAIL (Axxora, Lörrach) wurde für diese Arbeit kommerziell erworben. TNF wurde von Daniela Männel (Regensburg) zur Verfügung gestellt.

Die für die Immunpräzipitation benötigten, mit einem *fragment crystallisable* (Fc)-Tag versehenen Plasmide Fc-Flag-TNF60 (ein TNFR1-spezifischer Ligand mit Mutation an den Stellen 32W/86T) und Fc-Flag-TRAIL sowie die Liganden Fc-Flag-CD95L, Flag-TWEAK (TNF-related Weak Inducer of Apoptosis) und Flag-*single chain* (sc)LT α β 2 wurde von Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Innere Medizin kloniert und die Produktion in HEK293-Zellen durchgeführt.

4.3. Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Tabelle 1: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Laborgeräten mit Herstellerangaben.

Allgemein	
0,5-10 µl Transferpipette S	Brand, Wertheim
2-20 µl Pipette Transferpipette S	Brand, Wertheim
20-200 µl Pipette Transferpipette S	Brand, Wertheim
100-1000 µl Pipette Transferpipette S	Brand, Wertheim
20-200 µl Multikanal Transferpipette S	Brand, Wertheim
50-1000 µl Multikanalpipette Finnpipette™	ThermoFisher Scientific, Waltham, (USA)
Advanced Image Cytometer NucleoCounter® NC-3000™	ChemoMetec, Allerod (DK)
Autoklavierbeutel	Hartenstein, Würzburg
Eismaschine AF 124	Scotsman, Mailand, (I)
Gefrierschrank -80 Grad Celsius (°C) „Forma 900 series“	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Glaspipette	Brand, Wertheim
Kühlschrank/Gefrierschrank	Liebherr, Kirchdorf an der Iller
Multikanal Spitzen	Sarstedt, Nümbrecht
NC-Slide A2™	ChemoMetec, Allerod (DK)
NC-Slide A8™	ChemoMetec, Allerod (DK)
PHOmo	Anthos Labtec, Siezenheim (AUT)
Pasteurpipette	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen 20 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Schutzbrille	neoLab, Heidelberg
Vortex 7-2020	neoLab, Heidelberg
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht

Zentrifuge Eppendorf 5424	Eppendorf, Hamburg
Zellkultur	
Cryo.S, 1 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Inkubator	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
KNF Mini-Vakuumpumpe und -kompressor	neoLab, Heidelberg
Mikroskop Evos XL	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Neubauer Zählkammer	Hartenstein, Würzburg
Sicherheitswerkbank BSB 4	Gelaire, Sydney (AUS)
Zellkulturflasche groß 550 ml, 175 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflasche mittel 250 ml, 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkultur Microplatte, 96 Well, PS, F-Boden (Kaminform) Transp., CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkultur Microplatte, 96 Well, PS, F-Boden (Kaminform) Transp., MICROLON®, high binding	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkultur Microplatte, 96 Well, PS, U-Boden Transp., CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkultur Multiwellplatte, 6 Well, PS, Transp., CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkultur Schale, PS, 100/20 mm, Nocken, CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkultur Schale, PS, 145/20 mm, Nocken, CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Western Blot	
Blotkammer kleine Gele	PeqLab, Erlangen
Blotkammer große Gele	PeqLab, Erlangen
Dri-Block DB3	Techne Staffordshire (GB)

Gießstation kleine Gele	Biorad, München
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Garching
Laufkammer große Gele 2	PeqLab, Erlangen
Mini Protean Tetra Cell	BioRad, München
Nitrozellulosemembran	Whatman, Dassel
pH-Meter	HANNA instruments, Kehl am Rhein
Power Supply EPS 301	GE Healthcare, Garching
Rollenmischer	Hartenstein, Würzburg
Röntgenbildentwicklermaschine	Agfa, Düsseldorf
Sonifizierer UP100H	Hielscher, Wanaque (USA)
Whatmanpapier	Hartenstein, Würzburg
Wippschüttler	Hartenstein, Würzburg

4.4. Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Verwendete und hergestellte Puffer und Lösungen.

Assay Diluent	<i>Phosphate Buffered Saline (PBS)</i> 10 % (v/v) <i>Fetal Calf Serum (FCS)</i>
Blotpuffer	0,025 M Trishydroxymethylaminomethan(Tris) 0,0192 M Glycin 20 % (v/v) Methanol
ECL Lösung 1	0,1 M Tris-HCl (pH 8,6) 0,25 mg/ml Luminol
ECL Lösung 2	Dimethylsulfoxid (DMSO) 1,1 mg/ml para-Hydro-Xycoumaric-Acid
ELISA Coating Buffer	0.1 M Carbonat pH 9.5
Einfriermedium	FCS 10 % (v/v) DMSO
IP-Lysispuffer	3 % (v/v) 1 M Tris-HCl, (pH 7,4) 6 % (v/v) 2 M NaCl

	10 % (v/v) Glycerol 1 % (v/v) Triton
Lämmli Puffer (4x)	0.25 M Tris 8 % (w/v) <i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS) 40 % (v/v) Glycerol 20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol 0.004 % (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer	0.05 M Tris 0.38 M Glycin 0.004 M (SDS) pH 8.3
Milch (5 %) /TBS-T	<i>Tris Buffered Saline</i> (TBS) 0,05 % (v/v) Tween-20 (T) 5 % (w/v) Magermilch
MTT-Lysispuffer	50 % (v/v) Dimethylformamid 15 % (w/v) SDS pH 4.7
PBS	0.02 M Natriumphosphat 0.7 % (w/v) NaCl pH 7.2
<i>Phosphate Buffered Saline-Tween</i> (PBS-T)	PBS + 0.05 % (v/v) Tween-20
Sammelgelpuffer	0.5 M Tris 0.015 M SDS pH 6.8
Substratpuffer Reagenz	1,625 % (w/v) ABTS-Puffer 0,1 % (w/v) ABTS-Substrat
TBS	0.02 M Tris 0.8 % (w/v) NaCl pH 7.6
TBS-T	TBS + 0.05 % (v/v) Tween-20
Toxizitätsmix	5 µg/ml CHX 1 µg/ml Puromycin

	200 ng/ml TNF 200 ng/ml Flag-Fc-CD95L 200 ng/ml Flag-TWEAK 0,01 % Natrium Azid
Trenngelpuffer	1.5 M Tris 0.015 M SDS pH 8.8

4.5. Antikörper

Tabelle 3: Antikörperliste mit Angaben zur Spezies, Klonalität und Hersteller.

Antigen	Spezies	Klon	Hersteller	Katalog nr.
A20/TNFAIP3	Kaninchen	D13H3	Cell Signaling, Cambridge (GB)	#5630
α -Fodrin	Kaninchen	Ohne Angabe	Cell Signaling, Cambridge (GB)	#2122
β -Aktin	Maus	AC-15	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)	A1978
Caspase-3	Kaninchen	8G10	Cell Signaling, Cambridge (GB)	#9502
Caspase-8	Maus	5F7	Enzo Life Sciences, Lörrach	ADI-AAM- 118-E
Caspase-9	Kaninchen	Ohne Angabe	Cell Signaling, Cambridge (GB)	#9502
clAP1	Ratte	1E1-1-10	Enzo Life Sciences, Lörrach	ALX-803- 335-C100
CYLD	Kaninchen	D1A10	Cell Signaling, Cambridge (GB)	#8462
DR4	Kaninchen	D9S1R	Cell Signaling, Cambridge (GB)	#42533
DR5	Kaninchen	D4E9	Cell Signaling, Cambridge (GB)	#8074

Flag-M2	Maus	M2	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)	F3165
p-IkBa (Ser32)	Kaninchen	14D4	Cell Signaling, Cambridge (GB)	#2859
IkBa	Maus	L35A5	Cell Signaling, Cambridge (GB)	#4814
IKKβ	Kaninchen	D30C6	Cell Signaling, Cambridge (GB)	#8943
NFκB p52	Maus	Ohne Angabe	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)	05-361
RIP	Maus	38	BD Biosciences, San Jose (USA)	610459
TNF-R1	Kaninchen	C25C1	Cell Signaling, Cambridge (GB)	# 3736
TRAF1	Kaninchen	45D3	Cell Signaling, Cambridge (GB)	#4715
TRAF2	Kaninchen	C192	Cell Signaling, Cambridge (GB)	#4724
Tubulin	Maus	DM1A	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	# 62204
FLIP	Maus	NF6	Adipogen, San Diego (USA)	AG-20B- 0056-C050
Maus- Horseradish peroxidase (HRP)	Kaninchen	Polyklonal	Dako, Glostrup (DK)	P0260
Maus-HRP	Pferd	Ohne Angabe	Cell Signaling, Cambridge (GB)	#7076
Kaninchen- HRP	Ziege	Ohne Angabe	Cell Signaling, Cambridge (GB)	#7074
Ratte-HRP	Ziege	Ohne Angabe	Cell Signaling, Cambridge (GB)	#7077

4.6. Chemikalien und anwendungsfertige Kits

Tabelle 4: Liste der verwendeten Chemikalien und Kits mit Herstellerangaben.

Chemikalie	Hersteller
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)	Roche, Mannheim
ABTS Puffer	Roche, Mannheim
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CHX	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Dulbecco`s PBS	PAA, Pasching
Entwickler	Agfa, Mortsel
Ethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
FAM-FLICA® Caspase-8 Assay Kit	Immunochemistry Technologies, Bloomington (USA)
Fixierer	Agfa, Mortsel
Fötales Bovines Serum (FBS)	PAA, Pasching
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hoechst-33342 (Solution 15)	ChemoMetec, Allerød (DK)
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Luminol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natrium-dihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
N,N,N,N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

OptEIA IL8-ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Para-Hydro-Xycoumaricacid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Polyethylenimine (PEI)	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Proteaseinhibitor „Complete“	Roche, Mannheim
Protein G	Roche, Mannheim
Proteingelmarker (11-190 kDa)	New England Biolabs, Frankfurt
Propidium-Iodid (PI) (Solution 16)	ChemoMetec, Allerod (DK)
Puromycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI)1640 Medium	PAA, Pasching
Salzsäure, rauchend 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin	PAA, Pasching
Wasserstoffperoxid (30 %)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
zIETD-FMK	BD Biosciences, Heidelberg
zVAD-FMK	Bachem, Heidelberg

4.7. Software

Mit dem Microsoft Office Word 2007 Paket (Word, Excel) wurden die Datenwerte des MTT-Vitalitätstests, der IL8-ELISAs und der Caspase-8 Aktivität analysiert und diese Arbeit verfasst. Die Ergebnisse wurden in GraphPad PRISM 5 graphisch dargestellt und die Statistik erfasst. Die Auswertung der NC-3000 Daten erfolgte mit dem Programm NucleoView. Abbildungen wurden mit der CorelDraw Graphics Suite X4 angefertigt. Mit Endnote X7 wurden die Literaturverweise verwaltet.

5. Methoden

5.1. Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ Zufuhr kultiviert. Das verwendete RPMI1640 Medium wurde für die Kultivierung mit 10 % FBS vermischt und zu den Zellen zugegeben. Hatten die Zelllinien das Stadium der Konfluenz erreicht, wurden sie mit 3 ml Trypsin benetzt und im Inkubator gelagert, bis sich alle Zellen von Flaschenboden gelöst hatten. Die Wirkung von Trypsin konnte durch Zugabe von RPMI1640 mit 10 % FBS gestoppt werden. Wenn die Zellen weiter kultiviert wurden, dezimierte man das Zellvolumen auf ein Verhältnis von 1:10-1:5.

Für die dauerhafte Lagerung der Zelllinien wurde das restliche Volumen bei 1200 *rounds per minute* (rpm) für vier Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Einfriermedium gelöst. Diese Lösung wurde anschließend in ein Cryoröhrchen gegeben und die Zellen bei -80°C eingefroren.

Für in-vitro Versuche konnte für das restliche Zellvolumen die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt werden und die Zellen je nach Versuch in 145 mm Zellkulturschalen (zur Produktion von Fusionsproteinen oder zur Generierung von stabilen Zelllinien), in Zellkultur Multiwellplatten (Western Blot, Caspase-8 Aktivitätstest) oder kaminförmigen Zellkultur Mikroplatten (MTT-Vitalitätstest, IL8-ELISA) ausgesät werden.

5.1.1. Produktion von Fusionsproteinen

Einige der in dieser Arbeit verwendeten Liganden der TNFRSF wurden als Fusionsproteine in HEK293 Zellen produziert. Dies geschah teilweise von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und teilweise wurden die Fusionsproteine eigenständig produziert. Hierbei wurden HEK293 Zellen zunächst auf 145 mm Zellkulturschalen ausgesät und kultiviert, bis diese das Stadium der Konfluenz erreicht haben. Die Transfektion erfolgte chemisch mit 36 µg des Transfektionsreagenzes PEI und 12 µg der jeweiligen Plasmid-DNA in 2 ml

RPMI1640 Medium. Zuvor wurden diese drei Komponenten als Transfektionsansatz vermischt und für 15 Minuten inkubiert. Bevor der Transfektionsansatz zugegeben wurde, musste zunächst das Zellkulturmedium auf der Platte entfernt und durch serumfreies Medium ersetzt werden. Tröpfchenweise wurde der Transfektionsansatz auf die Platte gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag sollte das Plasmid von der Zelle aufgenommen worden sein, somit konnte der Transfektionsansatz abgesaugt und frisches Medium mit 2 % FBS zugegeben werden. Nach einwöchiger Kultivierung befanden sich die Fusionsproteine im Überstand. Der Überstand wurde dann in ein 15 ml oder 50 ml Falcon überführt und bei 4600 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Konzentration wurde im Western-Blot durch den Flag-Tag und den Antikörper gegen Flag-M2 bestimmt. Bei 4°C wurde der Überstand gelagert.

5.1.2. Generierung stabiler Zelllinien

Um Zelllinien mit einer veränderten Proteinexpression zu generieren wurden die Zellen wie unter 5.1.1. beschrieben chemisch transfiziert. Für die Transfektion mit dem SB-System wurden 12 µg Plasmid-DNA unter folgenden Plasmiden aufgeteilt: 60 % pT2-SVNeo-Tetoff-TRE-TRAF1 oder pT2-SVNeo-Tetoff-TRE-TRAF2, 30 % pCMV-(CAT) T7-SB100 und 10 % pT2-SVPuro-CMV-TST206. Am Tag nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium abgenommen und durch RPMI1640 Medium mit 10 % FBS und 1 µg/ml Puromycin ersetzt. Nach sieben Tagen waren die Zellen auf die Puromycin-Resistenz selektiert und somit die Zellen angereichert, die Plasmid-DNA aufgenommen haben. Nun konnte eine Verdünnungsklonierung ausgesät werden, bei der die Zellen in 10er Schritten verdünnt wurden. Nach 1- bis 2-wöchiger Inkubation konnten Einzelkolonien gepickt werden. Jede Einzelkolonie wurde anschließend separat kultiviert und im Western Blot analysiert.

5.2. Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA)

Jeweils 40.000 Zellen je Well wurden in 96-Well Platten mit F-Boden ausgesät und am nächsten Tag in 100 µl Volumen stimuliert. Erfolgte die Stimulation in einer Konzentrationsreihe, dann wurden die Titrations in einer 96-Well Platte mit U-Boden angefertigt. Am Folgetag konnte der Überstand abgenommen und in 96-Well Platten mit U-Boden bei -20 °C gelagert oder direkt verwendet werden. In dieser Arbeit wurde der OptEIA IL8-ELISA Kit verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen. Hierbei ist insbesondere zu erwähnen, dass der Fängerantikörper mit *ELISA-Coating-Buffer* auf eine 96-Well Platte mit stärker bindender Beschichtung „MICROLON“ gegeben wurde und unspezifische Bindestellen mit Assay Diluent blockiert wurden. Je 50 µl des zu bestimmenden Zellkulturüberstandes wurden für die Messung verwendet. Zusätzlich wurde ein IL-8 Standard von 2 ng/ml, 1 ng/ml und 0,5 ng/ml mitgeführt. Die Optische Dichte (OD) wurde durch einen Farbumschlag der ABTS im Substratpuffer-Reagenz am Photometer bei 405 nm gemessen. Die IL8-Konzentration wurde anhand einer Standardkurve bestimmt und die Daten mit Excel, GraphPad PRISM5 und CoreIDRAW X4 ausgewertet und graphisch dargestellt.

5.3. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT)-Vitalitätstest

In 96-Well Platten mit F-Boden wurden am Vortag der Stimulation je Well 40.000 Zellen in 100 µl RPMI1640 Medium ausgesät. Die Stimulation erfolgte anschließend über Nacht (16 h) in einem Volumen von 100 µl. Es wurde für die spätere Berechnung der Vitalität jeweils eine Lebendkontrolle (=100 % Vitalität) und eine Tox-Kontrolle (= 0 % Vitalität) mitgeführt. Für die Tox-Kontrolle wurde ein Gemisch von Apoptose-induzierenden oder -sensitivierenden Agenzien zugegeben. Am Folgetag wurden 10 µl MTT-Lösung anschließend mit 25 µl PBS vermischt und auf die Zellen gegeben. Die Platten wurden bei 37°C für 1-2 h inkubiert, je nachdem wie schnell die Farbe der MTT-Lösung einen Umschlag zeigte. Die Reaktion konnte mit 90 µl MTT-Lysispuffer unterbrochen werden. Um eine homogene Farbgebung zu erreichen, wurden die Platten über Nacht bei Raumtemperatur und unter

Lichtausschluss auf dem Wippschüttler inkubiert. Die Messung der Vitalität erfolgte photometrisch bei 570 nm. Die Auswertung der Daten und graphische Aufstellung der Ergebnisse erfolgte mit Excel, GraphPad PRISM5 und CoreIDRAW X4.

5.4. Immuno-Blotting

Zur Bestimmung der Proteinexpression von Totalzelllysaten wurden zunächst steril 2×10^6 Zellen für jede Kammer einer Zellkultur Multiwellplatte (6 Well) ausgesät und über Nacht im Inkubator kultiviert. Für die Aussaat der Zellen für die Immunpräzipitation wurden je Platte 1×10^7 Zellen verwendet und über zwei Tage kultiviert. Je nach Experiment erfolgte anschließend die Stimulation mit einem Liganden der TNFSF oder die Behandlung mit angegebenen Reagenzien. Die Zeitpunkte der Behandlung wurden durch Lagerung der Zellen bei 4°C auf Eis terminiert. Mit einem Zellkulturschaber wurden die Zellen abgekratzt und in ein Zentrifugiergefäß überführt.

5.4.1. Herstellung von Totalzelllysaten

Zur Herstellung von Totalzelllysaten wurden als Zentrifugiergefäß 2 ml Eppendorfgefäße verwendet. Bei 14000 rpm wurden die Zellen zu einem Pellet zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 2 ml PBS aufgenommen und gewaschen. Nach erneuter Pelletierung wurden je nach Pelletgröße 100-120 µl Lämmli Puffer (4x) zugegeben und für 25 Sekunden am Ultraschallprozessor, Max. Amplitude, sonifiziert. Des Weiteren wurden die Proben bei 95°C für vier Minuten (min) im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde das Kondensat herunterzentrifugiert (14000 rpm, 1 min) und das Totalzelllysat entweder bei -20°C gelagert oder direkt für die SDS- Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) verwendet.

5.4.2. Immunpräzipitation (IP)

Jeweils zwei konfluent-gewachsene 145/20 mm Zellkulturschalen wurden je Zeitwert für die Immunpräzipitation verwendet. Hierbei wurde, wie bei der Generierung von Totalzelllysaten, eine bestimmte Menge Ligand der TNFSF zugegeben und je nach Versuchsansatz nach angegebener Inkubationsdauer stimuliert, die durch Lagerung der Zellen auf Eis unterbrochen wurde. Bei der Immunpräzipitation wurden die Zellen in einem 50 ml Röhrchen gesammelt, dreimal mit je 30 ml PBS gewaschen und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde anschließend in 1,5 ml IP-Lysispuffer mit Protease-Inhibitor gelöst und 20 min auf Eis lysiert. Da sich nun die Proteine im Überstand befanden, wurden die Lysate bei 4°C zunächst einmalig für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert, anschließend zweimalig bei 14000 rpm für 20 min. Zwischenzeitlich wurde der Überstand in ein frisches 2 ml Eppendorfgefäß überführt und das Pellet verworfen. Für den 0'-Wert pipettierte man 5 ng des Liganden hinzu. Jeweils 250 µl der Lysate wurden zur Probenauftragung bei -20°C gelagert, jeweils 1200 µl wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß mit 40 µl Protein-G Agarose gegeben. Diese inkubierten über Nacht bei 4°C auf dem Rollenmischer. Am nächsten Tag wurden die Proben 4-malig gewaschen, indem diese bei 5000 rpm runterzentrifugiert und mit einer Insulinspritze der Überstand abgenommen wurde. Mit der gleichen Menge an frischen IP-Lysispuffer wurden die Proben gewaschen. Auf das Pellet wurden dann 120 µl eines 1:1 Gemisches aus IP-Lysispuffer und Lämmli-Puffer (4x) gegeben, für 10 min bei 80°C auf dem Heizblock inkubiert und bei 14000 rpm zentrifugiert. Durch diese Behandlung befand sich das präzipitierte Protein im Überstand, sodass es mit der Insulinspritze aufgenommen und in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt werden konnte. Die Agarose wurde verworfen. Die Immunpräzipitate konnten bei -20°C gelagert oder direkt für die SDS-PAGE verwendet werden.

5.4.3. Gelelektrophorese

Sowohl die Zelllysate als auch die Immunpräzipitate konnten durch die SDS-PAGE aufgetragen und die denaturierten Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden, um anschließend das zu untersuchende Protein spezifisch mit einem Antikörper zu

markieren. Hierbei wurde im Trenngel je nach Größe des Proteins Acrylamid in variablen Anteilen verwendet: Um Proteine größer als 140 kDa zu detektieren, wurde für das Trenngel 8% Acrylamid verwendet, für Proteine von 70-140 kDa 10 % Acrylamid und für kleiner Proteine mit 12 % Acrylamid. Für das Sammelgel wurde 6 % Acrylamid verwendet. In die Gelapparatur wurde zunächst das Trenngel gegossen und durch Zugabe von Isopropanol eine glatte Trennlinie gebildet. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel zugegeben. Für kleine Gele (8,5 x 6 cm) wurde ein Probenkamm mit 15 Taschen genutzt, sodass bis zu 10µl Probe beladen werden konnten, auf großen Gelen (17 x 6 cm) konnten bis zu 20 Proben mit einem Volumen von bis zu 30 µl beladen werden. Der Laufpuffer wurde zugegeben und die Gelelektrophorese gestartet. Diese fand bei kleinen Gelen bei 120 V, max. 400 mA statt. Bei großen Gelen wurde aufgrund der größeren Proteinmenge die Spannung zunächst bei 90 V belassen, bis die Proteine im Trenngel angekommen waren und anschließend ebenfalls auf 120 V erhöht.

5.4.4. Transfer auf die Membran und Entwicklung mit *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)

Der Transfer der nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte nach dem „Sandwich-Prinzip“ im Nass-Blotverfahren: Hierbei wurden alle benötigten Materialien in Blotpuffer getränkt und die Membran auf das SDS-Gel gelegt. Den Abschluss bildeten von beiden Seiten jeweils zwei Bögen Whatmanpapier. Der Transfer erfolgte anschließend bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA innerhalb von 1,5 h (kleine Blotkammer) oder 2,5 h (große Blotkammer).

Im Anschluss wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler in 5% Milch/TBST inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem Primärantikörper, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet war, erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Wippschüttler. Am Folgetag wurde der Antikörper entfernt und die Membran dreimal in TBS-T für 5 min gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper gegen die jeweilige Spezies und mit Meerrettichperoxidase verknüpft zugegeben. Die

Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde gefolgt von dreimaligem Waschen in TBST für je 5 min. Die verwendete ECL-Lösung wurde durch Vermischen von 8 ml ECL Lösung 1 mit 800 µl ECL Lösung 2 und 2,4 µl 30 % H₂O₂ hergestellt und die Membran für 1 min in dieser inkubiert. In einer Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt. Die Intensität des Signals der gebundenen Meerrettichperoxidase bestimmte die Inkubationsdauer auf der Membran. Anschließend wurde der Film in der Entwicklermaschine entwickelt, das Ergebnis eingescannt und mit CorelDRAW X4 die Abbildung erstellt.

5.5. Caspase-8-Aktivitätstest

Zur Induktion der Caspase-8 Aktivität wurden am Vortag in 12-Well Platten $1,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen stimuliert und die Caspase-8-Aktivität nach dem Protokoll des Herstellers unter Verwendung des „FAM-FLICA® Caspase-8 Assay Kit“ der Firma Immunochemistry bestimmt. Hierbei wurde das *fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA)*-Reagenz in PBS rekonstituiert und 5 µl mit 3×10^6 Zellen in 93 µl RPMI Medium und 2 µl Hoechst 33342 vermischt. Im Inkubator wurden die Proben für eine Stunde gelagert und in dieser Zeit zweimal gemischt. Im Anschluss wurden die Ansätze zweimalig mit je 400 µl Apoptose-Waschpuffer gewaschen und bei 1200 rpm (<400 g) zentrifugiert. Die Pellets wurden in je 98 µl Apoptose-Waschpuffer mit 2 µl Propidium Iodid resuspendiert und 30 µl auf den Nucleo-Counter Objektträger A2 beladen. Im NC-3000 wurde das Programm „Caspase Assay“ ausgewählt und die Proben gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte an NC-3000, Excel, GraphPad PRISM5 und CorelDRAW X4.

6. Ergebnisse

Um in dieser Arbeit den Einfluss von TRAF2 auf den Todesrezeptor-induzierten Zelltod und die proinflammatorische Signalgebung zu untersuchen, wurde zunächst die TRAF2-defiziente Zelllinie HCT116-PI3Kmut TRAF2-KO untersucht. Da TRAF2 ein wichtiger Regulator für Proliferation und Zelltod ist und es uns nicht möglich war, eine TRAF2-defiziente, Apoptose-kompetente Zelllinie nach einem etablierten CRISPR/Cas9 Protokoll zu generieren, wurde der *Knockout* in der Apoptose-resistenten Zelllinie HCT116-PI3Kmut durchgeführt. Die Zelllinie HCT116-PI3Kmut wurde bereits in mehreren Publikationen hinreichend beschrieben (Samuels et al., 2005; Guo et al., 2007). So exprimiert diese Zelllinie nur ein mutiertes, aktives Allel des *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha* (PIK3CA) Onkogens, welches sich physiologisch auf die Zelllinie wie folgt auswirkt: Die Zellproliferation ist unabhängig von Wachstumsfaktoren gesteigert. Das für die Signalgebung innerhalb der intrinsischen Apoptose notwendige Protein Bax wird konstitutiv degradiert und es kommt so zu einer Resistenz gegenüber der Apoptose (Samuels et al., 2005; Guo et al., 2007). Dadurch, dass der Pool von Bax betroffen ist, wirkt dieses onkogene Protein „downstream“ von Caspase-8 im Todesrezeptor-induzierten Zelltod (Guo et al., 2007; Ehrenschwender et al., 2010).

6.1. Die TRAIL-induzierte Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges ist in HCT116-Zellen unabhängig von der Caspase-8-Aktivität

Die erste experimentelle Aufgabe in dieser Arbeit war die Verifizierung der Ergebnisse der eben genannten Autoren und somit die erneute Charakterisierung der Zelllinie „HCT116-PI3Kmut“ mit dem mutierten PIK3CA Allel gegenüber der HCT116-PI3Kwt Variante mit der wildtypischen Expression der PIK3CA. Die Apoptoseresistenz in HCT116-PI3Kmut-Zellen bestätigte sich (Abb. 7). Hierbei konnte die Apoptose nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von TRAIL in HCT116-PI3Kwt Zellen induziert werden, während HCT116-PI3Kmut-Zellen im Vergleich dazu weitgehend resistent waren. Selbst die Zugabe von CHX zur

Apoptose-Sensitivierung konnte in diesen Zellen keine robuste Zelltodinduktion durch TRAIL-Zugabe erlauben.

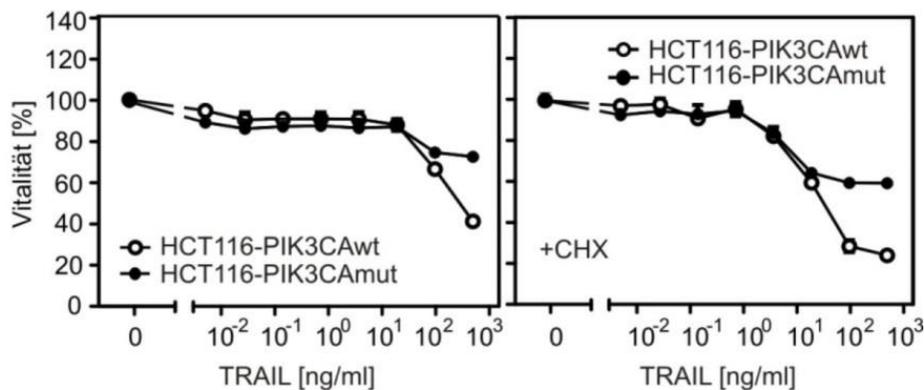


Abbildung 7: HCT116-PI3Kmut-Zellen sind gegenüber TRAIL-induziertem Zelltod resistent.

MTT-Vitalitätstest von HCT116-PI3Kmut (HCT116-PIK3CAmut)- und HCT116-PI3Kwt (HCT116-PIK3CAwt)-Zellen. Die Zellen wurden über Nacht mit der angegebenen Menge TRAIL und ggf. 2,5 µg/ml CHX stimuliert und am Folgetag die Vitalität im Vergleich zu einer Toxizitätskontrolle bestimmt.

Der nächste Aspekt, der untersucht wurde, war die Auswirkung der PIK3CA Mutation auf die TRAIL-induzierte Prozessierung der Procaspase-8. Wie Ehrenschwender et al. bereits zeigen konnte, wird die Procaspase-8 mit ähnlicher Effizienz in HCT116-PI3Kmut-Zellen gespalten wie in HCT116-PI3Kwt-Zellen. Hierbei zeigte sich, dass auch die Proform der Caspase-3 in gleicher Effizienz prozessiert wurde, die Spaltprodukte der Caspase-3, p19 und p17, jedoch in unterschiedlicher Menge detektiert werden konnten. Die aktive Form der Caspase-3 ist p17 und liegt in HCT116-PI3Kwt-Zellen nach TRAIL-Behandlung in höherer Menge vor. Zudem wurde die Procaspase-9 in Ehrenschwender et al. kaum prozessiert, da die Procaspase-9 der intrinsischen Regulation unterliegt (Ehrenschwender et al., 2010). Die gleichen Beobachtungen wurden auch in dieser Arbeit gemacht (Abb. 8). Zusätzlich wurde das Caspase-3 und -8 Substrat α -Fodrin untersucht. Wenn diese Caspasen aktiv sind, wird α -Fodrin zu seinem Spaltprodukt p150 prozessiert. Diese Prozessierung war in HCT116-PI3Kmut-Zellen im Vergleich zur wildtypischen Variante leicht abgeschwächt, was wiederum für eine abgeschwächte Caspase-3-Aktivierung spricht. Da α -Fodrin ebenfalls ein Substrat der Caspase-8 ist, kann auch diese für die Spaltung verantwortlich sein (Vanags et al., 1996; Janicke et al., 1998).

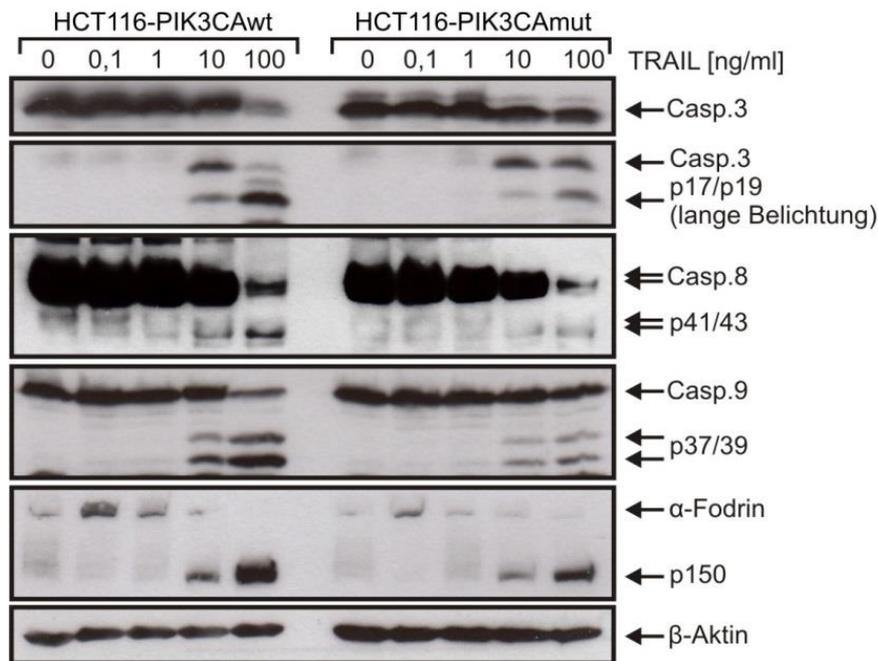


Abbildung 8: Vergleichbare Caspase-8 Prozessierung zwischen HCT116-PI3Kwt- und HCT116-PI3Kmut-Zellen.

Die Proteinexpression von HCT116-PI3Kwt und HCT116-PI3Kmut wurde mit einem Konzentrationsgradienten von TRAIL stimuliert und nach sechsständiger Behandlung bestimmt. Im Western Blot wurde sowohl die Prozessierung der Caspase-8 als auch ihrer Substrate untersucht.

Auch die Analyse der TRAIL-induzierten Phosphorylierung von I κ B α und der Produktion des NF κ B-induzierten Zytokins IL8 in HCT116-PI3Kmut-Zellen bestätigten die früheren Beobachtungen von Ehrenschwender et al. Nach Stimulation mit TRAIL kam es zu einer Induktion der IL8 Produktion und der Phosphorylierung von I κ B α (Ehrenschwender et al., 2010) (Abbildung 9A,B). Die TRAIL-induzierte Phosphorylierung von I κ B α entwickelte sich zwischen 1-4 Stunden nach Liganden-Zugabe und entwickelte ein Plateau, ohne eine starke Degradation von I κ B α hervorzurufen (siehe Abbildung 9B). Letzteres kann daran liegen, dass I κ B α selbst ein Zielgen des klassischen NF κ B-Signalweges ist und daher neu synthetisiertes I κ B α die TRAIL-induzierte I κ B α -Degradation kompensiert.

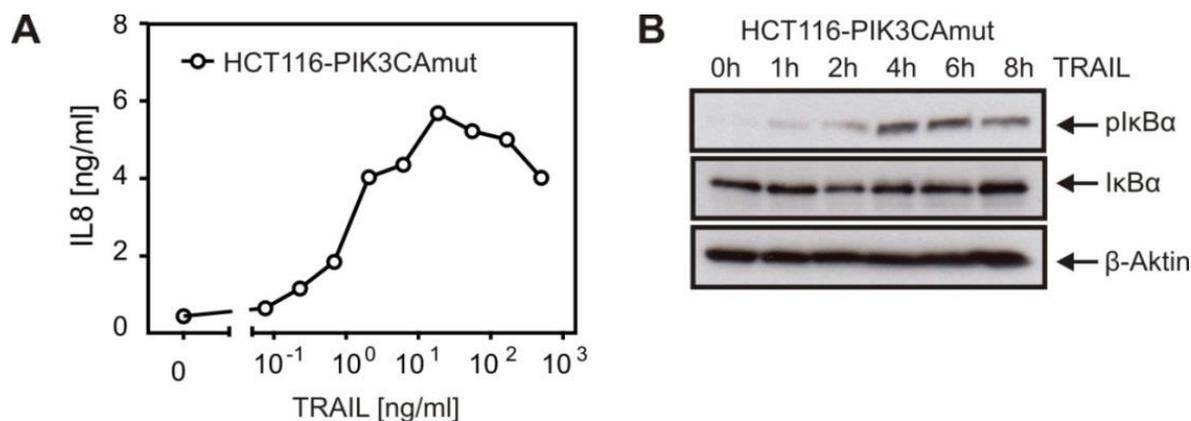


Abbildung 9: TRAIL stimuliert in HCT116-PI3Kmut-Zellen den klassischen NFκB Signalweg.

A Messung der IL8 Konzentration im ELISA nach 16 stündiger Stimulation von HCT116-PI3Kmut-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von TRAIL. **B** Die Phosphorylierung und Degradation von IκBα wurde im Western Blot in einer Zeitreihe nach Behandlung mit 200 ng/ml TRAIL untersucht.

Fasst man die bisherigen Beobachtungen zusammen, dann stimuliert TRAIL in HCT116-PI3Kmut-Zellen den klassischen NFκB Signalweg, ohne den Zelltod auszulösen. Die Apoptoseresistenz gründet sich auf eine Bax-Defizienz, die die vollständige Prozessierung der Procaspase-3 und die Aktivierung des Apoptosoms, welches für die Aktivierung der Caspase-9 verantwortlich ist, inhibiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun ermittelt, ob und inwiefern die Caspase-8-Aktivität in diesen Zellen eine Rolle bei der TRAIL-induzierten Stimulation des klassischen NFκB-Signalweges einnimmt.

Eine durch Caspase-Inhibitoren erhöhte TRAIL- oder CD95L-induzierte NFκB-Aktivierung wurde bereits früher in anderen Zellen gefunden (Harper et al., 2001; Kreuz et al., 2004; Cullen et al., 2013), allerdings gibt es auch Studien, die eine von der Caspase-8-Aktivität geförderte Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges zeigen konnten (Siegmond et al., 2007; Matsuda et al., 2014).

Die Caspase-8 wird durch den Pan-Caspase Inhibitor zVAD-FMK (zVAD) als auch durch den selektiven Caspase-8 Inhibitor zIETD-FMK (zIETD) inhibiert. Zur Überprüfung der Caspase-8-abhängigen oder -unabhängigen Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges wurden daher zVAD-FMK und zIETD-FMK verwendet. Wie in Abbildung 10A zu sehen ist, konnten HCT116-PI3Kwt-Zellen durch die Behandlung mit zVAD von der TRAIL-induzierten Apoptose gerettet werden. In HCT116-PI3Kmut wurde die Apoptose unabhängig von der Zugabe von zVAD nicht

induziert, was mit den Ergebnissen aus Abbildung 7 in Einklang steht. Die TRAIL-induzierte IL8-Produktion wurde nach Behandlung mit zVAD leicht erhöht, was gegen eine Caspase-8-abhängige Induktion des klassischen NFκB-Signalweges spricht. Der positive Einfluss von zVAD war in HCT116-PI3Kwt-Zellen etwas stärker, vermutlich, weil die Zellen von der Apoptoseinduktion geschützt wurden und daher länger IL8 produzieren konnten. Die Abbildung 10B zeigt die Proteinexpression in HCT116-PI3Kmut-Zellen nach Behandlung mit TRAIL und zVAD. Hierbei konnte die Beobachtung der Caspase-8-unabhängigen Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges im TRAILR1/2-Signalweg bestätigt werden, nun jedoch in Form der IκBα-Phosphorylierung. Die Spaltung der Procaspase-8 nach TRAIL-Behandlung konnte bereits mit 20 μM zVAD verhindert werden, die Spaltung des Caspase-8-Substrates CYLD jedoch erst mit 200 μM. Um die vollständige Blockade der Caspase-8-Prozessierung zu gewährleisten, wurde zVAD auch mit 200 μM verwendet. Die Abbildungen 10C und 10D zeigen ähnliche Ergebnisse wie Abbildung 10A und 10B, nur mit dem Unterschied, dass hier der selektive Caspase-8 Inhibitor zIETD verwendet wurde, um Caspase-8 spezifische Effekte zu bestimmen und den Effekt der Blockade weiterer Caspasen auszuschließen.

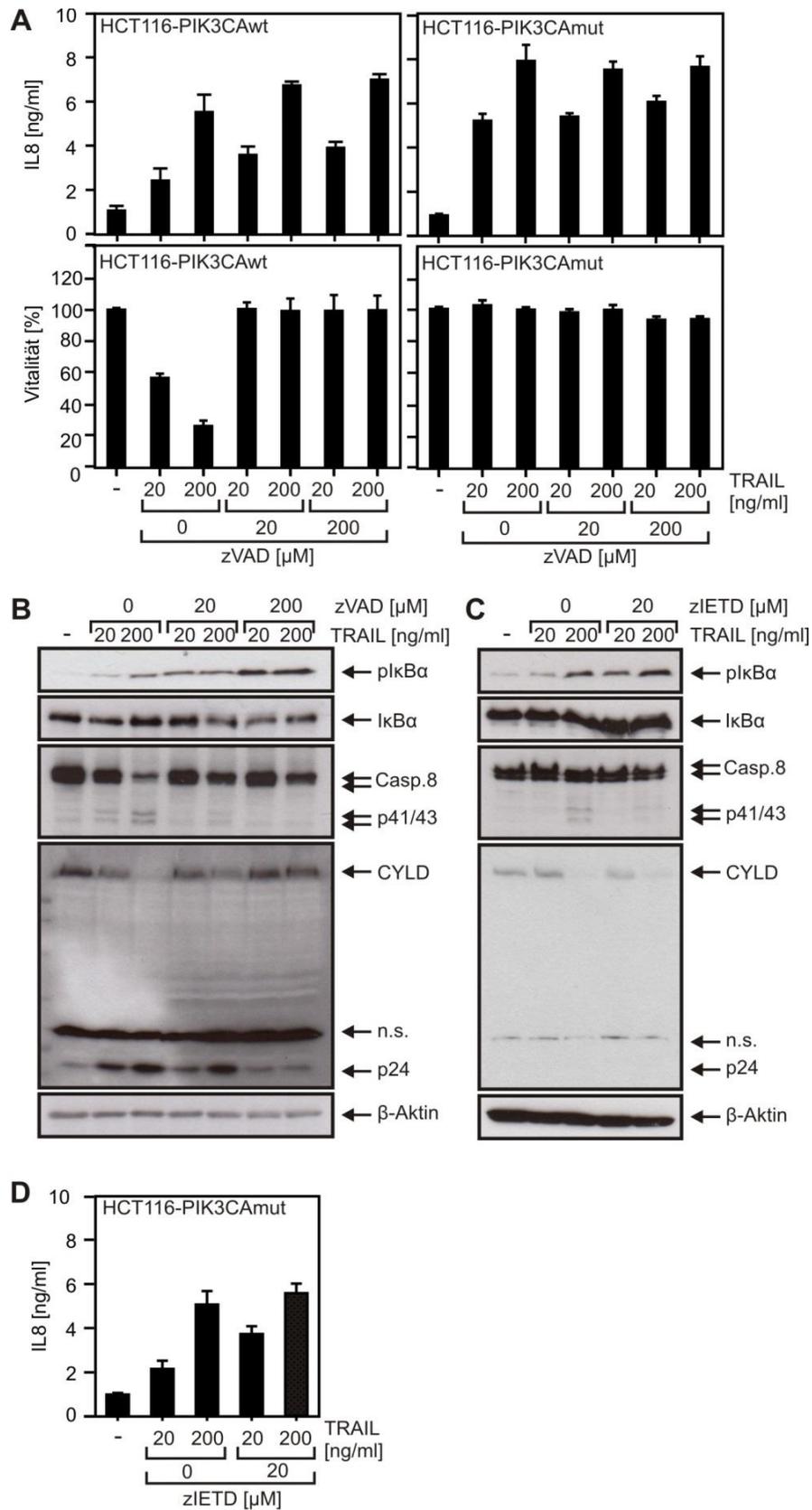


Abbildung 10: Die TRAIL-induzierte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges ist Caspase-8-unabhängig.

A Sowohl HCT116-PI3Kwt- als auch HCT116-PI3Kmut-Zellen wurden mit zwei verschiedenen Konzentrationen von zVAD (20, 200 μ M) und TRAIL (20, 200 ng/ml)

für 16 Stunden behandelt und sowohl die IL8-Produktion im ELISA als auch die Induktion des Zelltodes im MTT-Vitalitätstest bestimmt. Es sind jeweils die Mittelwerte von drei technischen Replikaten dargestellt. **B** HCT116-PI3Kmut-Zellen wurden für sechs Stunden mit zwei verschiedenen Konzentration TRAIL (20, 200 ng/ml) und ggf. zVAD (20, 200 μ M) beziehungsweise **C** einer Konzentration zIETD (20 μ M) behandelt und sowohl Proteine des klassischen NF κ B-Signalweges als auch die Caspase-8 und ihr Substrat CYLD proteinbiochemisch detektiert. **D** HCT116-PI3Kmut-Zellen wurden für 16 Stunden mit TRAIL (20, 200 ng/ml) und gegebenenfalls mit 20 μ M zIETD behandelt und die IL8-Expression im ELISA bestimmt. *ns= nicht spezifisch*

Zusammenfassend konnten bisher folgende Beobachtungen gemacht werden:

1. HCT116-PI3Kmut-Zellen sind gegenüber dem TRAIL-induzierten Zelltod weitestgehend resistent.
2. Die Mutation der PIK3CA hat keine Auswirkung auf die Todesrezeptor-induzierte Procaspase-8-Prozessierung.
3. Der klassische NF κ B-Signalweg kann in HCT116-PI3Kmut-Zellen durch TRAIL induziert werden.
4. Die TRAIL-induzierte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges ist Caspase-8-unabhängig.

Im nachfolgenden Kapitel wurde untersucht, welche Rolle das Adapterprotein TRAF2 in der Todesrezeptor-induzierten Signaltransduktion spielt. Hierbei liegt der Fokus auf einer Regulation des NF κ B-Signalweges und auf der Prozessierung der Caspase-8.

6.2. Deletion von TRAF2 reduziert die proinflammatorische Signalgebung in HCT116-PI3Kmut-Zellen und hat keinen Effekt auf den Todesrezeptor-induzierten Zelltod

Zur Untersuchung des Einflusses von TRAF2 auf die durch Todesrezeptoren vermittelten Signalwege wurde TRAF2 mit CRISP/Cas9 deletiert und die erhaltenen Zellen HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO (TRAF2-KO) zunächst mit der Parentalzelllinie HCT116-PI3Kmut verglichen (Abb. 11). Während HCT116-PI3Kmut-Zellen TRAF2 hinreichend exprimierten, ist dieses Adapterprotein in den TRAF2-KO-Zellen erwartungsgemäß nicht mehr detektierbar.

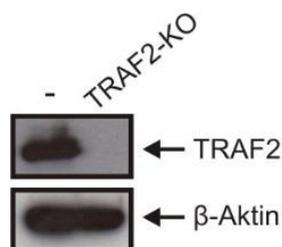


Abbildung 11: HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO-Zellen sind TRAF2-defizient.

Die TRAF2-Proteinexpression wurde in unbehandelten HCT116-PI3Kmut mit der von HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO im Western Blot verglichen.

Da TRAF2 eine entscheidende Rolle in der Regulation des alternativen NFκB-Signalweges spielt (Matsuzawa et al., 2008; Gardam et al., 2011; Varfolomeev et al., 2012), wurde zunächst die Prozessierung von p100 zu p52 untersucht. Bereits im unstimulierten Zustand lag deutlich mehr p52 in HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO Zellen vor als in den parental Zellen, was für eine konstitutive Aktivierung der alternativen NFκB-Signalweges durch die TRAF2-Deletion spricht (Abb. 12A). Diese Prozessierung war selbst durch starke Stimulatoren des alternativen NFκB-Signalweges wie sLTAβ₂ und TWEAK nicht weiter zu verstärken (Abb. 12B).

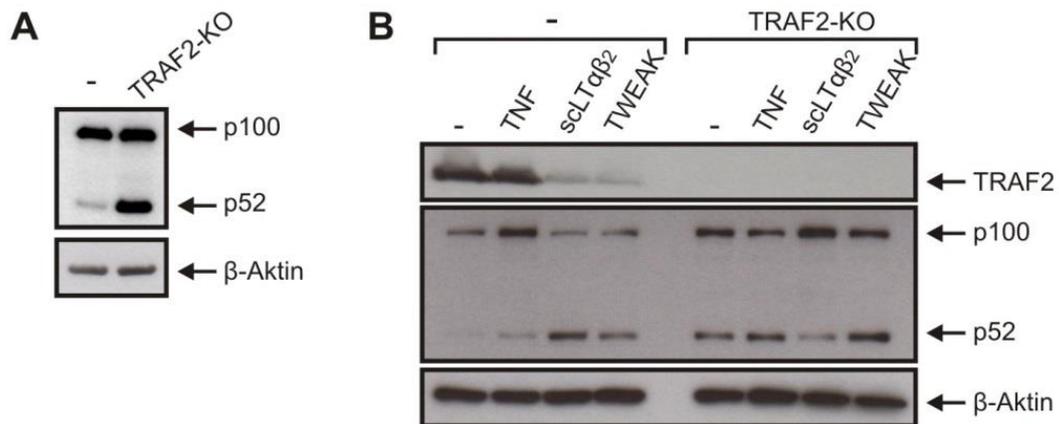


Abbildung 12: HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO-Zellen zeigen gegenüber ihrer Parentalzelllinie eine verstärkte, nicht weiter stimulierbare p100-Prozessierung.
A Die p100/p52 Proteinexpression wurde im Western Blot zwischen HCT116-PI3Kmut und HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO im unstimulierten Zustand verglichen. **B** Beide Zelllinien wurden für 16 Stunden mit TNF (200 ng/ml), sclT α β ₂ (200 ng/ml) und TWEAK (200 ng/ml) behandelt und die Proteinexpression von p100 und p52 bestimmt.

Die Untersuchung der TNF-induzierten Phosphorylierung und Degradation von I κ B α und des Zielgenes des klassischen NF κ B-Signalweges, IL8, zeigte des Weiteren eine nicht-obligatorische, aber dennoch stimulierende Funktion von TRAF2 in der proinflammatorischen Antwort durch TNF. Sowohl die IL8-Expression als auch die I κ B α -Degradation waren in TRAF2-KO-Zellen inhibiert, aber dennoch vorhanden (Abb. 13).

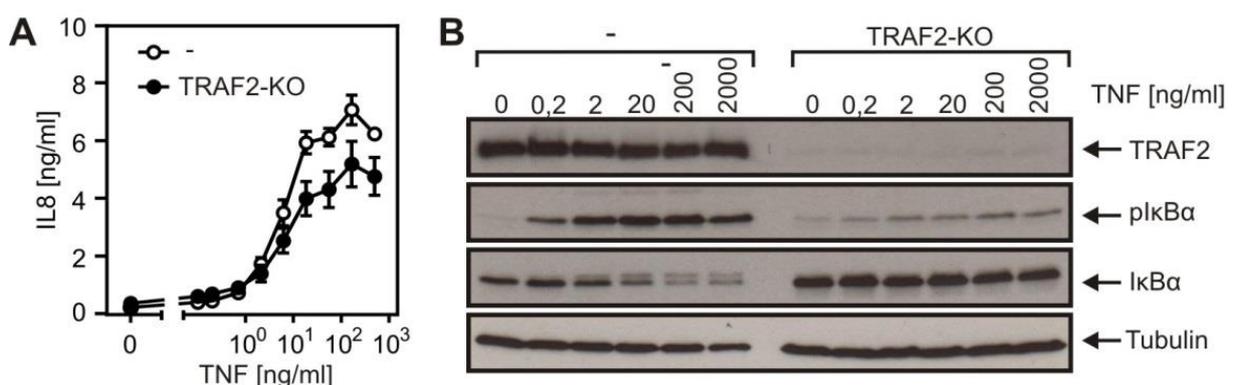


Abbildung 13: TRAF2 spielt eine stimulierende, nicht-obligate Rolle in der TNFR1-induzierten Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges.
 Die konzentrationsabhängige Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges wurde zwischen HCT116-PI3Kmut und HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO verglichen. **A** Die TNF-induzierte IL8-Produktion wurde nach 16-stündiger Stimulation mit der angegebenen Konzentration TNF mittels ELISA bestimmt. **B** Nach 10-minütiger

Stimulation mit einer TNF-Konzentrationsreihe wurde im Western Blot die Phosphorylierung und Degradation von I κ B α untersucht.

Des Weiteren wurde untersucht, ob in HCT116-PI3Kmut-Zellen die Resistenz gegenüber der Todesrezeptor-vermittelten Zelltodinduktion auch nach TRAF2-Deletion noch gegeben ist, da TRAF2 eine umfassende Funktion im Zellüberleben zugeschrieben wird (Hu et al., 1999; Karl et al., 2014; Siegmund et al., 2016). Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, führte die TRAF2-Defizienz in HCT116-PI3Kmut-Zellen zu keiner Sensitivierung gegenüber TNFR1- oder TRAILR1/2-induziertem Zelltod. Im Vergleich zur parentalen Zelllinie HCT116-PI3Kmut sind nach Stimulation mit TRAIL oder TNF weder verstärkt Zellen gestorben noch war der morphologische Charakter der Apoptose, wie er in Wyllie et al. beschrieben ist, sichtbar (Wyllie et al., 1980).

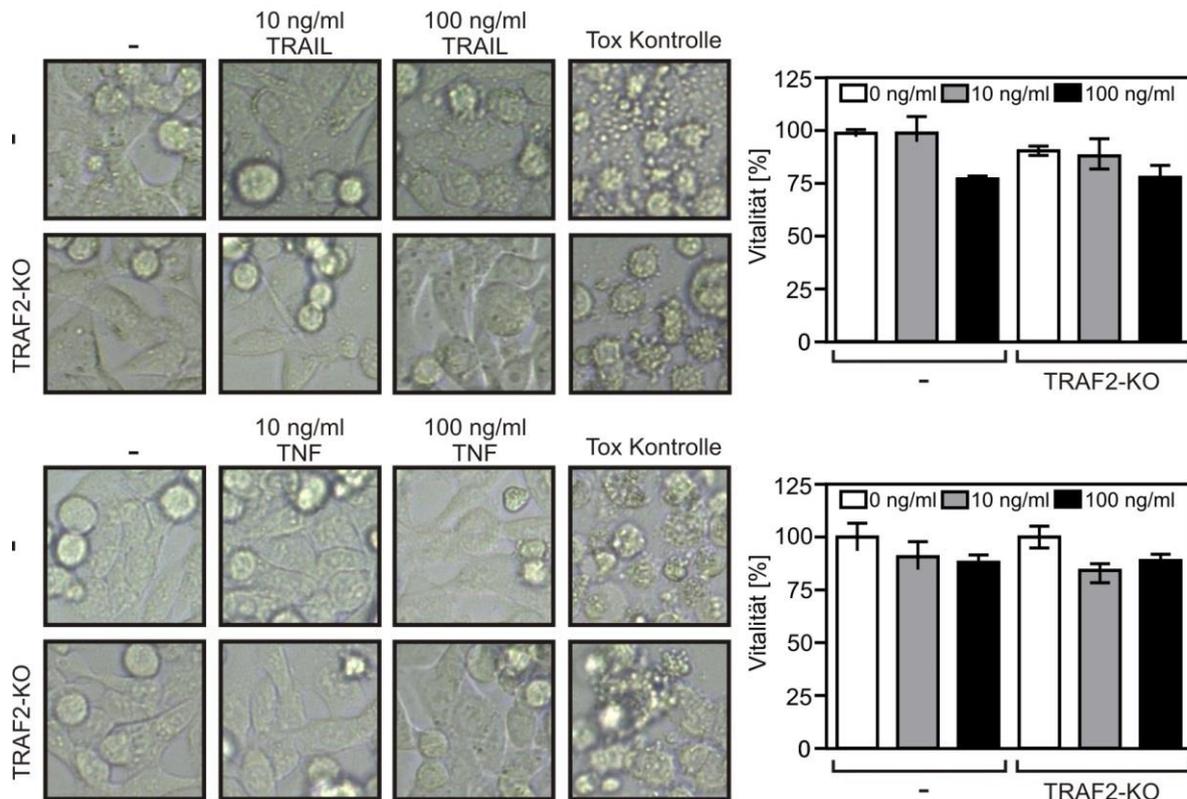


Abbildung 14: HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO Zellen sind gegenüber der TRAIL- und TNF- induzierten Zelltodinduktion resistent.

HCT116-PI3Kmut- und HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO-Zellen wurden über Nacht mit 10 ng/ml oder 100 ng/ml TRAIL oder TNF behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle und einer Tox-Kontrolle (je 200 ng/ml TWEAK, TNF, Fc-CD95L, 5 μ g/ml

CHX, 1 µg/ml Puromycin und 0,01 % Natriumazid) verglichen. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop und mittels MTT-Vitalitätstest.

Da die IL8-Produktion in HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO teilweise reduziert war, wurde zur Verifizierung der Hypothese, dass TRAF2 nicht obligat für die Todesrezeptor-vermittelte Signalgebung ist, aber dazu beiträgt, eine TRAF2-rekonstituierte Variante hergestellt. Wie in Abbildung 16 gezeigt ist, exprimiert die aus der Zelllinie HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO gewonnene stabile Zelllinie HCT116-PI3Kmut-TRAF2-re das Adapterprotein TRAF2 (Abb.15A) und dies korrelierte damit, dass die TRAIL-induzierte IL8-Produktion wieder so effizient wie in HCT116-PI3Kmut-Zellen ablief (Abb.15B). Somit konnte bestätigt werden, dass die verminderte IL8-Expression in HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO auf die TRAF2-Defizienz zurückzuführen ist.

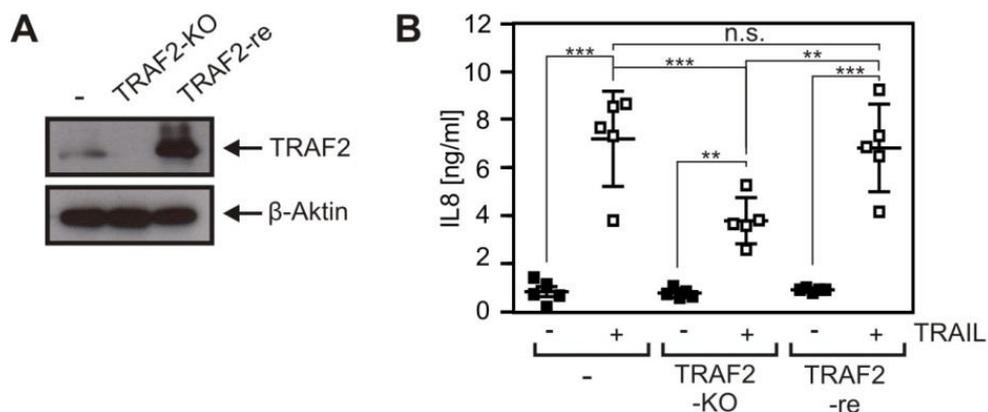


Abbildung 15: TRAF2-re stellt die Todesrezeptor-vermittelte IL8-Induktion quantitativ wieder her.

A TRAF2-Proteinexpression in HCT116-PI3Kmut (-), TRAF2-KO und TRAF2-re **B** Über Nacht Stimulation mit 200 ng/ml TRAIL und Bestimmung der IL8-Produktion im ELISA. Abgebildet sind die Ergebnisse aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$, n.s. nicht-signifikant.

TRAF2 bildet Heterotrimeren mit dem nahe verwandten Protein TRAF1. Diese TRAF1-TRAF2-Heterotrimeren stehen gegenüber TRAF2-Homotrimeren begünstigt da und bilden im Komplex mit cIAP1 einen wichtigen Mediator des klassischen NFκB-Signalweges der TNFRSF-Signalgebung (Zheng et al., 2010). Um die Funktion von TRAF1 in Todesrezeptor-vermittelten Signalwegen zu untersuchen, wurde TRAF1 sowohl in HCT116-PI3Kmut- als auch in HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO-Zellen transfiziert (HCT116-PI3Kmut-TRAF1; HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO-TRAF1). Somit wurde TRAF1 ektopisch exprimiert und bereits ohne Induktion der TRAF1 Expression

basal stark exprimiert (Abb. 16A). Hier stand zunächst die Fragestellung im Fokus, ob und inwiefern TRAF1 die TRAIL-induzierte IL8-Produktion beeinflusst und insbesondere, ob es für die TRAF2-Defizienz kompensiert (Abb. 16B). Es konnte für die Zellen mit ektopischer TRAF1-Expression keine signifikante Steigerung der TRAIL-induzierten IL8-Produktion nachgewiesen werden.

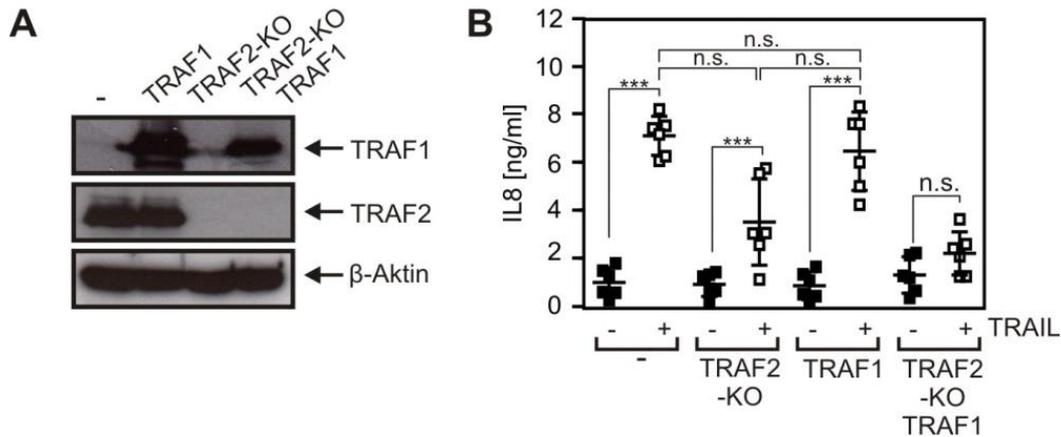


Abbildung 16: Die TRAF2-KO-abhängige Reduktion der IL8-Produktion nach Stimulation mit TRAIL kann nicht durch ektopisch exprimiertes TRAF1 kompensiert werden.

Die HCT116-PI3Kmut Zelllinien TRAF1 und TRAF2-KO-TRAF1 wurden mit HCT116-PI3Kmut (-) und TRAF2-KO verglichen. **A** Proteinexpression von TRAF1 und TRAF2 im Western Blot. **B** IL8 ELISA nach über Nacht Stimulation mit 200 ng/ml TRAIL. Abgebildet sind die Ergebnisse aus sechs voneinander unabhängigen Experimenten *** $p < 0.001$; n.s. nicht-signifikant.

Die Bedeutung von TRAF2 in der Regulation der Todesrezeptor-induzierten Apoptose, insbesondere durch die Regulation der Caspase-8, wurde bereits in der Vergangenheit von mehreren Arbeitsgruppen untersucht (Fotin-Mleczek et al., 2002; Gonzalez et al., 2012). Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss TRAF2 auf die Regulation der Caspase-8 zeigt und falls ja, ob TRAF1 für TRAF2 kompensieren kann. Dieser Ansatz war vor allem auch daher gehend spannend, da TRAF1 als Substrat für die aktive Caspase-8 dienen kann (Irmeler et al., 2000; Henkler et al., 2003).

Die Analyse der TRAIL- und TNF-induzierten Caspase-8-Prozessierung im Western Blot für die vier korrespondierenden Zelllinien zeigte sowohl einen Einfluss von TRAF2 als auch von TRAF1 auf die Spaltung der Procaspase-8 (Abb. 17). Hierbei

wurden die Zellen mit CHX behandelt, um eine robuste Spaltung der Caspase-8 nach Todesrezeptorstimulation zu erzielen und die Expression von Inhibitoren der Apoptose, wie die Induktion der FLIP-Expression zu blockieren (Kreuz et al., 2001). Hierbei war es mir möglich, die Procaspase-8 (Casp.8, p55/54) und das p41/43 Caspase-8-Intermediat zu detektieren, jedoch nicht das p18-Fragment der aktiven Caspase-8. Wie man aus Abb. 17A entnehmen kann, beschleunigen sowohl die ektopische TRAF1-Expression als auch die TRAF2-Defizienz die Prozessierung der Procaspase-8 durch TNF. Da in TRAF2-KO Zellen bereits sehr kleine Mengen TNF die Prozessierung auslösten ist unklar, ob die Überexpression von TRAF1 in HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO-TRAF1 diesen Effekt weiter verstärken kann. Die Prozessierung von TRAF1 durch die aktive Caspase-8 konnte in HCT116-PI3Kmut-TRAF1-Zellen, jedoch nicht in ihrer TRAF2-defizienten Variante beobachtet werden. Eine Rekonstitution von TRAF2 in HCT116-PI3Kmut-TRAF2-re konnte den Effekt der verstärkten Procaspase-8-Prozessierung in TRAF2-KO Zellen aufheben (Abb.17B). Die Verwendung eines weiteren TRAF1-Antikörpers, der neben intaktem TRAF1 auch das TRAF1-Spaltprodukte p27 detektieren kann, zeigte dann auch dieses Spaltprodukt in den TRAIL behandelten Zellen. Somit wurde nicht nur eine Beteiligung von TRAF2 und TRAF1 im apoptotischen Signalweg des TNFR1, sondern auch für TRAILR1/2 nachgewiesen. HCT116-PI3Kmut-TRAF1-Zellen, jedoch nicht ihre TRAF2-defiziente Variante, waren erneut in der Lage, nach Stimulation mit TRAIL das TRAF1-Spaltprodukt zu generieren (Abb.17C).

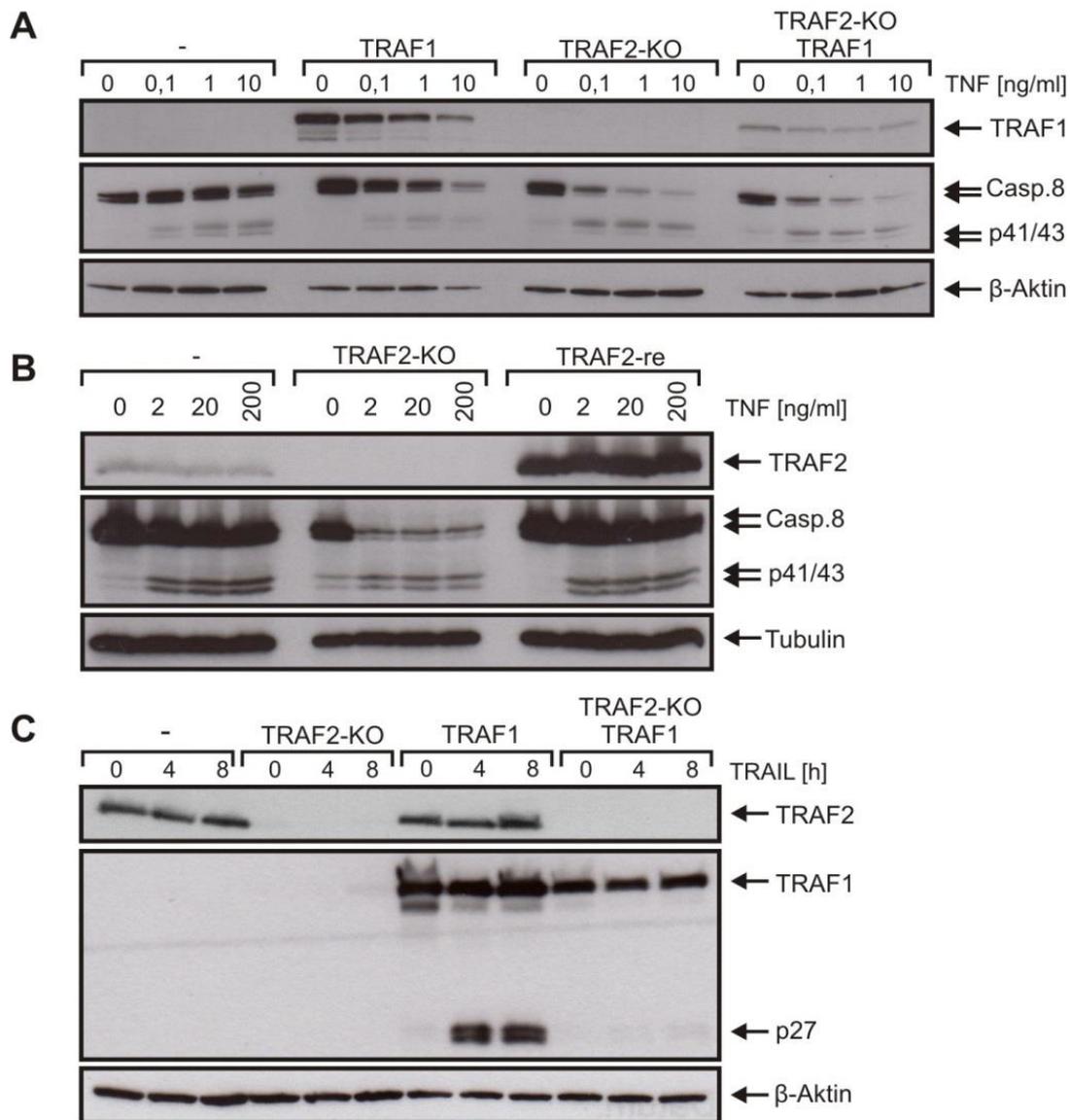


Abbildung 17: Die Prozessierung der Procaspase-8 wird sowohl nach Stimulation des TNFR1- als auch des TRAILR1/2 durch TRAF2 und TRAF1 reguliert.

A HCT116-PI3Kmut (-), TRAF1, TRAF2-KO und TRAF2-KO TRAF1 wurden mit 2,5 μ g/ml CHX und den angegebenen Konzentrationen TNF behandelt und nach sechsstündiger Stimulation die Proteinexpression bestimmt. **B** HCT116-PI3Kmut (-), TRAF2-KO und TRAF2-re wurden wie in A behandelt und mittels Western Blot analysiert. **C** HCT116-PI3Kmut (-), TRAF1, TRAF2-KO und TRAF2-KO TRAF1 Zellen wurden mit 200 ng/ml TRAIL für die angegebene Dauer stimuliert und im Western Blot evaluiert.

Ähnliche Ergebnisse wie mit TRAIL wurden auch mit dem CD95L beobachtet (Abb.18). So war die CD95L-induzierte IL8-Expression signifikant in HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO und HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO reduziert, während die Überexpression von TRAF1 keinen signifikanten Unterschied ergab. Die

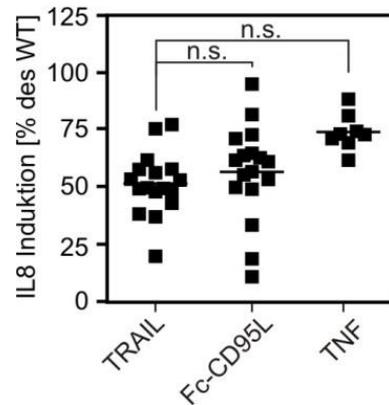


Abbildung 19: Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Todesrezeptoren TRAILR1/2, CD95 und TNFR1 in der TRAF2-abhängigen IL8-Expression.

Die Ergebnisse aller Daten zur Todesrezeptor-induzierten IL8-Expression zwischen HCT116-PI3Kmut und deren TRAF2-KO Variante wurden miteinander verglichen, um die Effizienz der Reduktion der IL8-Induktion Expression nach TRAF2-Deletion zu ermitteln. Die Zellen wurden jeweils über Nacht mit je 200 ng/ml TRAIL, Fc-CD95L oder TNF stimuliert. *n.s.* nicht-signifikant.

Um die Relevanz der TRAF2-abhängigen, Todesrezeptor-induzierten IL8-Produktion in einem unabhängigen Zellsystem zu verifizieren, wurde die TRAF2-Expression in einem weiteren Apoptose-resistenten Zellsystem, den HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen ausgeschaltet (Abb. 20A). Auch hier konnte wie erwartet eine konstitutive Aktivierung des alternativen NFκB-Signalweges in HT1080-Bcl2-TNFR2-TRAF2-KO nachgewiesen werden (Abb. 20B). Zudem führte in dieser Zelllinie die TRAF2-Defizienz zu einer signifikanten Reduktion der IL8-Expression nach Stimulation mit den Todesrezeptor-Liganden TNF, Fc-CD95L und TRAIL (Abb. 20C).

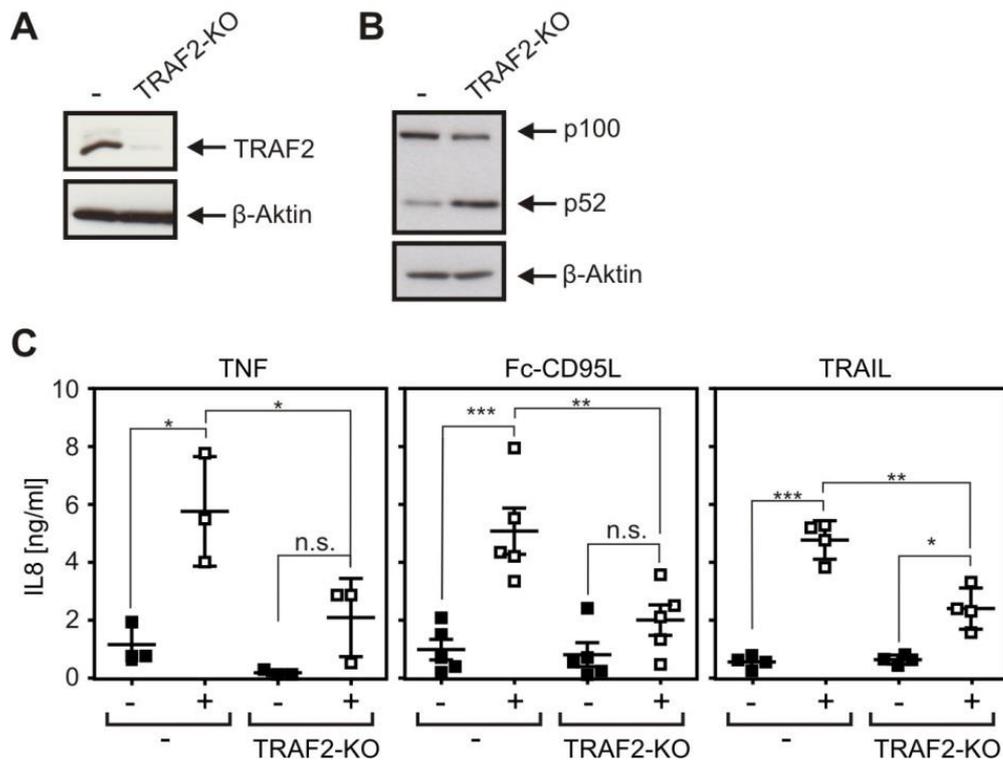


Abbildung 20: Die TRAF2-abhängige IL8-Expression in der Todesrezeptor-vermittelten Signaltransduktion ist in HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen verifizierbar.

Unstimulierte HT1080-Bcl2-TNFR2- (-) und HT1080-Bcl2-TNFR2 TRAF2-KO (TRAF2-KO)-Zellen wurden im Western Blot auf **A** TRAF2-Expression und **B** p100 Prozessierung untersucht. **C** IL8 ELISA nach über Nacht Stimulation mit 2 ng/ml TNF, oder je 200 ng/ml Fc-CD95L oder TRAIL. Dargestellt sind drei bis fünf voneinander unabhängige Experimente. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s., nicht-signifikant.

Zusammenfassend wurden in diesem Kapitel folgende Beobachtungen gemacht:

1. Während der alternative NF κ B-Signalweg in Zellen mit TRAF2-Defizienz konstitutiv aktiviert ist und auch nicht weiter induziert werden kann, führt die TRAF2-Defizienz zu einer Abschwächung der Todesrezeptor-vermittelten Induktion des klassischen NF κ B-Signalweges und somit auch der proinflammatorischen Signalgebung.
2. Die Prozessierung der Caspase-8 läuft in TRAF2-defizienten Zellen schneller ab.
3. TRAF1 ersetzt TRAF2 weder im klassischen NF κ B-Signalweg noch in der Caspase-8-Prozessierung.
4. Die gezeigten Effekte der TRAF2-Deletion sind nicht auf HCT116-PI3Kmut-Zellen beschränkt, sondern konnten auch in HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen nachgewiesen werden.

6.3. TRAF2-Defizienz führt zu erhöhter Todesrezeptor-induzierter Caspase-8 Spaltung

Nach aktuellem Stand der Forschung wirkt TRAF2 anti-apoptotisch in der Signaltransduktion der Rezeptoren der TNFRSF (Fotin-Mleczek et al., 2002; Vince et al., 2008). Gonzalez et al. konnten zudem kürzlich zeigen, dass TRAF2 die Cullin-3-gesteuerte Polyubiquitinierung der katalytischen Untereinheit der Caspase-8 reguliert. Hierbei agiert TRAF2 mit seiner RING Domäne als „K48-Ubiquitin *shutoff timer*“ der die Degradation der aktiven Caspase-8 initiiert (Gonzalez et al., 2012).

Die Beobachtung einer verstärkten Prozessierung der Procaspase-8 nach Deletion von TRAF2 schien die Beobachtungen aus der Literatur zu bestätigen. Die inhibierte Spaltung der Caspase-Substrate CYLD und TRAF1 nach TRAF2-Deletion widersprachen jedoch einer durch TRAF2 begrenzten Caspase-8-Aktivität. Somit war in unseren Beobachtungen die verstärkte Procaspase-8-Prozessierung in TRAF2-defizienten Zellen nicht im Einklang mit der Reduktion der Aktivität der Caspase-8. Aus diesem Grund war zunächst zu prüfen, welche Auswirkungen die TRAF2-Deletion auf die Todesrezeptor-induzierte Signalgebung hat.

In den nachfolgenden Experimenten wurde der Einfluss von FLIP auf die Caspase-8 Prozessierung in TRAF2-defizienten Zellen untersucht. Die Vermutung, dass bei TRAF2-Defizienz FLIP für die veränderte Caspase-8-Regulation verantwortlich sein könnte, basiert auf mehreren Grundlagen:

- 1) FLIP ist ein Interaktionspartner von TRAF1 und TRAF2 und einer der bekanntesten Procaspase-8-Regulatoren (Shu et al., 1997; Kataoka et al., 2000)
- 2) Die FLIP_L Isoform fördert die Prozessierung der Procaspase-8 zu seinem p12- + p41/43-Intermediat (Micheau et al., 2001; Chang et al., 2002)
- 3) Embryonale murine Fibroblasten aus TRAF2-KO Mäusen zeigten eine geringere FLIP-Expression aufgrund erhöhter FLIP-Degradation (Guiet et al., 2002)
- 4) Die FLIP-Expression wird durch den klassischen NFκB-Signalweg kontrolliert (Kreuz et al., 2001; Micheau et al., 2001).

Zunächst wurde die FLIP-Proteinexpression in den Zelllinien HCT116-PI3Kmut und HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO unter ähnlichen Voraussetzungen wie zuvor bei der

Caspase-8-Prozessierung verglichen. Während FLIP_L im Western Blot detektiert werden konnte, war FLIP_S nicht oder nur sehr schwach exprimiert (Abb. 21). Weder die Stimulation mit TNF (Abb. 21A) noch mit TRAIL (Abb. 21B) führte nach CHX-Vorbehandlung zu einer Induktion der Expression von FLIP_L oder FLIP_S. Zudem wurde das Caspase-8 Substrat CYLD detektiert (Abb. 21A). Die CYLD-Prozessierung fand, wie zuvor für TRAF1, in TRAF2-exprimierenden HCT116-PI3Kmut-Zellen schneller statt als in TRAF2-defizienten Zellen.

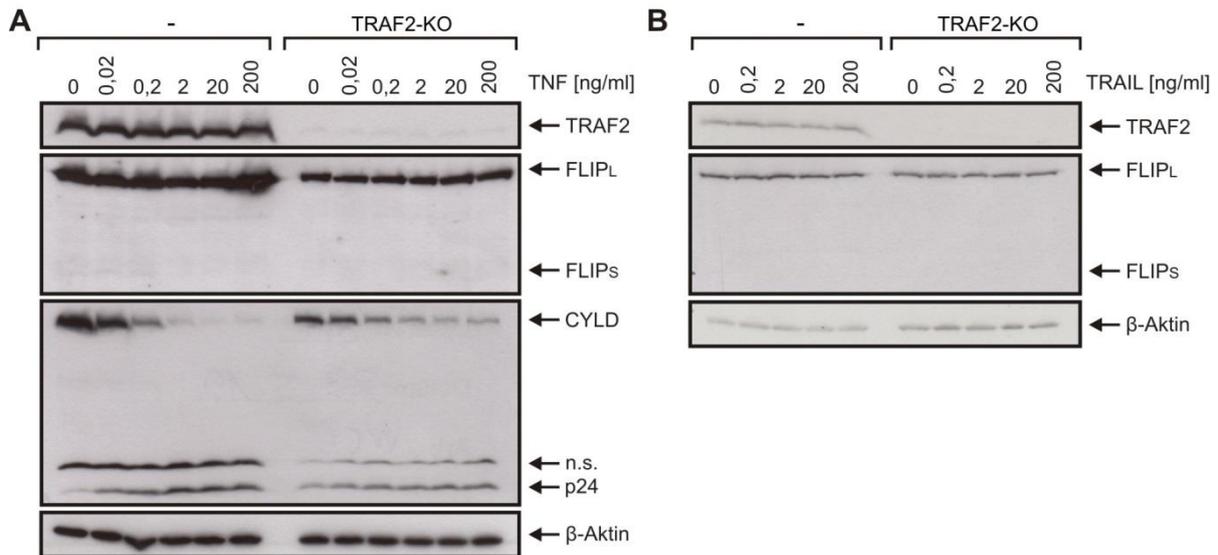


Abbildung 21: TRAF2 hat keinen Einfluss auf die Expression von FLIP_L und FLIP_S.

Die Zelllinien HCT116-PI3Kmut (-) und TRAF2-KO wurden mit 2,5 µg/ml CHX behandelt und **A** TNF oder **B** TRAIL in einer Konzentrationsreihe zugegeben. Nach sechsständiger Stimulation wurde die Proteinexpression im Western Blot untersucht.

Da nicht nur die Proteinexpression, sondern auch die Rekrutierung des Proteins im Signalkomplex über dessen Funktion entscheidend ist, wurde die Rekrutierung von FLIP an den TRAIL-DR-Komplex untersucht (Abb. 22). Hier konnten sowohl FLIP_L und sein Spaltprodukt p43 als auch FLIP_S detektiert werden. Diese Rekrutierung unterschied sich nicht wesentlich zwischen TRAF2-exprimierenden- und TRAF2-defizienten HCT116-PI3Kmut-Zellen.

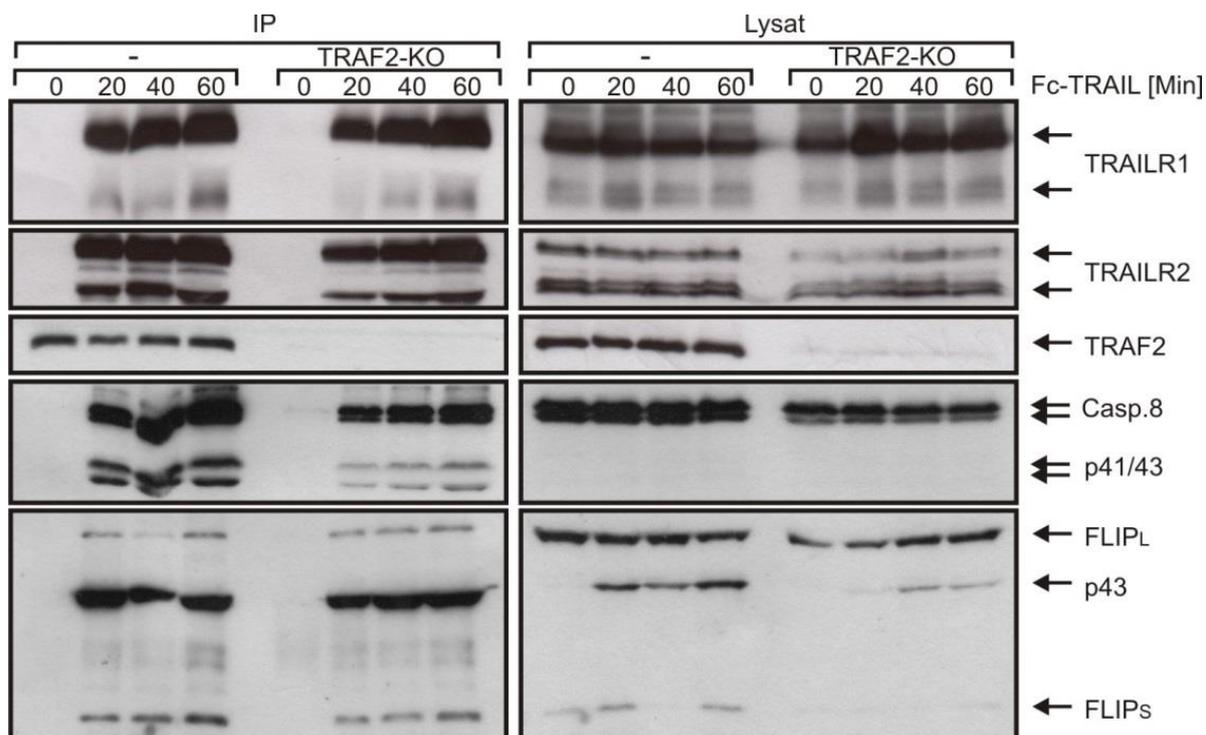


Abbildung 22: Die TRAIL- induzierte Rekrutierung von FLIP an TRAILR1/2 ist TRAF2-unabhängig.

Western Blot der Immunpräzipitation und des zugehörigen Lysates von Signalwegproteinen des TRAILR1/2 nach Stimulation mit 1 µg/ml Fc-TRAIL für die angegebenen Zeitwerte.

Frühere Studien konnten für FLIP folgende Eigenschaften nachweisen (Kreuz et al., 2004; Siegmund et al., 2005; Kavuri et al., 2011):

1. Die FLIP Expression hat in CD95-artigen Todesrezeptoren einen Einfluss auf die Induktion der proinflammatorischen Signalgebung.
2. Während Heterodimere aus der Procaspase-8 mit FLIP_L eingeschränkt aktiv sind, wird die Prozessierung der Procaspase-8 bei FLIP_S-Überexpression verhindert. Somit kann bei FLIP_L-Caspase-8 p43/41 noch IL8 induziert werden, kaum jedoch bei FLIP_S-Procaspase-8 Komplexen.
3. Die TNFR1-induzierte proinflammatorische Signaltransduktion ist FLIP-unabhängig: Eine Überexpression von FLIP_L oder FLIP_S zeigte keine signifikante Veränderung der TNF-induzierten IL8 Expression.

In dieser Studie wurden ähnliche Ergebnisse erhalten, wie in Abb. 23 am Beispiel der IL8-Induktion gezeigt ist.

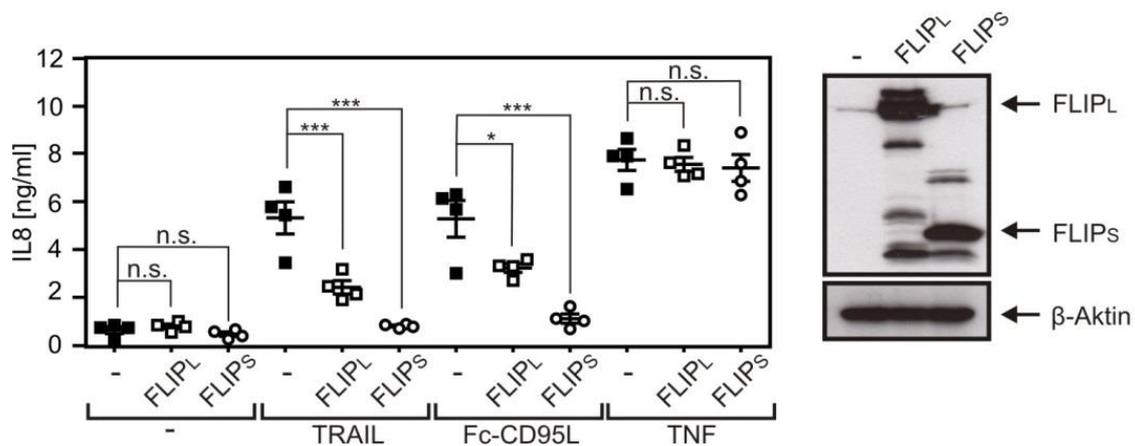


Abbildung 23: FLIP_L und FLIP_S inhibieren die TRAIL- und CD95L-, jedoch nicht die TNF-induzierte IL8-Expression.

HCT116-PI3Kmut-pEGZ-Zellen (-) wurden mit FLIP_L (FLIPL)- und FLIP_S (FLIPs)-überexprimierenden Zellen anhand ihrer IL8-Expression im ELISA verglichen. Hierbei wurden die Zellen über Nacht mit je 200 ng/ml TRAIL, Fc-CD95L oder TNF stimuliert. Die FLIP-Expression der drei Zelllinien wurde im Western Blot nachgewiesen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus vier voneinander unabhängigen Experimenten *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$; n.s., nicht-signifikant.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass FLIP-Proteine in den gezeigten Experimenten lediglich einen Effekt auf die TRAIL- und CD95L-induzierte IL8 Produktion zeigten.

Des Weiteren wurden die Prozessierung und Aktivierung der Caspase-8 nach TRAF2-Deletion verglichen. Im Einklang mit der anti-apoptotischen Funktion von TRAF2 war die Prozessierung der Procaspase-8 in TNF-stimulierten HCT116-PI3Kmut TRAF2-KO-Zellen gegenüber ihrer parentalen Zelllinie verstärkt (Abb. 24A). Die gesteigerte Prozessierung der Procaspase-8 in HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO-Zellen lässt vermuten, dass diese mit einer verstärkten Aktivität der aktiven Caspase-8 einhergeht. Diese war im Western Blot schwer zu detektieren. Obwohl bei TRAF2-Defizienz geringe Konzentrationen von TNF zur vollständigen Prozessierung der Procaspase-8 führten, blieb die Caspase-9 Spaltung unbeeinflusst.

Diese Beobachtung war weniger überraschend, da die Caspase-9, wie in Abschnitt 6.1 bereits erläutert wurde, Bax-gesteuert und wiederum in HCT116-PI3Kmut dysreguliert ist. Somit wird die Apoptoseinduktion an dieser Stelle unterbrochen (Janssen et al., 2007; Ehrenschwender et al., 2010).

Die „Carboxyfluorescein (FAM)-FLICA Methode wurde für das nachfolgende Experiment verwendet, um die Aktivität der Caspase-8 zwischen den beiden Zelllinien HCT116-PI3Kmut und HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO zu vergleichen. Bei dieser Methode bindet FLICA als Ligand an das aktive enzymatische Zentrum der Caspase (Bedner et al., 2000; Amstad et al., 2001; Smolewski et al., 2001). Hierbei zeigte sich, dass die verstärkte Procaspase-8-Prozessierung in TRAF2-KO Zellen nicht mit einer erhöhten Caspase-8-Aktivität einherging. Nach Stimulation mit TRAIL oder TNF konnte in TRAF2-defizienten Zellen keine signifikante Caspase-8-Aktivität induziert werden. Bei Vorhandensein von TRAF2 wurde diese jedoch signifikant induziert (Abb. 24B,C). Dieser Effekt bestätigt ebenfalls die Beobachtungen von Abbildung 17A und C die zeigten, dass TRAF1 bei TRAF2-Präsenz durch die aktive Caspase-8 gespalten wurde, jedoch nicht bei TRAF2-KO-Zellen. In Abb. 21A konnte dieser Effekt ebenfalls am Caspase-8 Substrat CYLD beobachtet werden. In Übereinstimmung mit der Apoptose-Resistenz beider Zelllinien konnte keine Induktion der Apoptose durch einen Anstieg der PI Färbung gezeigt werden (Abb. 24). PI ist Membran-impermeabel und bindet und färbt die DNA von Zellen, deren Membran bereits zerstört ist und ist für die Analyse apoptotischer Zellen etabliert (Riccardi und Nicoletti, 2006).

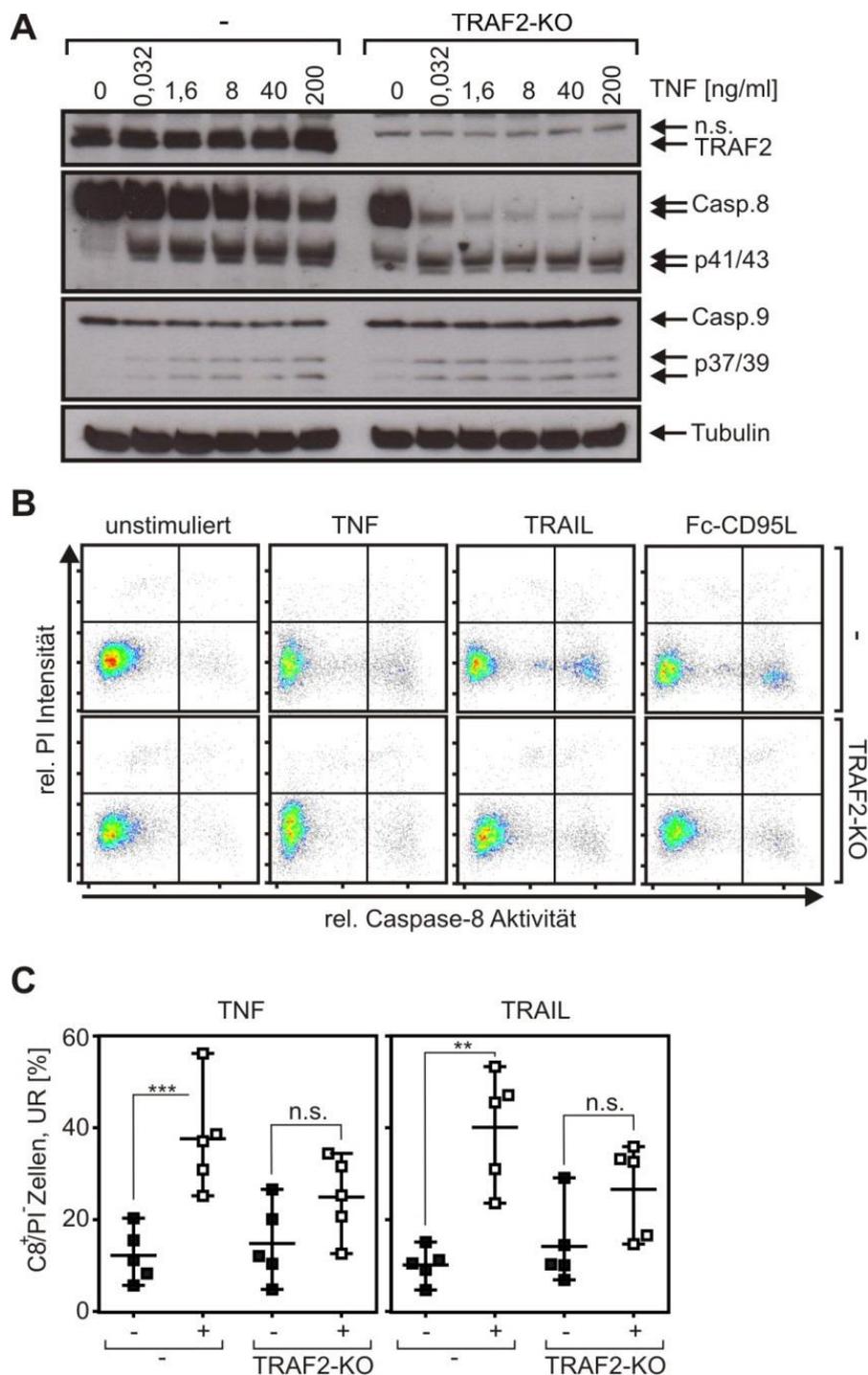


Abbildung 24: Während die Prozessierung der Procaspase-8 in TRAF2-defizienten Zellen verstärkt ist, kommt es zu keiner Steigerung der Caspase-8-Aktivität.

A HCT116-PI3Kmut (-) und TRAF2-KO wurden mit konstant 2,5 µg/ml CHX und den angegebenen TNF Konzentrationen für sechs Stunden stimuliert und die Proteinexpression im Western Blot bestimmt. **B** FAM-FLICA Färbung nach Stimulation mit je 200 ng/ml TNF, TRAIL oder Fc-CD95L und 2,5 µg/ml CHX für sechs Stunden im Punktdiagramm. Die X-Achse beschreibt die FAM-FLICA Fluoreszenz (relative Caspase-8 Aktivität), während die Y-Achse den roten Kanal für die relative PI Intensität aufzeigt. **C** Auswertung der Daten aus „B“: sowohl für die

Stimulation mit TNF als auch mit TRAIL wurden fünf voneinander unabhängige Experimente gezeigt. $***p < 0.001$; $**p < 0.01$; *n.s. nicht-signifikant*.

Resümierend konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

1. Die Expression und Rekrutierung der Caspase-8-Regulatoren FLIP_L und FLIP_S ist TRAF2-unabhängig.
2. FLIP_L und FLIP_S inhibieren die TRAIL- und CD95L-, jedoch nicht die TNF-induzierte IL8-Expression.
3. Zur Bildung der aktiven Caspase-8 ist die Expression von TRAF2 notwendig.

6.4. Das SMAC Mimetik BV6 beschleunigt die Prozessierung der Procaspase-8 und zeigt einen geringfügigen Effekt auf die Todesrezeptor-induzierte proinflammatorische Signalgebung

Eine wichtige Aufgabe von TRAF2 als Adapterprotein in den Signalwegen von TNFRs ist die Rekrutierung von cIAP1 und cIAP2. Die Untersuchung, ob und inwiefern die bisherigen Beobachtungen der Funktion von TRAF2 auf eine reduzierte Bereitstellung von cIAP1 und cIAP2 zurückzuführen ist, lag daher nahe. Als Werkzeug zur Depletion des cIAP1 und cIAP2 Pools diente das SMAC Mimetik BV6, da es deren Degradation durch das Proteasom induziert (Varfolomeev et al., 2007). Es wurde daher geprüft, ob BV6 einen ähnlichen Effekt wie die TRAF2-Defizienz auf die DR-Signaltransduktion hat.

Zunächst wurde für den TNFR1 untersucht, welche Signalwegproteine im Rahmen der TRAF2-Deletion mit dem TNFR1-spezifischen Liganden Fc-Flag-TNF(32W/86T) (kurz: Fc-TNF60) immunpräzipitiert werden. Durch die Depletion des Adapterproteins TRAF2 konnten nach Stimulation des TNFR1 weniger Signalwegproteine an den DL-DR-Komplex rekrutiert werden. Die Rekrutierung von RIP wurde nicht beeinflusst, da dieses TRAF2-unabhängig an den Rezeptorkomplex rekrutiert werden kann (Abb. 25).

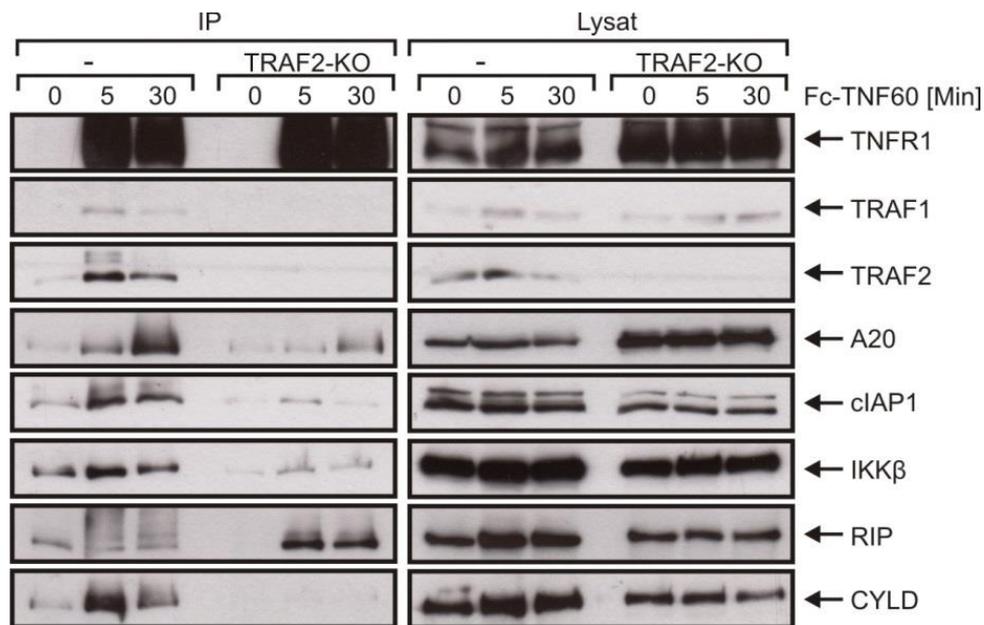


Abbildung 25: Die Rekrutierung von TRAF1, A20, cIAP1, IKK β und CYLD zum TNFR1 ist TRAF2-abhängig.

Western Blot der an Fc-TNF60 präzipitierten Proteine und des zugehörigen Lysates nach Stimulation von HCT116-PI3Kmut-Zellen und HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO-Zellen mit 1 μ g/ml Fc-TNF60 für die angegebene Stimulationsdauer.

Die cIAP1-Expression war zwischen den Zelllinien HCT116-PI3Kmut und HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO vergleichbar, während die Expression von cIAP2 schwer zu detektieren war. Behandelte man beide Zelllinien mit BV6, wurde cIAP1 gleichermaßen stark degradiert. In Übereinstimmung mit der Literatur, die die negative Regulation der NIK-Akkumulation durch TRAF2, cIAP1 und cIAP2 beschreibt (Scheidereit, 2006; Hayden und Ghosh, 2008; Wajant und Scheurich, 2011), wurde der alternative Signalweg durch Stimulation mit BV6 aktiviert (Abb. 26). Eine Induktion, die in HCT116-PI3Kmut-Zellen nachweisbar war, jedoch nicht in HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO-Zellen (Abb. 26). Ohne TRAF2 war der alternative NF κ B-Signalweg konstitutiv aktiviert und die BV6-Behandlung konnte diesen Effekt nicht weiter verstärken. Die Rekonstitution von TRAF2 in HCT116-PI3Kmut-TRAF2-re-Zellen war in der Lage, diesen Effekt aufzuheben, sodass diese sich diese Zellen wieder wie HCT116-PI3Kmut-Zellen verhalten haben.

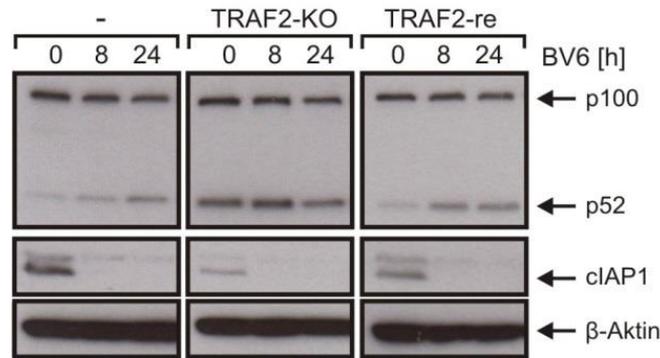


Abbildung 26: Das SMAC-Mimetik BV6 induziert die Degradation von cIAP1 in HCT116-PI3Kmut-Zellen.

Die Zelllinien HCT116-PI3Kmut (-), TRAF2-KO und TRAF2-re wurden mit 10 μ M BV6 für 8 bzw. 24 h inkubiert und sowohl die p100/p52-Prozessierung als auch die cIAP1-Degradation im Western Blot analysiert.

Obwohl die basale Phosphorylierung von I κ B α in BV6-vorbehandelten Zellen erhöht war und cIAP1 nahezu kaum noch nachgewiesen werden konnte, war kein Unterschied in der konzentrationsabhängigen, TNF-induzierten I κ B α -Degradation sichtbar (Abb. 27).

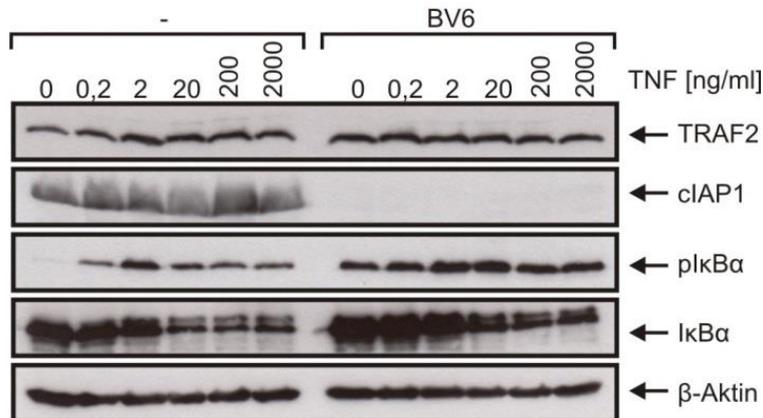


Abbildung 27: Die Aktivierung des TNFR1-stimulierten klassischen NF κ B-Signalweges ist cIAP-unabhängig.

HCT116-PI3Kmut-Zellen wurden unbehandelt (-) oder für zwei Stunden mit 10 μ M BV6 vorbehandelt (BV6) und anschließend pI κ B α und I κ B α im Western Blot nach 10-minütiger Stimulation mit TNF in einer Konzentrationsreihe untersucht.

In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte durch die BV6-Vorinkubation nahezu kein Effekt auf die CD95L- und TRAIL- induzierte Expression des Zytokins IL8 sowohl in HCT116-PI3Kmut- als auch in HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO-Zellen verzeichnet werden. Lediglich die IL8-Induktion nach Stimulation des TNFR1 schien

in BV6 vorbehandelten HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO Zellen leicht reduziert zu sein (Abb. 28).

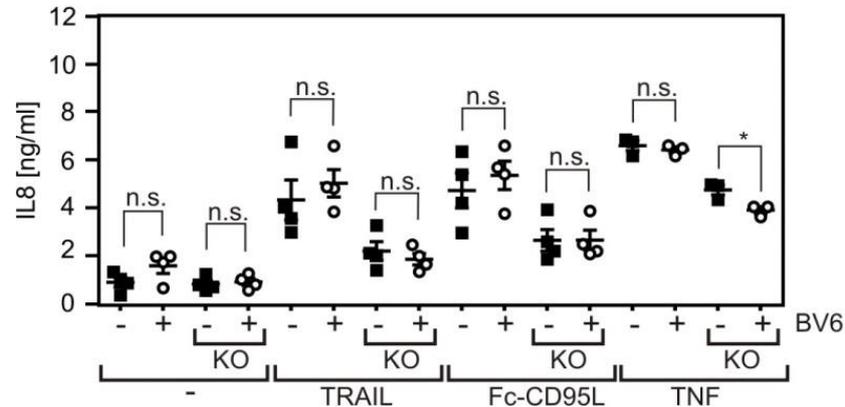


Abbildung 28: cIAP hat einen untergeordneten Einfluss auf die Todesrezeptor-induzierte IL8-Expression.

IL8-ELISA von HCT116-PI3Kmut-Zellen (-) und HCT116-PI3Kmut TRAF2-KO-Zellen (KO). Behandlung mit 10 µM BV6 zwei Stunden vor der Stimulation über Nacht mit je 200 ng/ml TRAIL, Fc-CD95L oder TNF. Gezeigt sind vier voneinander unabhängige Experimente für TRAIL und Fc-CD95L und drei für TNF * $p < 0.05$; ,n.s., nicht-signifikant.

Mit den Ergebnissen aus Abbildung 27 und 28 konnte der Einfluss von TRAF2 auf den klassischen NFκB-Signalweg verifiziert werden und eine cIAP-Abhängigkeit ausgeschlossen werden.

Sowohl der NFκB-Signalweg als auch die Induktion der Apoptose werden durch cIAPs reguliert (Xie, 2013; Shi und Sun, 2018). Fällt mit der TRAF2-Defizienz ein wichtiger Adapter für cIAPs an den TNFR1 weg, können diese eventuell die Apoptose und die Signalgebung die zu dieser führen nicht weiter regulieren. Es wurde daher die TNF-stimulierte Caspase-8-Prozessierung nach BV6 Vorinkubation untersucht. Hierbei ergab sich in HCT116-PI3Kmut-Zellen bei cIAP1 Reduktion eine verstärkte Prozessierung der Procaspase-8, welche vergleichbar war mit der in TRAF2-KO-Zellen. Dieser Effekt konnte durch das Auftreten beider verstärkender Konditionen, also eine cIAP1-Reduktion in HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO-Zellen, nicht weiter gesteigert werden (Abb.29).

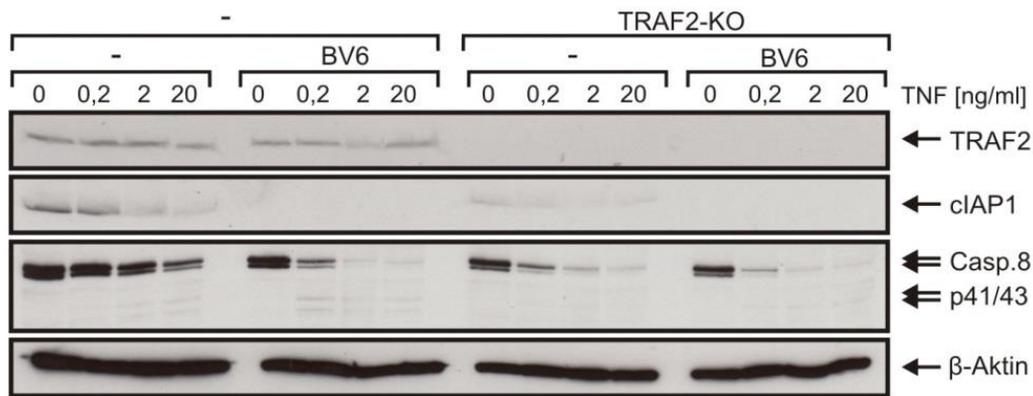


Abbildung 29: Das SMAC Mimetik BV6 verstärkt die TNF-induzierte Procaspase-8-Prozessierung.

Western Blot der Proteinexpression von HCT116-PI3Kmut (-) oder TRAF2-KO nach sechsständiger Stimulation mit den angegebenen TNF-Konzentrationen und konstanter Menge CHX (2,5 µg/ml). Zur cIAP-Reduktion wurde jeweils eine Gruppe zwei Stunden vor Stimulation mit 10 µM BV6 behandelt.

Abschließend konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass TRAF2 ein wichtiges Adapterprotein für die Rekrutierung von TRAF1, A20, cIAP1, IKKβ und CYLD ist. In den Zelllinien HCT116-PI3Kmut und HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO wurde cIAP1 in gleichen Mengen exprimiert, welches durch das SMAC-Mimetik BV6 degradiert werden konnte. Hierbei wurde der alternative NFκB-Signalweg induziert. Der klassische NFκB-Signalweg blieb jedoch nahezu unbeeinflusst. Eine Prozessierung der Procaspase-8 fand durch die cIAP1-Reduktion auf dem Niveau der TRAF2-defizienten Zelllinien statt und konnte nicht weiter gesteigert werden.

7. Diskussion

Unser Verständnis über die Mitglieder der TNFRSF und deren Signaltransduktion ist in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen. So wurden z.B. die Kernkomponenten der Signalgebung bereits gut charakterisiert (Silke und Brink, 2010; Huang et al., 2015). Die Mechanismen, die hierbei zu Grunde liegen, sind jedoch miteinander in einem Netzwerk aus zusätzlichen Signalwegmolekülen und Effektoren verwoben und lenken das Resultat der zellulären Antwort. In dem Zentrum dieses Netzwerks liegt TRAF2 als Mediator für die Induktion diverser zellulärer Mechanismen. Diese sind zum Beispiel die Zelltod-Induktion, die Zellproliferation oder die Produktion von Zytokinen zur Kommunikation zwischen Zellen (Borghi et al., 2016).

Das Adapterprotein TRAF2 hat somit eine besondere, möglicherweise auch medizinische Relevanz. Das Verständnis über die Regulation der Inflammation, des Zelltodes und der Zellproliferation durch TRAF2 könnte aufschlussreich für neue Behandlungsmethoden sein. So gibt es die Idee, dass eine TRAF2-Depletion in Karzinomen den Zelltod induzieren könnte. Ebenso wird das Tumorwachstum assoziiert mit einer verstärkten Induktion des NFκB-Signalweges nach TRAF2-Überexpression. TRAF2 ist beispielsweise im Prostatakarzinom signifikant überexprimiert und assoziiert mit der Tumorprogression (Trauzold et al., 2006; Hoogwater et al., 2010; Hartwig et al., 2017). In-Vitro konnte gezeigt werden, dass TRAF2 auf die TRAIL-induzierte Apoptose in Zelllinien des Prostatakarzinoms inhibierend wirkt, indem es die Caspase-8-Prozessierung unterdrückt (Wei et al., 2017). Im Magenkarzinom inhibiert der DR5-Cbl-b/c-Cbl-TRAF2 Komplex die TRAIL-induzierte Apoptose durch die TRAF2-vermittelte Polyubiquitinierung der Caspase-8 (Xu et al., 2017).

Das Verständnis über die TRAF2-abhängige Signaltransduktion in Erkrankungen, die durch Zellsterben geprägt sind, könnte ebenso hilfreich sein. TRAF2 kann den Zelltod von Myokardial-Zellen inhibieren, indem es die Apoptose und die Nekroptose in einer NFκB-unabhängigen Signaltransduktion inhibiert (Guo et al., 2017). Zudem ist TRAF2 ein NFκB-aktivierendes Onkogen in Epithelzellen (Shen et al., 2015). Die in dieser Arbeit verwendeten Varianten der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 sind ebenfalls Epithelzellen und daher ist diese Beobachtung für diese Arbeit besonders spannend (O'Gorman et al., 2010). In der Abteilung für Molekulare Innere Medizin, in der diese Arbeit angefertigt wurde, konnte in den letzten Jahren ein neuartiger

Antikörper gegen Fn14, einem TRAF-interagierenden Rezeptor, entwickelt werden und trägt den Namen 18D1. Studien konnten zeigen, dass dieser Antikörper in vivo sowohl anti-metastatisch wirkt als auch Graft-Versus-Host-Disease (GVHD) reduzieren kann (Trebing et al., 2014; Chopra et al., 2015). Fn14 ist ein prominentes Beispiel für einen TNFRSF-Rezeptor, der die TRAF2-Degradation induziert. Diese Degradation wird in der weiteren Diskussion näher beschrieben und wurde in dieser Arbeit durch CRISPR/Cas9-vermittelten TRAF2-KO mimikriert.

Vor rund 25 Jahren wurden TRAF2 und die TRAF2-interagierenden E3-Ligasen cIAP1 und cIAP2 als Komponenten des TNFR2-Signalkomplexes identifiziert (Rothe et al., 1994; Rothe et al., 1995). Bereits innerhalb weniger Jahre wurde offensichtlich, dass sowohl TRAF2 als auch die cIAPs direkt oder indirekt an fast alle Transmembran-Rezeptoren der TNFRSF rekrutiert werden. Insbesondere wurde für TRAF2 eine Rolle in der Aktivierung des klassischen NFκB-Signalwegs entdeckt. Zudem nimmt TRAF2 eine wichtige Rolle in der Aktivierung von MAP-Kinase-Kaskaden ein. Im Komplex mit cIAPs und TRAF3 veranlasst TRAF2 die konstitutive, proteasomale Degradation der MAP3K NIK, welche eine Schlüsselfunktion in der Aktivierung des alternativen NFκB-Signalweges einnimmt (Xie, 2013; Shi und Sun, 2018). Somit wird durch Vorhandensein von TRAF2 im Zytosol die Aktivität des alternativen NFκB-Signalweges unterdrückt. Die Rekrutierung von TRAF2 an Rezeptoren der TNFRSF kann den zytoplasmatischen „Pool“ von TRAF2-Molekülen verringern und so den alternativen NFκB-Signalweg stimulieren (Abb.30). In dieser Arbeit wurde dieser Zustand der TRAF2-Depletion mithilfe der CRISPR/Cas9-Methode erreicht und die Induktion des klassischen NF-κB-Signalweges und der Apoptose untersucht. Todesrezeptoren vermitteln in HCT116- und HT1080-Zellen keine Nekroptose. Somit konnte in dieser Arbeit keine anti-nekroptotische Aktivität von TRAF2 in den verwendeten TRAF2-defizienten Zellen untersucht werden.

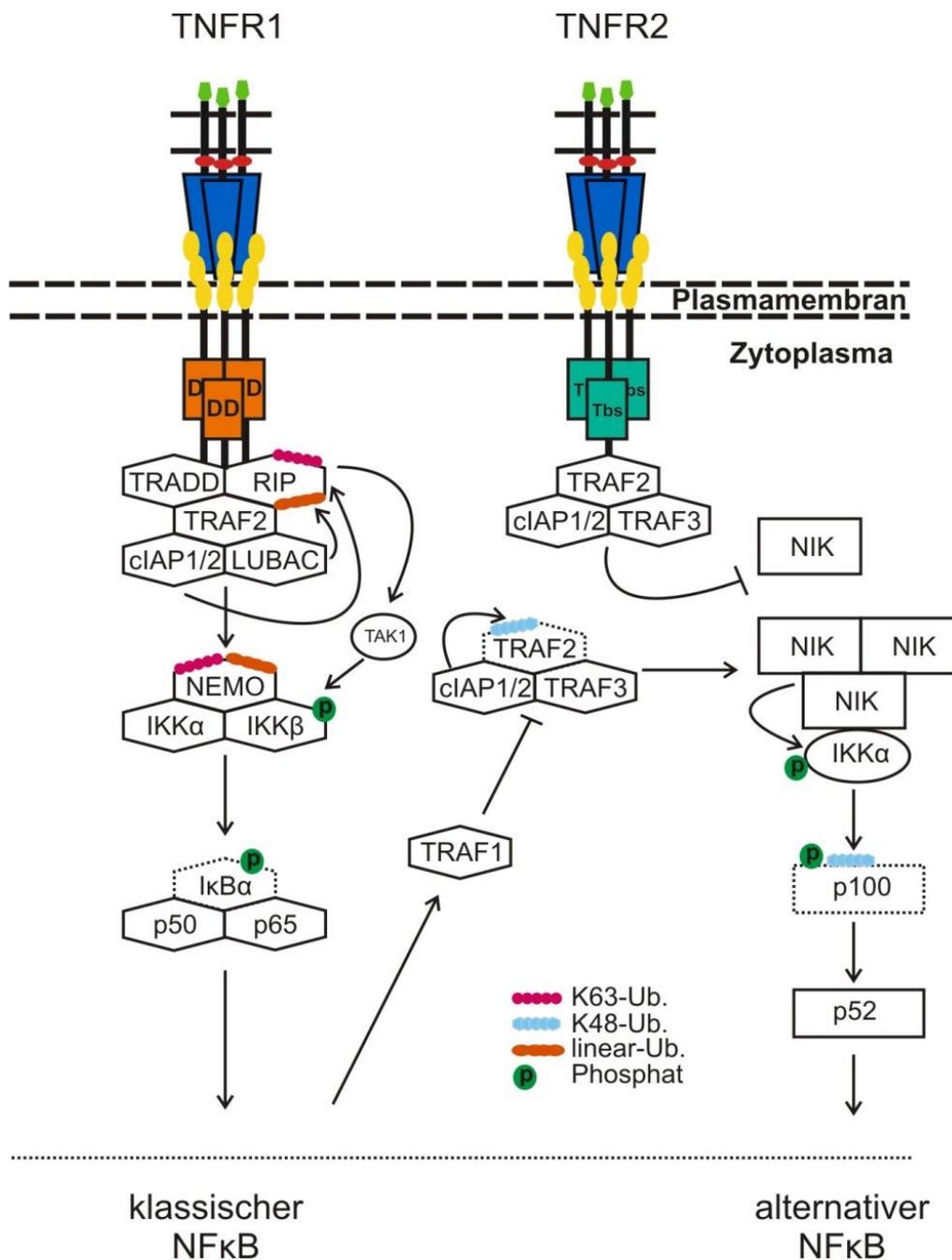


Abbildung 30: Die Rolle von TRAF2 in der Aktivierung der NFκB-Signalwege und das Wechselspiel zwischen TNFRSF-Rezeptoren.

Zur Regulation der Signaltransduktion können cIAPs im TNFR2-Rezeptor-Signalkomplex TRAF2 durch K48-Ubiquitin-Ketten für die proteasomalen Degradation markieren. Hierdurch wird die konstitutive Degradation von NIK im Zytoplasma, die TRAF2-cIAP Komplexe benötigt, unterbrochen und der alternative NFκB-Signalweg aktiviert. TRAF1 kann die TRAF2-Degradation inhibieren. Im klassischen NFκB-Signalweg dient TRAF2 der Rekrutierung von cIAP1/2 und dem LUBAC, die wiederum RIP K63-ubiquitinieren, welches dann über TAK1 und den IKK-Kinasen die Degradation von IκBα induzieren.

7.1. Die Rolle von TRAF2 im NFκB-Signalweg der Todesrezeptoren

Da erst vor Kurzem Beobachtungen bezüglich der TRAILR-Signalgebung gemacht wurden, die ein jahrzehntelang bestehendes Modell der NFκB-Induktion dieser Rezeptoren änderten, möchte ich zunächst kurz auf diese Änderungen eingehen.

Neueste Studien konnten nachweisen, dass die Signaltransduktion von den TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 ähnlicher zu der von TNFR1 ist als zunächst angenommen. Varfolomeev et al. konnte bereits 2005 zeigen, dass der klassische NFκB-Signalweg nach Stimulation mit TRAIL ausgelöst wird. Dies geschieht, verglichen mit der NFκB-Stimulation durch TNF, in einem schwächeren und zeitlich verzögerten Ausmaß. Hierbei wird ein sekundärer, zytoplasmatischer Signalkomplex gebildet, bei dem weitere Komponenten wie RIP, TRAF2 und NEMO durch FADD und Caspase-8 rekrutiert werden. Dabei ist die Stimulation von JNK und p38 abhängig von RIP und TRAF2, wohingegen die IKK-Aktivierung NEMO-abhängig ist (Varfolomeev et al., 2005).

RIP, ein Schlüsselmediator der TNFR1-Signalgebung, spielt auch eine wichtige Rolle in der TRAIL-induzierten IKK und JNK-Aktivierung und rekrutiert A20, welches eine Kernkomponente des TNFR1-Signalkomplexes ist und RIP ubiquitinieren kann, um die Aktivität des NFκB-Signalweges zu regulieren (Lin et al., 2000; Henry und Martin, 2017). Über eine breite und generelle Relevanz des LUBAC für die Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges durch verschiedene Stimuli wurde berichtet (Sasaki und Iwai, 2015).

Dennoch konnte der LUBAC als Komponente für die TRAIL-induzierte Signaltransduktion erst vor kurzem von Lafont et al. identifiziert werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass TRAF2 und RIP mit dem LUBAC nicht nur im zytosolischen Signalkomplex, sondern auch im Plasmamembran-assoziierten TRAILR-Signalkomplex anzufinden sind. Diese Beobachtung revidierte ein jahrzehntelanges Verständnis der TRAILR1/2-Signaltransduktion. Eine Rolle von TRAF2 und RIP in der proinflammatorischen Signaltransduktion wurde bereits beobachtet. Während die enzymatische Caspase-8-Aktivität entscheidend für die TRAIL-induzierte Apoptose ist, ist diese für die Rekrutierung von TRAF2, RIP und LUBAC entbehrlich (Lafont et al., 2017; Wajant, 2017).

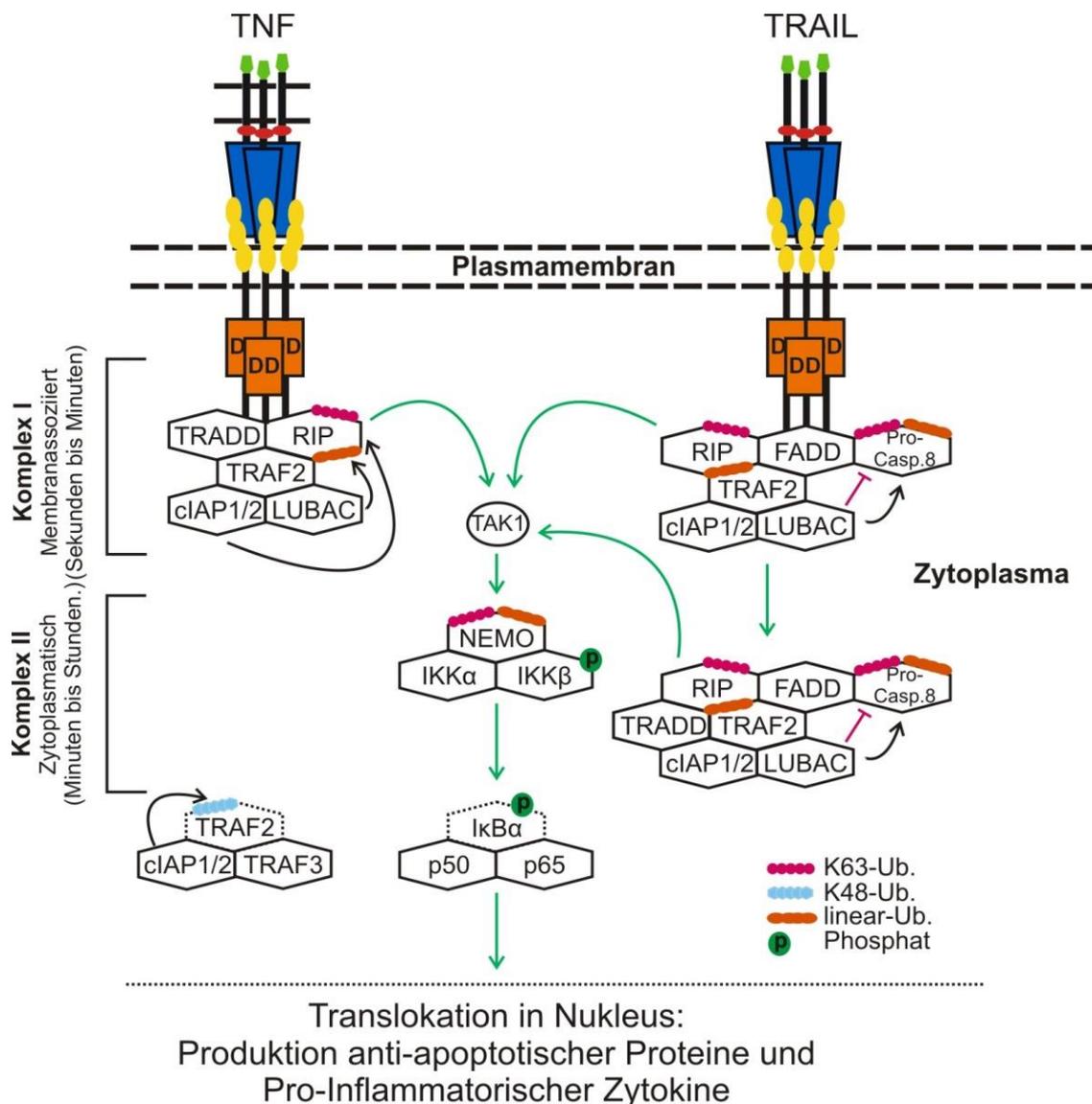


Abbildung 31: Modell der TNF- und TRAIL-induzierten Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges nach dem aktuellen Stand der Forschung.

Seitdem Lafont et al. 2017 die Rolle des LUBAC im TRAILR1/2-Signalweg aufzeigen konnten, wurde eine Aktualisierung des Signalweges notwendig. Nach diesem Modell findet man die NFκB-regulierenden Mediatoren nicht ausschließlich zytoplasmatischen Komplex, sondern auch im Komplex I.

In dieser Arbeit konnte eine signifikante und starke Reduzierung der TNF-induzierten Degradation von IκBα in HCT116-PI3Kmut-Zellen beobachtet werden (Abb. 13B). Diese ging allerdings mit einer nur geringen Reduktion der TNF-induzierten IL8-Expression einher. Da weitere TNFR1-induzierte Signalwege wie der JNK- oder p38-Signalweg zur IL8-Expression beitragen, könnte die IL8-Expression durch diese Signalwege kompensiert werden. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da der NFκB-Signalweg nahezu obligatorisch für die TNFR1-induzierte IL8-Expression ist.

Der relativ schwache Effekt der TRAF2-Defizienz auf die TNF-induzierte IL8-Produktion könnte bezüglich der nicht-linearen, zeitlich komplexen Beziehung zwischen I κ B α -Degradation, Neusynthese von I κ B α , NF κ B-Aktivität und IL8-mRNA stehen. Demnach wäre es möglich, dass die beobachtete Reduktion der I κ B α -Degradation durch eine verminderte und verspätete Neusynthese von I κ B α und einer schwächeren, aber anhaltenden Aktivität des Signalweges herrühren. Diese resultiert in einer nur geringfügigen Auswirkung auf die IL8-Produktion trotz starker I κ B α -Degradation. Allerdings wurde bereits in TRAF2-defizienten embryonalen Fibroblasten ein lediglich partiell inhibitorischer Effekt der TRAF2-Defizienz auf die TNF-stimulierte NF κ B-Aktivierung gezeigt (Yeh et al., 1997).

TRAIL induzierte ebenfalls eine Phosphorylierung von I κ B α , jedoch mit einer im Vergleich zu TNF verlangsamten Kinetik. Die vergleichsweise langsame, aber andauernde Induktion des klassischen NF κ B kann durch die vorwiegende Rekrutierung des NF κ B induzierenden Komplexes sekundär im Zytosol erklärt werden, wie es bei den TRAILR1 und TRAILR2 beschrieben wurde (siehe Abb. 31). Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit den verschiedenen Lokalisationen von TRADD, RIP und TRAF2 in den Signalwegen von TNFR1-artigen- und CD95-artigen-Todesrezeptoren. TRADD, RIP und TRAF2 werden innerhalb weniger Sekunden an den TNFR1 rekrutiert und aktivieren anschließend den klassischen NF κ B-Signalweg (Siegmond et al., 2017). 2-4 Stunden nach Stimulation mit TRAIL wurde ein Plateau an phosphoryliertem I κ B α erreicht. Die Degradation von I κ B α konnte jedoch im Gegensatz zur Phosphorylierung kaum detektiert werden (Abb. 9A). Dennoch befand sich die TRAIL-induzierte IL8-Produktion auf ähnlichem Niveau wie nach TNF-Stimulation. Obgleich die IL8-Produktion nach TNF-Stimulation weniger beeinflusst erscheint als bei TRAIL- und CD95L-Stimulation (27 % zu 49 % und zu 45 %) ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied (Abb. 19). Dies deutet auf eine reduzierte Todesrezeptor-induzierte IL8-Produktion und eine beschleunigte Caspase-8-Prozessierung in TRAF2-KO-Zellen hin, die mindestens zwei, teilweise verschiedene, Aspekte in der Funktion von TRAF2 in der Signaltransduktion von Todesrezeptoren widerspiegeln. Somit wurde in dieser Arbeit ein nicht einheitlicher, signifikanter Effekt der TRAF2-Defizienz auf die I κ B α -Degradation nach TRAIL-Stimulation gezeigt. Dennoch wurde die erwartete signifikante Reduktion der IL8-Produktion beobachtet. Dies könnte erneut den überlappenden Vorgang von Degradation und Neusynthese von I κ B α

wiederspiegeln, der zur mangelnden Korrelation von akkumulierten aktiven Kern-NF κ B-Transkriptionsfaktoren und I κ B α -Level führt.

Die Bindungspartner TRADD und RIP agieren im TNFR1 „upstream“ von TRAF2 und scheinen obligat für die DR-induzierte IL8-Induktion zu sein (Fullsack et al., 2019) während TRAF2 ersetzbar ist (Abb. 15B, 16B, 18, 20C). Eine mögliche Erklärung wäre, dass der TRADD-RIP-Komplex mit IKK-stimulierenden Kinasen und dem IKK-Komplex selbst in einer TRAF2-unabhängigen Art interagiert. Allerdings gibt es für diese Vermutung mehrere Möglichkeiten:

1. RIP kann direkt mit der NEMO/IKK γ -Untereinheit des IKK-Komplexes interagieren und bindet zusätzlich die IKK-stimulierende Kinase MEKK3, die wiederum mit einer weiteren IKK stimulierenden Kinase, TAK1, interagiert (Zhang et al., 2000; Yang et al., 2001; Blonska et al., 2005).
2. Andere Mitglieder der TRAF-Familie könnten TRAF2 in seiner Rolle in der Todesrezeptor-Signalgebung ersetzen. So wurde zum Beispiel bereits in murinen, embryonalen Fibroblasten mit TRAF2/TRAF5 Doppel-KO eine redundante Rolle von TRAF2 und TRAF5 nachgewiesen (Tada et al., 2001).

In den hier untersuchten Zelllinien war die TRAF5-Expression unterhalb des Detektionslevels. Die in der Literatur beobachteten Effekte beziehen sich auf Zellen murinen Ursprungs und sind somit ebenfalls nicht direkt vergleichbar. Da inzwischen bekannt ist, dass TRAF1 mit TRAF2 mehrere Interaktionspartner teilt, unter anderem RIP, TRADD und NEMO/IKK γ (Hsu et al., 1996; Henkler et al., 2003) und des weiteren heterotrimere-Komplexe mit TRAF2 bildet (Zheng et al., 2010), wurde in dieser Arbeit die Rolle von TRAF1 in der Todesrezeptor-induzierten IL8-Produktion untersucht. Während die TRAF2-Rekonstitution in HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO-Zellen die IL8-Induktion wiederherstellen konnte, zeigte in diesen Zellen die TRAF1-Expression keinen Einfluss (Abb. 16B, 17).

Verbesserte biochemische Analysen der DR-induzierten NF κ B-Stimulation und die Herstellung von TRAF2-TRADD und TRAF2-RIP doppel-defizienten Zellen könnte in Zukunft helfen, ein klareres Bild von der Rolle von TRAF2 in der Todesrezeptor-vermittelten Signaltransduktion zu erhalten.

7.2. TRAF2 und seine Rolle in der Induktion der Apoptose

Zusätzlich zu der Rolle und Funktion von TRAF2 in der TNFRSF-vermittelten Stimulation von sowohl des klassischen, als auch alternativen NFκB-Signalwegs, spielt TRAF2 eine Rolle in der Regulation des TNFR1-induzierten Zelltodes. Anfänglich wurde diese protektive Aktivität von TRAF2 seiner Rolle in der Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges zugeschrieben. Beobachtungen zeigten zudem eine anti-nekroptotische Funktion von TRAF2 in der Signaltransduktion von CD95-artigen Todesrezeptoren (Petersen et al., 2015). Der Rolle von TRAF2 in der Signaltransduktion dieser Todesrezeptoren wurde jedoch bislang wenig Beachtung geschenkt. Aus diesem Grund wurde die Untersuchung der Funktion von TRAF2 in deren Signaltransduktion zum Fokus meiner Arbeit. Eine schematische Darstellung der nachfolgenden Beobachtungen findet sich in Abbildung 32.

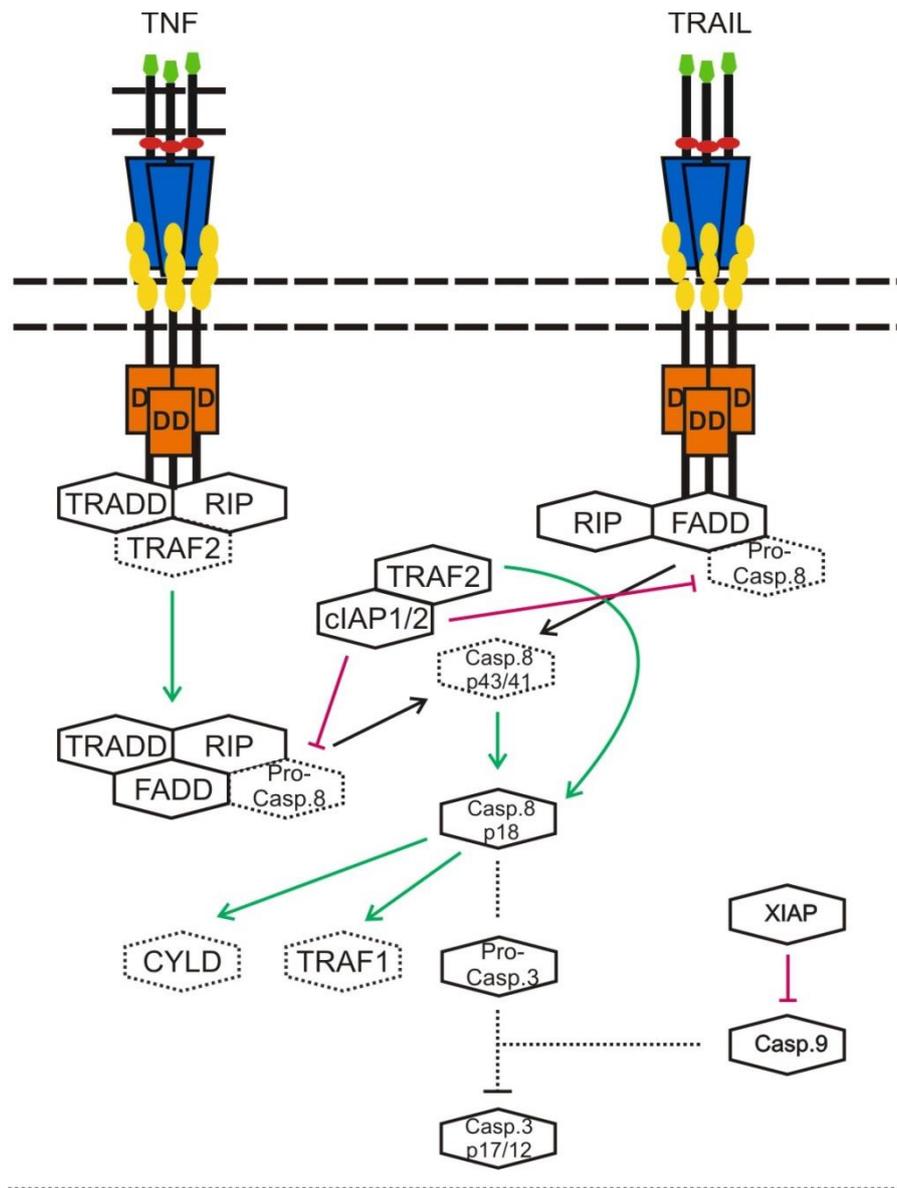
Hierfür wurden TRAF2-KO Varianten von den Apoptose-resistenten Zelllinien HCT116-PI3Kmut und HT1080-Bcl2-TNFR2 generiert. TRAF2 hat bekanntermaßen einen inhibitorischen Effekt auf die Apoptoseinduktion und trägt zur proinflammatorischen Signalgebung bei. Die Sensitivierung für die Apoptose und Inhibition der Proinflammatorischen Signalgebung wurde bereits früher durch TRAF2-Depletion umfangreich nachgewiesen (Vince et al., 2008; Karl et al., 2014; Siegmund et al., 2016). Die TRAF2-Defizienz hatte keine große Auswirkung auf den Todesrezeptor-vermittelten Zelltod in HCT116-PI3Kmut-Zellen (Abb.14). Diese Beobachtung korrelierte mit dem Schutzmechanismus der Zellen gegenüber dem Zelltod. TRAF2 schützt die Zellen vor der DR-induzierten Apoptose-Induktion auf Ebene der Caspase-8-Aktivierung. Da der Effekt der Apoptose-Resistenz in HCT116-PI3Kmut-Zellen „downstream“ der Caspase-8-Aktivierung auf Basis einer Bax-Defizienz beruht, sensitiviert der TRAF2-KO in diesen Zellen nicht für die Apoptose-Induktion. Sowohl eine TRAF2-Defizienz als auch eine Depletion von cIAP1 nach Behandlung mit dem SMAC-Mimetik BV6 gingen einher mit einer verstärkten Todesrezeptor-induzierten Procaspase-8-Prozessierung (Abb. 24A, 29).

Die Spaltung der Caspase-8-Substrate CYLD und TRAF1 blieb von der Bax-Defizienz unbeeinflusst und konnte in HCT116-PI3Kmut-Zellen stattfinden. CYLD und TRAF1 wurden bei Präsenz von TRAF2 nach TNF-Stimulation gespalten (Abb.17C, 21). Diese Beobachtung bestätigt, dass TRAF2 wichtig für die Generierung oder Stabilisierung des aktiven p18 Fragmentes der Caspase-8 ist.

In Übereinstimmung mit der Idee, dass TRAF2 im Komplex mit cIAP1 in diesem Szenario wirkt, wurde der steigende Effekt der BV6-Behandlung auf die TNF-induzierte Procaspase-8-Prozessierung in TRAF2-KO-Zellen aufgehoben (Abb. 29). Überraschenderweise konnte keine Korrelation zwischen verstärkter Procaspase-8-Prozessierung und Caspase-8-Aktivität in TRAF2-KO-Zellen beobachtet werden. Es wurde sogar eine Reduktion der Caspase-8-Aktivität beobachtet (Abb. 24B, C).

Dieser Effekt könnte auf das Vorhandensein verschiedener Caspase-8-Spezies in DR-stimulierten Zellen basieren, wie DR-Caspase-8-Homodimere, Caspase-8/FLIP_L-Heterodimere und zytosolische Caspase-8-Komplexe (Micheau et al., 2002). In dieser Arbeit wurden aus diesem Anlass die FLIP-Varianten FLIP_L und FLIP_S untersucht. Die beiden FLIP-Varianten regulieren die DR-induzierte Spaltung der Procaspase-8 unterschiedlich. Daher kann in Abhängigkeit von FLIP ein genereller Effekt von TRAF2 auf die IL8-Induktion und Caspase-8-Prozessierung ausgeschlossen werden. Es konnte kein Unterschied in der Expression und Rekrutierung der beiden FLIP-Varianten nach TRAF2-KO festgestellt werden (Abb. 21, 22). Hierbei sollte erwähnt werden, dass die Zellen zur Apoptose-Sensitivierung mit CHX behandelt wurden, welches bekanntermaßen die Induktion der FLIP-Expression inhibiert, ohne Auswirkungen auf TRAF1, A20 oder cIAP2 auszuüben (Kreuz et al., 2001).

Eine weitere Studie konnte ebenfalls eine TRAF2-abhängige Regulation der Caspase-Aktivität aufweisen, jedoch nicht für Caspase-8, sondern für Caspase-2. TRAF2, aber auch TRAF1 und TRAF3 binden hier direkt an das aktive Caspase-2-Dimer. In TRAF2-Abhängigkeit wird die Caspase-2 ubiquitiniert und stabilisiert (Robeson et al., 2018). Die Möglichkeit einer Ubiquitinierung von Caspase-8 durch TRAF2 wäre ein interessanter Ansatz. So ist zum Beispiel nach aktuellem Stand der Forschung unklar, ob und inwiefern die K48-Ubiquitinierung durch TRAF2-cIAP-Komplexe durch TRAF2 erfolgt, oder durch cIAP1/2-limitiert. Diese können sowohl K48- als auch K63-Ubiquitin Ketten formieren (Silke und Brink, 2010).



Apoptose

Abbildung 32: Schematische Darstellung der möglichen Rolle von TRAF2 in der Caspase-8 Prozessierung am Beispiel von HCT116-PI3Kmut.

Der TNFR1-DISC wird erst sekundär im Zytoplasma gebildet, der TRAIL-DISC bereits an der Plasmamembran. Die Prozessierung der Caspase-8 wird durch cIAP1/2 inhibiert, welches durch TRAF2 rekrutiert wird. Da TRAF2 in beiden Signalwegen sowohl im Komplex I als auch im Komplex II rekrutiert wird, ist noch unklar, an welcher Stelle die Inhibition auftritt. TRAF2 wiederum ist wichtig für die Prozessierung der Caspase-8 zum p18-Fragment. Da eine Prozessierung der Caspase-3 in Typ-II-Zellen die Aktivität der Caspase-9 benötigt und diese durch die Bax-Defizienz nicht aktiviert werden kann, wird die Apoptose unterdrückt. Die Spaltung von Caspase-8 Substraten wie TRAF1 und CYLD kann jedoch stattfinden.

III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der TNFSF Liganden.	10
Abbildung 2: Mitglieder und Untergruppen der TNFRSF.	11
Abbildung 3: Schema der durch TRAIL und CD95L induzierten Signalwege.....	14
Abbildung 4: TNFR1-assoziierte Signalwege.....	17
Abbildung 5: Struktur der humanen Caspasen.	20
Abbildung 6: Struktureller Aufbau von TRAF1 und TRAF2.	22
Abbildung 7: HCT116-PI3Kmut-Zellen sind gegenüber TRAIL-induzierten Zelltod resistent.	44
Abbildung 8: Vergleichbare Caspase-8 Prozessierung zwischen HCT116-PI3Kwt- und HCT116-PI3Kmut-Zellen.	45
Abbildung 9: TRAIL stimuliert in HCT116-PI3Kmut-Zellen den klassischen NFκB Signalweg.	46
Abbildung 10: Die TRAIL-induzierte Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges ist Caspase-8-unabhängig.....	48
Abbildung 11: HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO-Zellen sind TRAF2-defizient.....	50
Abbildung 12: HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO-Zellen zeigen gegenüber ihrer Parentalzelllinie eine verstärkte, nicht weiter stimulierbare p100-Prozessierung.....	51
Abbildung 13: TRAF2 spielt eine stimulierende, nicht-obligate Rolle in der TNFR1- induzierten Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges.....	51
Abbildung 14: HCT116-PI3Kmut-TRAF2-KO Zellen sind gegenüber der TRAIL- und TNF- induzierten Zelltodinduktion resistent.	52
Abbildung 15: TRAF2-re stellt die Todesrezeptor-vermittelte IL8-Induktion quantitativ wieder her.....	53
Abbildung 16: Die TRAF2-KO-abhängige Reduktion der IL8-Produktion nach Stimulation mit TRAIL kann nicht durch ektopisch exprimiertes TRAF1 kompensiert werden.....	54
Abbildung 17: Die Prozessierung der Procaspase-8 wird sowohl nach Stimulation des TNFR1- als auch des TRAILR1/2 durch TRAF2 und TRAF1 reguliert.	56
Abbildung 18: TRAF2 spielt eine nicht-obligate stimulierende Rolle in der CD95- vermittelten IL8-Expression, die nicht von TRAF1 kompensiert werden kann.....	57

Abbildung 19: Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Todesrezeptoren TRAILR1/2, CD95 und TNFR1 in der TRAF2-abhängigen IL8-Expression.....	58
Abbildung 20: Die TRAF2-abhängige IL8-Expression in der Todesrezeptor-vermittelten Signaltransduktion ist in HT1080-Bcl2-TNFR2-Zellen verifizierbar..	59
Abbildung 21: TRAF2 hat keinen Einfluss auf die Expression von FLIP _L und FLIP _S	61
Abbildung 22: Die TRAIL- induzierte Rekrutierung von FLIP an TRAILR1/2 ist TRAF2-unabhängig.	62
Abbildung 23: FLIP _L und FLIP _S inhibieren die TRAIL- und CD95L-, jedoch nicht die TNF-induzierte IL8-Expression.....	63
Abbildung 24: Während die Prozessierung der Procaspase-8 in TRAF2-defizienten Zellen verstärkt ist, kommt es zu keiner Steigerung der Caspase-8 Aktivität.	65
Abbildung 25: Die Rekrutierung von TRAF1, A20, cIAP1, IKK β und CYLD zum TNFR1 ist TRAF2-abhängig.	67
Abbildung 26: Das SMAC-Mimetik BV6 induziert die Degradation von cIAP1 in HCT116-PI3Kmut-Zellen.	68
Abbildung 27: Die Aktivierung des TNFR1-stimulierten klassischen NF κ B-Signalweges ist cIAP-unabhängig.	68
Abbildung 28: cIAP hat einen untergeordneten Einfluss auf die Todesrezeptor-induzierte IL8-Expression.	69
Abbildung 29: Das SMAC Mimetik BV6 verstärkt die TNF-induzierte Procaspase-8-Prozessierung.....	70
Abbildung 30: Die Rolle von TRAF2 in der Aktivierung der NF κ B-Signalwege und das Wechselspiel zwischen TNFRSF-Rezeptoren.	73
Abbildung 31: Modell der TNF- und TRAIL-induzierten Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges nach dem aktuellen Stand der Forschung.....	75
Abbildung 32: Schematische Darstellung der möglichen Rolle von TRAF2 in der Caspase-8 Prozessierung am Beispiel von HCT116-PI3Kmut.....	80

V. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor
APS	Ammoniumpersulfat
Bak	Bcl2 agonist/killer
Bax	Bcl2 associated protein X
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BH3	Bcl2 Homology domain 3
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BIR	Baculovirus IAP repeat
Bzw.	Beziehungsweise
CARD	Caspase Recruiting Domain
Caspase	cysteinyll aspartat specific proteinase
CD	Cluster of Differentiation
CD95L	Cluster of Differentiation 95 Ligand
cDNA	Complementary DNA
ced	cell death abnormal
CHX	Cycloheximide
cIAP	Cellular IAP
CRD	Cysteine Rich Domain
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CYLD	Cylindromatosis
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DL	Death ligand

DNA	Deoxyribonucleic acid
DR	Death receptor
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDAR	Ectodysplasin A receptor
ELISA	Enzyme Linked immunosorbent Assay
FAM	Carboxyfluorescein
FADD	Fas Associated Death Domain
Fas	FS7-associated surface antigen
Fc	fragment crystallisable
FCS	Fetal Calf Serum
FLICA	Fluorochrome-labeled inhibitors of caspases
FLICE	FADD-like ICE
FLIP _L	FLICE Inhibitory Protein Long
FLIP _S	FLICE Inhibitory Protein Short
FMK	Fluoromethyl-keton
Fn14	Fibroblast growth factor-inducible 14
GFP	Green fluorescent protein
gRNA	Guide ribonucleic acid
GVHD	Graft-Versus-Host-Disease
h	Hour /Stunde
HRP	Horseradish peroxidase
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICE	interleukin-1-beta converting enzyme
IκBα	Inhibitor of NFκB α
IKK	IκB kinase
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton

KO	Knockout
L	Ligand
LUBAC	Linear ubiquitin chain assembly complex
LT	Lymphotoxin
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEKK1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
min	Minuten
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
mut	Mutiert
NEMO	NFκB essential modulator
NIK	NFκB inducing kinase
NFκB	Nuclear factor κB
n.s.	nicht-signifikant
OD	Optische Dichte
p75NGFR	low-affinity nerve growth factor receptor
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline-Tween
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidium Iodide
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PLAD	Pre-ligand assembly domain
re	rekonstituiert
RING	Really Interesting New Gene
RIP	Receptor Interacting Protein
rpm	Rounds per minute

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SB	Sleeping beauty
sc	Single chain
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SMAC	second mitochondria-derived activator of apoptosis
TAK-1	(TGF- β)-activated kinase-1
tBid	Truncated Bid
Tbs	TRAF-binding-site
TBS	Tris Buffered Saline
TBS-T	Tris Buffered Saline-Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transforming growth factor- β
THD	TNF Homology Domain
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	TNF Receptor
TNFSF	TNF Superfamiliy
TNFRSF	TNF Receptor Superfamily
TRADD	TNF-Receptor Associated Death Domain
TRAF	TNF Receptor Associated Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing
TRAILR	TRAIL Receptor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TWEAK	TNF-related Weak Inducer of Apoptosis
wt	Wildtypisch
zIETD	Z-IE(OMe)TD(OMe)
zVAD	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp

VI. QUELLENVERZEICHNIS

- Aderka, D. (1996). The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 231-240.
- Amstad, P.A., Yu, G., Johnson, G.L., Lee, B.W., Dhawan, S., und Phelps, D.J. (2001). Detection of caspase activation in situ by fluorochrome-labeled caspase inhibitors. *Biotechniques* 31, 608-610, 612, 614, passim.
- Androlewicz, M.J., Browning, J.L., und Ware, C.F. (1992). Lymphotoxin is expressed as a heteromeric complex with a distinct 33-kDa glycoprotein on the surface of an activated human T cell hybridoma. *J Biol Chem* 267, 2542-2547.
- Annibaldi, A., und Meier, P. (2018). Checkpoints in TNF-Induced Cell Death: Implications in Inflammation and Cancer. *Trends Mol Med* 24, 49-65.
- Au, P.Y., und Yeh, W.C. (2007). Physiological roles and mechanisms of signaling by TRAF2 and TRAF5. *Adv Exp Med Biol* 597, 32-47.
- Bedner, E., Smolewski, P., Amstad, P., und Darzynkiewicz, Z. (2000). Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 259, 308-313.
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S., und Baltimore, D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376, 167-170.
- Blonska, M., Shambharkar, P.B., Kobayashi, M., Zhang, D., Sakurai, H., Su, B., und Lin, X. (2005). TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 280, 43056-43063.
- Bodmer, J.L., Schneider, P., und Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 27, 19-26.
- Borghi, A., Verstrepen, L., und Beyaert, R. (2016). TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF-kappaB, MAP kinases and cell death. *Biochem Pharmacol* 116, 1-10.
- Bratton, S.B., und Salvesen, G.S. (2010). Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci* 123, 3209-3214.

- Brenner, D., Blaser, H., und Mak, T.W. (2015). Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol* 15, 362-374.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., und Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666-3670.
- Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., Cannizzaro, L.A., und Et Al. (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256, 97-100.
- Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., und Lenardo, M.J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351-2354.
- Chang, D.W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B.C., Yaish-Ohad, S., Peter, M.E., und Yang, X. (2002). c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo j* 21, 3704-3714.
- Chopra, M., Brandl, A., Siegmund, D., Mottok, A., Schafer, V., Biehl, M., Kraus, S., Bauerlein, C.A., Ritz, M., Mattenheimer, K., Schwinn, S., Seher, A., Grabinger, T., Einsele, H., Rosenwald, A., Brunner, T., Beilhack, A., und Wajant, H. (2015). Blocking TWEAK-Fn14 interaction inhibits hematopoietic stem cell transplantation-induced intestinal cell death and reduces GVHD. *Blood* 126, 437-444.
- Choudhary, S., Kalita, M., Fang, L., Patel, K.V., Tian, B., Zhao, Y., Edeh, C.B., und Brasier, A.R. (2013). Inducible tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor-1 expression couples the canonical to the non-canonical NF-kappaB pathway in TNF stimulation. *J Biol Chem* 288, 14612-14623.
- Coley, W.B. (1936). The Diagnosis and Treatment of Bone Sarcoma. *Glasgow Med J* 126, 128-164.
- Cui, Z., Geurts, A.M., Liu, G., Kaufman, C.D., und Hackett, P.B. (2002). Structure-function analysis of the inverted terminal repeats of the sleeping beauty transposon. *J Mol Biol* 318, 1221-1235.
- Cullen, S.P., Henry, C.M., Kearney, C.J., Logue, S.E., Feoktistova, M., Tynan, G.A., Lavelle, E.C., Leverkus, M., und Martin, S.J. (2013). Fas/CD95-induced chemokines can serve as "find-me" signals for apoptotic cells. *Mol Cell* 49, 1034-1048.

- Ehrenschwender, M., Siegmund, D., Wicovsky, A., Kracht, M., Dittrich-Breiholz, O., Spindler, V., Waschke, J., Kalthoff, H., Trauzold, A., und Wajant, H. (2010). Mutant PIK3CA licenses TRAIL and CD95L to induce non-apoptotic caspase-8-mediated ROCK activation. *Cell Death Differ* 17, 1435-1447.
- Fotin-Mleczek, M., Henkler, F., Hausser, A., Glauner, H., Samel, D., Graness, A., Scheurich, P., Mauri, D., und Wajant, H. (2004). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1 regulates CD40-induced TRAF2-mediated NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 279, 677-685.
- Fotin-Mleczek, M., Henkler, F., Samel, D., Reichwein, M., Hausser, A., Parmryd, I., Scheurich, P., Schmid, J.A., und Wajant, H. (2002). Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J Cell Sci* 115, 2757-2770.
- Fullsack, S., Rosenthal, A., Wajant, H., und Siegmund, D. (2019). Redundant and receptor-specific activities of TRADD, RIPK1 and FADD in death receptor signaling. *Cell Death Dis* 10, 122.
- Gardam, S., Turner, V.M., Anderton, H., Limaye, S., Basten, A., Koentgen, F., Vaux, D.L., Silke, J., und Brink, R. (2011). Deletion of cIAP1 and cIAP2 in murine B lymphocytes constitutively activates cell survival pathways and inactivates the germinal center response. *Blood* 117, 4041-4051.
- Garton, K.J., Gough, P.J., und Raines, E.W. (2006). Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. *J Leukoc Biol* 79, 1105-1116.
- Geserick, P., Drewniok, C., Hupe, M., Haas, T.L., Diessenbacher, P., Sprick, M.R., Schon, M.P., Henkler, F., Gollnick, H., Walczak, H., und Leverkus, M. (2008). Suppression of cFLIP is sufficient to sensitize human melanoma cells to TRAIL- and CD95L-mediated apoptosis. *Oncogene* 27, 3211-3220.
- Gonzalvez, F., Lawrence, D., Yang, B., Yee, S., Pitti, R., Marsters, S., Pham, V.C., Stephan, J.P., Lill, J., und Ashkenazi, A. (2012). TRAF2 Sets a threshold for extrinsic apoptosis by tagging caspase-8 with a ubiquitin shutoff timer. *Mol Cell* 48, 888-899.
- Granger, G.A., Shacks, S.J., Williams, T.W., und Kolb, W.P. (1969). Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. *Nature* 221, 1155-1157.

- Gray, P.W., Aggarwal, B.B., Benton, C.V., Bringman, T.S., Henzel, W.J., Jarrett, J.A., Leung, D.W., Moffat, B., Ng, P., Svedersky, L.P., und Et Al. (1984). Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* 312, 721-724.
- Gruss, H.J., und Dower, S.K. (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85, 3378-3404.
- Griet, C., Silvestri, E., De Smaele, E., Franzoso, G., und Vito, P. (2002). c-FLIP efficiently rescues TRAF-2^{-/-} cells from TNF-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 9, 138-144.
- Guo, F., Sun, A., Wang, W., He, J., Hou, J., Zhou, P., und Chen, Z. (2009). TRAF1 is involved in the classical NF-kappaB activation and CD30-induced alternative activity in Hodgkin's lymphoma cells. *Mol Immunol* 46, 2441-2448.
- Guo, X., Yin, H., Li, L., Chen, Y., Li, J., Doan, J., Steinmetz, R., und Liu, Q. (2017). Cardioprotective Role of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2 by Suppressing Apoptosis and Necroptosis. *Circulation* 136, 729-742.
- Ha, H., Han, D., und Choi, Y. (2009). TRAF-mediated TNFR-family signaling. *Curr Protoc Immunol* Chapter 11, Unit11.19D.
- Harper, N., Farrow, S.N., Kaptein, A., Cohen, G.M., und Macfarlane, M. (2001). Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand- induced NF-kappa B activation by inhibition of apical caspases. *J Biol Chem* 276, 34743-34752.
- Hartwig, T., Montinaro, A., Von Karstedt, S., Sevko, A., Surinova, S., Chakravarthy, A., Taraborrelli, L., Draber, P., Lafont, E., Arce Vargas, F., El-Bahrawy, M.A., Quezada, S.A., und Walczak, H. (2017). The TRAIL-Induced Cancer Secretome Promotes a Tumor-Supportive Immune Microenvironment via CCR2. *Mol Cell* 65, 730-742.e735.
- Hayden, M.S., und Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344-362.
- Henkler, F., Baumann, B., Fotin-Mleczek, M., Weingartner, M., Schwenzler, R., Peters, N., Graness, A., Wirth, T., Scheurich, P., Schmid, J.A., und Wajant, H. (2003). Caspase-mediated cleavage converts the tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor (TRAF)-1 from a selective modulator of TNF receptor signaling to a general inhibitor of NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 278, 29216-29230.

- Henry, C.M., und Martin, S.J. (2017). Caspase-8 Acts in a Non-enzymatic Role as a Scaffold for Assembly of a Pro-inflammatory "FADDosome" Complex upon TRAIL Stimulation. *Mol Cell* 65, 715-729.e715.
- Hirata, R., Chamberlain, J., Dong, R., und Russell, D.W. (2002). Targeted transgene insertion into human chromosomes by adeno-associated virus vectors. *Nat Biotechnol* 20, 735-738.
- Hoogwater, F.J., Nijkamp, M.W., Smakman, N., Steller, E.J., Emmink, B.L., Westendorp, B.F., Raats, D.A., Sprick, M.R., Schaefer, U., Van Houdt, W.J., De Bruijn, M.T., Schackmann, R.C., Derksen, P.W., Medema, J.P., Walczak, H., Borel Rinkes, I.H., und Kranenburg, O. (2010). Oncogenic K-Ras turns death receptors into metastasis-promoting receptors in human and mouse colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 138, 2357-2367.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V., und Goeddel, D.V. (1996). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4, 387-396.
- Hu, W.H., Johnson, H., und Shu, H.B. (1999). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. *J Biol Chem* 274, 30603-30610.
- Huang, J., Yu, S., Ji, C., und Li, J. (2015). Structural basis of cell apoptosis and necrosis in TNFR signaling. *Apoptosis* 20, 210-215.
- Irmeler, M., Steiner, V., Ruegg, C., Wajant, H., und Tschopp, J. (2000). Caspase-induced inactivation of the anti-apoptotic TRAF1 during Fas ligand-mediated apoptosis. *FEBS Lett* 468, 129-133.
- Janicke, R.U., Ng, P., Sprengart, M.L., und Porter, A.G. (1998). Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem* 273, 15540-15545.
- Janssen, K., Pohlmann, S., Janicke, R.U., Schulze-Osthoff, K., und Fischer, U. (2007). Apaf-1 and caspase-9 deficiency prevents apoptosis in a Bax-controlled pathway and promotes clonogenic survival during paclitaxel treatment. *Blood* 110, 3662-3672.
- Karl, I., Jossberger-Werner, M., Schmidt, N., Horn, S., Goebeler, M., Leverkus, M., Wajant, H., und Giner, T. (2014). TRAF2 inhibits TRAIL- and CD95L-induced apoptosis and necroptosis. *Cell Death Dis* 5, e1444.

- Kataoka, T., Budd, R.C., Holler, N., Thome, M., Martinon, F., Irmeler, M., Burns, K., Hahne, M., Kennedy, N., Kovacsovics, M., und Tschopp, J. (2000). The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol* 10, 640-648.
- Kavuri, S.M., Geserick, P., Berg, D., Dimitrova, D.P., Feoktistova, M., Siegmund, D., Gollnick, H., Neumann, M., Wajant, H., und Leverkus, M. (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, 16631-16646.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., und Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kohli, M., Rago, C., Lengauer, C., Kinzler, K.W., und Vogelstein, B. (2004). Facile methods for generating human somatic cell gene knockouts using recombinant adeno-associated viruses. *Nucleic Acids Res* 32, e3.
- Kreuz, S., Siegmund, D., Rumpf, J.J., Samel, D., Leverkus, M., Janssen, O., Hacker, G., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Scheurich, P., und Wajant, H. (2004). NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol* 166, 369-380.
- Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P., und Wajant, H. (2001). NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 21, 3964-3973.
- Lafont, E., Kantari-Mimoun, C., Draber, P., De Miguel, D., Hartwig, T., Reichert, M., Kupka, S., Shimizu, Y., Taraborrelli, L., Spit, M., Sprick, M.R., und Walczak, H. (2017). The linear ubiquitin chain assembly complex regulates TRAIL-induced gene activation and cell death. *Embo j* 36, 1147-1166.
- Lee, S.Y., und Choi, Y. (2007). TRAF1 and its biological functions. *Adv Exp Med Biol* 597, 25-31.
- Leo, E., Deveraux, Q.L., Buchholtz, C., Welsh, K., Matsuzawa, S., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., und Reed, J.C. (2001). TRAF1 is a substrate of caspases activated during tumor necrosis factor receptor-alpha-induced apoptosis. *J Biol Chem* 276, 8087-8093.

- Li, J., und Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27, 6194-6206.
- Lin, Y., Devin, A., Cook, A., Keane, M.M., Kelliher, M., Lipkowitz, S., und Liu, Z.G. (2000). The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of I κ B kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Mol Cell Biol* 20, 6638-6645.
- Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., und Liu, Z.G. (1999). Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev* 13, 2514-2526.
- Locksley, R.M., Killeen, N., und Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Mace, P.D., Smits, C., Vaux, D.L., Silke, J., und Day, C.L. (2010). Asymmetric recruitment of cIAPs by TRAF2. *J Mol Biol* 400, 8-15.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., Dicarlo, J.E., Norville, J.E., und Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823-826.
- Matsuda, I., Matsuo, K., Matsushita, Y., Haruna, Y., Niwa, M., und Kataoka, T. (2014). The C-terminal domain of the long form of cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIPL) inhibits the interaction of the caspase 8 prodomain with the receptor-interacting protein 1 (RIP1) death domain and regulates caspase 8-dependent nuclear factor kappaB (NF-kappaB) activation. *J Biol Chem* 289, 3876-3887.
- Matsuzawa, A., Tseng, P.H., Vallabhapurapu, S., Luo, J.L., Zhang, W., Wang, H., Vignali, D.A., Gallagher, E., und Karin, M. (2008). Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science* 321, 663-668.
- Mcperson, A.J., Snell, L.M., Mak, T.W., und Watts, T.H. (2012). Opposing roles for TRAF1 in the alternative versus classical NF-kappaB pathway in T cells. *J Biol Chem* 287, 23010-23019.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., und Tschopp, J. (2001). NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 21, 5299-5305.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C., und Grutter, M.G. (2002). The long form of FLIP is an activator of

- caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277, 45162-45171.
- Micheau, O., und Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181-190.
- Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwig, E.A., und Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75, 653-660.
- O'donnell, M.A., Perez-Jimenez, E., Oberst, A., Ng, A., Massoumi, R., Xavier, R., Green, D.R., und Ting, A.T. (2011). Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nat Cell Biol* 13, 1437-1442.
- O'gorman, A., Colleran, A., Ryan, A., Mann, J., und Egan, L.J. (2010). Regulation of NF-kappaB responses by epigenetic suppression of IkappaBalpha expression in HCT116 intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299, G96-g105.
- Pasparakis, M., und Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* 517, 311-320.
- Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B., und Goeddel, D.V. (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312, 724-729.
- Petersen, S.L., Chen, T.T., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Gonzalvez, F., und Ashkenazi, A. (2015). TRAF2 is a biologically important necroptosis suppressor. *Cell Death Differ* 22, 1846-1857.
- Riccardi, C., und Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1, 1458-1461.
- Robeson, A.C., Lindblom, K.R., Wojton, J., Kornbluth, S., und Matsuura, K. (2018). Dimer-specific immunoprecipitation of active caspase-2 identifies TRAF proteins as novel activators. *Embo j* 37.
- Rothe, M., Pan, M.G., Henzel, W.J., Ayres, T.M., und Goeddel, D.V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83, 1243-1252.
- Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J., und Goeddel, D.V. (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78, 681-692.

- Safa, A.R. (2012). c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Exp Oncol* 34, 176-184.
- Samuels, Y., Diaz, L.A., Jr., Schmidt-Kittler, O., Cummins, J.M., DeLong, L., Cheong, I., Rago, C., Huso, D.L., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Velculescu, V.E. (2005). Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 7, 561-573.
- Sasaki, K., und Iwai, K. (2015). Roles of linear ubiquitinylation, a crucial regulator of NF-kappaB and cell death, in the immune system. *Immunol Rev* 266, 175-189.
- Scheidereit, C. (2006). I kappa B kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 25, 6685-6705.
- Shen, R.R., Zhou, A.Y., Kim, E., O'connell, J.T., Hagerstrand, D., Beroukhim, R., und Hahn, W.C. (2015). TRAF2 is an NF-kappaB-activating oncogene in epithelial cancers. *Oncogene* 34, 209-216.
- Shi, J.H., und Sun, S.C. (2018). Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor Regulation of Nuclear Factor kappaB and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *Front Immunol* 9, 1849.
- Shu, H.B., Halpin, D.R., und Goeddel, D.V. (1997). Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* 6, 751-763.
- Siegmund, D., Klose, S., Zhou, D., Baumann, B., Roder, C., Kalthoff, H., Wajant, H., und Trauzold, A. (2007). Role of caspases in CD95L- and TRAIL-induced non-apoptotic signalling in pancreatic tumour cells. *Cell Signal* 19, 1172-1184.
- Siegmund, D., Kums, J., Ehrenschwender, M., und Wajant, H. (2016). Activation of TNFR2 sensitizes macrophages for TNFR1-mediated necroptosis. *Cell Death Dis* 7, e2375.
- Siegmund, D., Lang, I., und Wajant, H. (2017). Cell death-independent activities of the death receptors CD95, TRAILR1, and TRAILR2. *Febs j* 284, 1131-1159.
- Siegmund, D., Wicovsky, A., Schmitz, I., Schulze-Osthoff, K., Kreuz, S., Leverkus, M., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., und Wajant, H. (2005). Death receptor-induced signaling pathways are differentially regulated by gamma interferon upstream of caspase 8 processing. *Mol Cell Biol* 25, 6363-6379.
- Silke, J., und Brink, R. (2010). Regulation of TNFRSF and innate immune signalling complexes by TRAFs and cIAPs. *Cell Death Differ* 17, 35-45.
- Smith, C.A., Farrah, T., und Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962.

- Smolewski, P., Bedner, E., Du, L., Hsieh, T.C., Wu, J.M., Phelps, D.J., and Darzynkiewicz, Z. (2001). Detection of caspases activation by fluorochrome-labeled inhibitors: Multiparameter analysis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 44, 73-82.
- Sulston, J.E., und Horvitz, H.R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56, 110-156.
- Tada, K., Okazaki, T., Sakon, S., Kobarai, T., Kurosawa, K., Yamaoka, S., Hashimoto, H., Mak, T.W., Yagita, H., Okumura, K., Yeh, W.C., und Nakano, H. (2001). Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J Biol Chem* 276, 36530-36534.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., und Et Al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.
- Trauzold, A., Siegmund, D., Schniewind, B., Sipos, B., Egberts, J., Zorenkov, D., Emme, D., Roder, C., Kalthoff, H., und Wajant, H. (2006). TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 25, 7434-7439.
- Trebing, J., Lang, I., Chopra, M., Salzmann, S., Moshir, M., Silence, K., Riedel, S.S., Siegmund, D., Beilhack, A., Otto, C., und Wajant, H. (2014). A novel llama antibody targeting Fn14 exhibits anti-metastatic activity in vivo. *MAbs* 6, 297-308.
- Tsuchiya, Y., Nakabayashi, O., und Nakano, H. (2015). FLIP the Switch: Regulation of Apoptosis and Necroptosis by cFLIP. *Int J Mol Sci* 16, 30321-30341.
- Vanags, D.M., Porn-Ares, M.I., Coppola, S., Burgess, D.H., und Orrenius, S. (1996). Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem* 271, 31075-31085.
- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., und Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 135-147.
- Varfolomeev, E., Blankenship, J.W., Wayson, S.M., Fedorova, A.V., Kayagaki, N., Garg, P., Zobel, K., Dynek, J.N., Elliott, L.O., Wallweber, H.J., Flygare, J.A., Fairbrother, W.J., Deshayes, K., Dixit, V.M., und Vucic, D. (2007). IAP

- antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 131, 669-681.
- Varfolomeev, E., Goncharov, T., Maecker, H., Zobel, K., Komuves, L.G., Deshayes, K., und Vucic, D. (2012). Cellular inhibitors of apoptosis are global regulators of NF-kappaB and MAPK activation by members of the TNF family of receptors. *Sci Signal* 5, ra22.
- Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D., und Ashkenazi, A. (2005). Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* 280, 40599-40608.
- Vince, J.E., Chau, D., Callus, B., Wong, W.W., Hawkins, C.J., Schneider, P., Mckinlay, M., Benetatos, C.A., Condon, S.M., Chunduru, S.K., Yeoh, G., Brink, R., Vaux, D.L., und Silke, J. (2008). TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFalpha. *J Cell Biol* 182, 171-184.
- Vince, J.E., Wong, W.W., Khan, N., Feltham, R., Chau, D., Ahmed, A.U., Benetatos, C.A., Chunduru, S.K., Condon, S.M., Mckinlay, M., Brink, R., Leverkus, M., Tergaonkar, V., Schneider, P., Callus, B.A., Koentgen, F., Vaux, D.L., und Silke, J. (2007). IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 131, 682-693.
- Wajant, H. (2003). Death receptors. *Essays Biochem* 39, 53-71.
- Wajant, H. (2014). Principles and mechanisms of CD95 activation. *Biol Chem* 395, 1401-1416.
- Wajant, H. (2015). Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. *Cell Death Differ* 22, 1727-1741.
- Wajant, H. (2017). TRAIL- and TNF-induced signaling complexes-so similar yet so different. *Embo j* 36, 1117-1119.
- Wajant, H., Grell, M., und Scheurich, P. (1999). TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 10, 15-26.
- Wajant, H., Henkler, F., und Scheurich, P. (2001). The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal* 13, 389-400.
- Wajant, H., und Scheurich, P. (2011). TNFR1-induced activation of the classical NF-kappaB pathway. *Febs j* 278, 862-876.

- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., und Baldwin, A.S., Jr. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680-1683.
- Wang, L., Du, F., und Wang, X. (2008). TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133, 693-703.
- Wei, B., Ruan, J., Mi, Y., Hu, J., Zhang, J., Wang, Z., Hu, Q., Jiang, H., und Ding, Q. (2017). Knockdown of TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) modulates in vitro growth of TRAIL-treated prostate cancer cells. *Biomed Pharmacother* 93, 462-469.
- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., und Kluck, R.M. (2011). Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta* 1813, 521-531.
- Wicovsky, A., Henkler, F., Salzmann, S., Scheurich, P., Kneitz, C., und Wajant, H. (2009a). Tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 enhances proinflammatory TNF receptor-2 signaling and modifies TNFR1-TNFR2 cooperation. *Oncogene* 28, 1769-1781.
- Wicovsky, A., Salzmann, S., Roos, C., Ehrenschwender, M., Rosenthal, T., Siegmund, D., Henkler, F., Gohlke, F., Kneitz, C., und Wajant, H. (2009b). TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling. *Cell Death Differ* 16, 1445-1459.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F., und Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Xie, P. (2013). TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. *J Mol Signal* 8, 7.
- Xu, L., Zhang, Y., Qu, X., Che, X., Guo, T., Li, C., Ma, R., Fan, Y., Ma, Y., Hou, K., Li, D., Hu, X., Liu, B., Yu, R., Yan, H., Gong, J., und Liu, Y. (2017). DR5-Cbl-b/c-Cbl-TRAF2 complex inhibits TRAIL-induced apoptosis by promoting TRAF2-mediated polyubiquitination of caspase-8 in gastric cancer cells. *Mol Oncol* 11, 1733-1751.
- Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z., und Su, B. (2001). The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol* 2, 620-624.
- Yeh, W.C., Shahinian, A., Speiser, D., Kraunus, J., Billia, F., Wakeham, A., De La Pompa, J.L., Ferrick, D., Hum, B., Iscove, N., Ohashi, P., Rothe, M., Goeddel, D.V., und Mak, T.W. (1997). Early lethality, functional NF-kappaB activation,

- and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* 7, 715-725.
- Yin, Q., Lamothe, B., Darnay, B.G., and Wu, H. (2009). Structural basis for the lack of E2 interaction in the RING domain of TRAF2. *Biochemistry* 48, 10558-10567.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.
- Zapata, J.M., Krajewska, M., Krajewski, S., Kitada, S., Welsh, K., Monks, A., McCloskey, N., Gordon, J., Kipps, T.J., Gascoyne, R.D., Shabaik, A., and Reed, J.C. (2000). TNFR-associated factor family protein expression in normal tissues and lymphoid malignancies. *J Immunol* 165, 5084-5096.
- Zhang, B., Wang, Z., Li, T., Tsitsikov, E.N., and Ding, H.F. (2007). NF-kappaB2 mutation targets TRAF1 to induce lymphomagenesis. *Blood* 110, 743-751.
- Zhang, G. (2004). Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding. *Curr Opin Struct Biol* 14, 154-160.
- Zhang, S.Q., Kovalenko, A., Cantarella, G., and Wallach, D. (2000). Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity* 12, 301-311.
- Zheng, C., Kabaleeswaran, V., Wang, Y., Cheng, G., and Wu, H. (2010). Crystal structures of the TRAF2: cIAP2 and the TRAF1: TRAF2: cIAP2 complexes: affinity, specificity, and regulation. *Mol Cell* 38, 101-113.
- Zheng, L., Bidere, N., Staudt, D., Cubre, A., Orenstein, J., Chan, F.K., and Lenardo, M. (2006). Competitive control of independent programs of tumor necrosis factor receptor-induced cell death by TRADD and RIP1. *Mol Cell Biol* 26, 3505-3513.

VII. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

I. Während der Promotion entstandene Publikationen

- **Kreckel, J.**, Anany, M.A., Siegmund, D., und Wajant, H. (2019). TRAF2 Controls Death Receptor-Induced Caspase-8 Processing and Facilitates Proinflammatory Signaling. *Front Immunol* 10, 2024.
- Anany, M.A., **Kreckel, J.**, Fullsack, S., Rosenthal, A., Otto, C., Siegmund, D., und Wajant, H. (2018). Soluble TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) enhances poly(I:C)-induced RIPK1-mediated necroptosis. *Cell Death Dis* 9, 1084.

II. Vor der Promotion entstandene Publikationen

- Grimmig, T., Moench, R., **Kreckel, J.**, Haack, S., Rueckert, F., Rehder, R., Tripathi, S., Ribas, C., Chandraker, A., Germer, C.T., Gasser, M., und Waaga-Gasser, A.M. (2016). Toll Like Receptor 2, 4, and 9 Signaling Promotes Autoregulative Tumor Cell Growth and VEGF/PDGF Expression in Human Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci* 17.
- Grimmig, T., Moll, E.M., Kloos, K., Thumm, R., Moench, R., Callies, S., **Kreckel, J.**, Vetterlein, M., Pelz, J., Polat, B., Tripathi, S., Rehder, R., Ribas, C.M., Chandraker, A., Germer, C.T., Waaga-Gasser, A.M., und Gasser, M. (2017). Upregulated Heat Shock Proteins After Hyperthermic Chemotherapy Point to Induced Cell Survival Mechanisms in Affected Tumor Cells From Peritoneal Carcinomatosis. *Cancer Growth Metastasis* 10, 1179064417730559.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich ein großes Dankeschön an Herrn Prof. Dr. Harald Wajant für die hervorragende Betreuung während der Promotion aussprechen. Die Verbesserung der Rahmenbedingungen, die die Universität durch ihre neue Promotionsordnung anstrebt, wird bereits seit Jahren in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin durch eine herausragende Erreichbarkeit bei Fragestellungen und wissenschaftlicher Betreuung erreicht.

Mein Dank gilt ebenso Prof. Dr. Thomas Müller für die Betreuung meiner Promotion als Zweitgutachter.

Ein Herzliches Dankeschön möchte ich meinen Kollegen und Kolleginnen aus der Abteilung für Molekulare Innere Medizin aussprechen. Insbesondere für die Unterstützung in den Phasen des wissenschaftlichen Arbeitens, in denen es nicht so abläuft wie geplant. Ich möchte mich besonders bei Tina und Bella für die Einarbeitung bedanken. Simone, Kirstin und Olena, vielen lieben Dank für das Korrekturlesen meiner Thesis und die Unterstützung während der Promotion. Danke auch an Juliane, Dani, Mohammed und Johannes für die gute Zusammenarbeit. Dr. Daniela Siegmund möchte ich herzlich für die Möglichkeit danken, weiterhin Teil der Forschungsgruppe bleiben zu können.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Verlobten Cliff. Es ist unfassbar wertvoll jemanden zu haben, der einen in seinem Vorhaben bedingungslos unterstützt und motiviert. Vielen Dank vor allem an mein Vorbild, meine Mutter Stephanie Kreckel, für die Aufmunterung, Unterstützung, Motivation uns alles was dazu gehört. Von dir habe ich gelernt, dass man alles erreichen kann, wenn man hart daran arbeitet.

-Danke-