

Die Rolle von TRAF1 und JNK bei der TNF- vermittelten Apoptose

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

vorgelegt von

Andreas Wicovsky

aus

Albstadt-Ebingen

Würzburg, 2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Professor Dr. Wajant

2. Gutachter: Professor Dr. Kuhn

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich erkläre weiterhin, dass ich, außer mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine akademischen Grade erworben habe, noch versucht habe zu erwerben.

Würzburg, den

.....
(Andreas Wicovsky)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1.September 2003 bis 1.Mai 2007 an der Medizinischen Poliklinik II in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Professor Dr. Wajant angefertigt.

Danksagung

Vielen Dank!

... an Prof. Dr. Wajant für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung, die anregenden Diskussionen und Ideen sowie für die sehr gute Zusammenarbeit.

... an alle Mitarbeiter der Abteilung für Molekulare Innere Medizin für die Unterstützung bei der praktischen Arbeit sowie für die vielen netten Stunden innerhalb und außerhalb des Labors.

... an meine Eltern, meine Schwester und meine Freundin Miriam für die Motivation und Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1 Die Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Ligandenfamilie und ihre Rezeptoren	3
1.2 TNF und seine Rezeptoren TNFR1 und TNFR2	4
1.3 Durch TNF aktivierte Signalwege	6
1.3.1 TNF-vermittelte NF κ B-Aktivierung	6
1.3.2 TNF-vermittelte Apoptoseinduktion	7
1.3.3 TNF-vermittelte c-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Aktivierung	11
1.3.3.1 Allgemeines über JNK	11
1.3.3.2 Mechanismen der TNF-induzierten JNK-Aktivierung	12
1.3.3.2.1 Caspase-unabhängige JNK-Aktivierung	12
1.3.3.2.2 Caspase-abhängige JNK-Aktivierung	14
1.4 Der apoptotische Crosstalk von TNFR1 und TNFR2	15
1.4.1 Die TNF-receptor-associated factor (TRAF)-Familie	15
1.4.2 Das TNFR1-TNFR2-Zusammenspiel	17
1.5 Ziel der Arbeit	19
2. Materialien	20
2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien	20
2.2 Antikörper und Antiseren	21
2.3 Zelllinien	22
2.4 Fusionsproteine	23
2.5 Lösungen und Puffer	23
3. Methoden	24
3.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen	24
3.2 Retrovirale Transfektion von HeLa TNFR2- und Hela CD40-Zellen	24
3.3 Zytotoxizitätsassay	25
3.4 Bestimmung der IL-8-Produktion	25
3.5 Herstellung von Zelllysaten	26
3.6 Ko-immunpräzipitationen	26
3.7 Isolation von <i>lipid rafts</i>	27
3.8 Zelluläre Fraktionierung	27
3.9 Western-Blot	28
3.9.1 SDS-PAGE	28
3.9.2 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose	28
3.9.3 Immunfärbung	29
4. Ergebnisse	30
4.1 Die Rolle von TRAF1 beim TNFR-Crosstalk	30
4.1.1 Die TNFR2-induzierte TRAF2-Depletion reguliert die Zusammensetzung des TNFR1-Signalkomplexes	30
4.1.2 TRAF1 reguliert TNF-induzierte zelluläre Effekte	35

4.1.3 TRAF1 verhindert die TRAF2-Degradation und blockiert die TNFR2-vermittelte Inhibition der TNFR1-Signaltransduktion	37
4.1.4 TRAF1 blockiert die Signaltransduktion von CD40	42
4.2 TNF induziert die JNK-Aktivierung Caspase-abhängig	43
4.2.1 Inhibition des NF κ B-Signalweges kann für die TNF-induzierte Apoptose sensitivieren	43
4.2.2 Die TNF-induzierte persistierende JNK-Aktivierung wird Zelltyp-abhängig durch z-VAD-fmk inhibiert	49
4.2.3 Die TNF-induzierte JNK-Aktivierung besitzt weder eine proapoptotische noch eine antiapoptotische Wirkung	55
4.2.4 Die TNF-induzierte anhaltende JNK-Aktivierung wird Zelltyp-abhängig durch ROS reguliert.	58
5. Diskussion	60
5.1 Die Rolle von TRAF1 beim TNFR-Crosstalk	60
5.2 Die TNF-induzierte andauernde JNK-Aktivierung verläuft in vielen Zelllinien Caspase-abhängig	63
6. Zusammenfassung	67
7. Summary	69
8. Literaturverzeichnis	71
9. Anhang	81
9.1 Abkürzungsverzeichnis	81
9.2 Publikationen	84
9.3 Lebenslauf	85

1. Einleitung

1.1 Die Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Ligandenfamilie und ihre Rezeptoren

Tumor Nekrose Faktor (TNF) ist das namensgebende Zytokin einer Gruppe von Proteinen, die wegen ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten als TNF-Ligandenfamilie bezeichnet wird. Die Identifizierung und erstmalige Charakterisierung von TNF erfolgte 1975 durch Carswell (Carswell et al., 1975). Der Name TNF ist auf die zunächst entdeckte Eigenschaft des Zytokins zurückzuführen, in bestimmten Zelllinien und Tiermodellen Nekrose auszulösen. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahrzehnte deuten allerdings darauf hin, dass TNF seine Wirkung vor allem in entzündlichen Prozessen sowie bei Differenzierungs- und Wachstumsvorgängen entfaltet (Wajant et al., 2003). Nachdem 1984 die cDNA von TNF kloniert wurde, entdeckte man mittlerweile aufgrund von strukturellen und funktionellen Homologien insgesamt 19 Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie, u.a. $LT\alpha$, $LT\alpha1\beta2$, VEGI, FasL, CD40L, CD27L, CD30L, OX40L, 4-1BB, TRAIL, TWEAK, RANKL, LIGHT, GITRL, APRIL und BAFF (Bodmer et al., 2002). Die charakteristische Gemeinsamkeit sind Sequenzhomologien in einem 145 Aminosäuren großen Bereich der extrazellulären Domäne (TNF homology domain). Alle Mitglieder der TNF-Familie mit Ausnahme von $LT\alpha$ werden als Typ-2 Membranproteine exprimiert (Armitage, 1994). Zudem können durch proteolytische Spaltung einige der Liganden als lösliche Zytokine freigesetzt werden. So wird z.B. membranständiges TNF (mTNF) durch die Metalloprotease TACE (TNF-alpha converting enzyme) freigesetzt (Black et al., 1997). Das dabei entstehende lösliche TNF (sTNF) besitzt zudem, wie in Kapitel 1.2 beschrieben, andere Eigenschaften als mTNF bei der Rezeptoraktivierung. Im Allgemeinen vermitteln die Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie ihre biologischen Funktionen durch Interaktionen mit den TNF-Rezeptoren (TNFR) (Abb. 1). Diese sind Typ-1-Transmembranproteine und besitzen als charakteristisches Merkmal einen bis sechs so genannte cysteinreiche Bereiche, von denen jeder typischerweise drei Cysteinbrücken in ihrer extrazellulären Domäne ausbildet (Naismith and Sprang, 1998). Da die intrazelluläre

Domäne der TNFR keine intrinsische enzymatische Aktivität besitzt, erfolgt die Signaltransduktion über verschiedene zytoplasmatische Adaptermoleküle. Dabei unterscheidet man zwischen den TRAF-interagierenden Rezeptoren (z.B. TNFR2, CD40), die überwiegend proliferative Prozesse aktivieren und den Todesrezeptoren (z.B. TNFR1, Fas/APO1), die oft apoptotisch wirken. In den folgenden Kapiteln werden vor allem der in dieser Arbeit untersuchte Ligand TNF, seine Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 sowie die durch diese ausgelösten Signalwege genauer beschrieben.

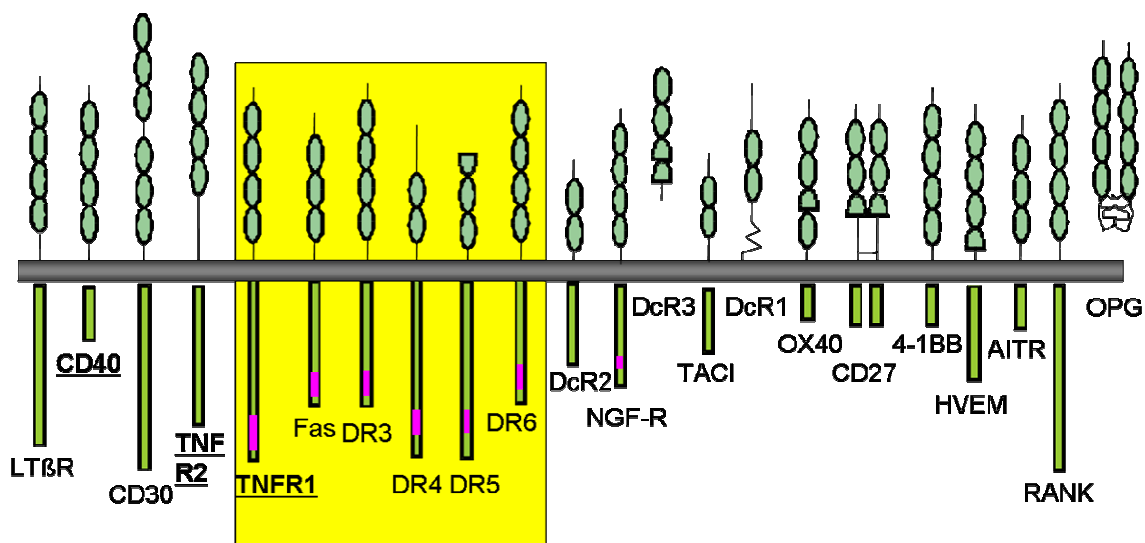


Abbildung 1: Die Mitglieder der TNFR-Familie. Die cysteinreichen Regionen sind als Ellipsen dargestellt. Die Todesrezeptoren sind gelb hervorgehoben, die intrazellulären Todesdomänen sind lila markiert. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten TNFR sind unterstrichen.

1.2 TNF und seine Rezeptoren TNFR1 und TNFR2

TNF wird in erster Linie von Makrophagen und aktivierten T-Zellen, aber auch von anderen lymphoiden Zellen, Mastzellen, Endothelzellen sowie neuronalem Gewebe produziert. Während der TNFR1 auf nahezu allen Geweben exprimiert wird, findet man den TNFR2 in erster Linie auf Zellen des Immunsystems (Wajant et al., 2003). Die große Bedeutung von TNF zeigt sich in zahlreichen Krankheitsbildern wie z.B. rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn, bei der TNF der zentrale Mediator der pathologischen Effekte ist (Mannel and Echtenacher, 2000). Bei der Therapie dieser

Erkrankungen mit TNF-neutralisierenden Medikamenten wie *Etanercept* oder *Infliximab* konnten in den letzten Jahren große Erfolge erzielt werden (Taylor et al., 2000). Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, übt TNF seine zahlreichen biologischen Funktionen sowohl in einer membranständigen als auch in einer löslichen Form aus. Die membranständige Form ist als Typ-2-Transmembranprotein in stabilen Homotrimeren organisiert und kann den Todesrezeptor TNFR1 und den TRAF-interagierenden Rezeptor TNFR2 voll aktivieren (Grell et al., 1995). Die lösliche Form besteht aus drei 17 kDa großen und 157 Aminosäuren (AS) langen TNF-Protomeren, welche unter physiologischen Bedingungen gleichfalls stabile Homotrimerere bilden. Sie kann ebenso an beide Rezeptoren binden, jedoch nur den TNFR1 voll aktivieren (Abb. 2) (Grell et al., 1995). Die molekularen Mechanismen der Aktivierung von TNFR1 und TNFR2 durch mTNF sowie sTNF waren in den letzten Jahren Ziel intensiver Forschungsarbeiten. Zunächst wurde eine Liganden-abhängige Trimerisierung und Aktivierung der Rezeptoren vermutet (Banner et al., 1993). Inzwischen wurde jedoch entdeckt, dass die TNFR über ihre so genannten PLAD-Domänen (preligand binding assembly domains) bereits autoaggregiert vorliegen (Chan et al., 2000). Dies lässt den Schluss zu, dass weitere komplexe Mechanismen existieren müssen, die die Rezeptoraktivierung bedingen. So scheint dabei die Bildung von supramolekularen Komplexen, Raft-Rekrutierung sowie Internalisierung besonders wichtig zu sein (siehe Kapitel 1.3.1 bis 1.3.3).

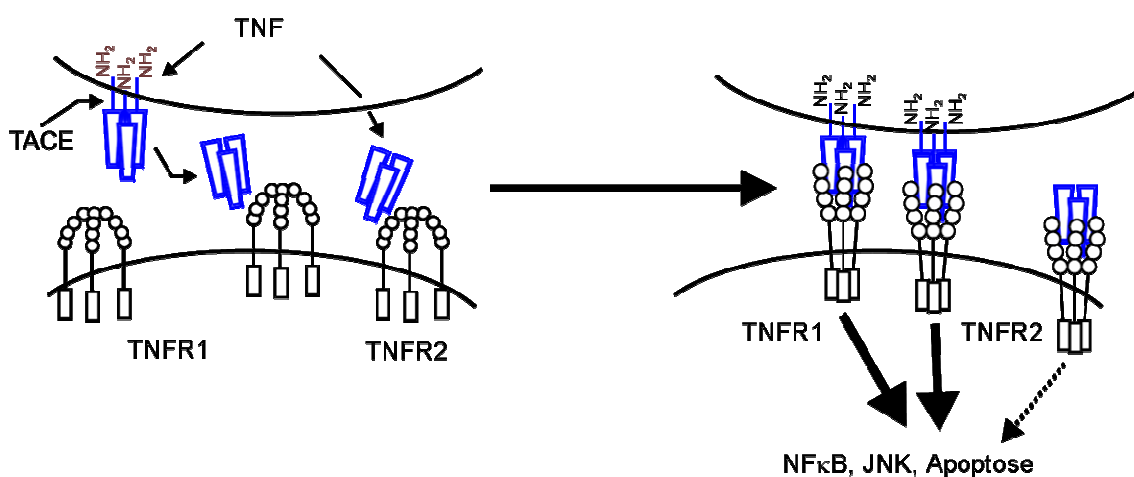


Abbildung 2: MTNF und sTNF sind unterschiedlich aktiv. Sowohl mTNF als auch sTNF können an TNFR1 und TNFR2 binden. Während mTNF beide Rezeptoren effizient stimuliert, kann sTNF nur den TNFR1 aktivieren.

1.3 Durch TNF aktivierte Signalwege

Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, spielt TNF bei zahlreichen pathologischen Vorgängen eine wichtige Rolle. Dabei entscheiden vor allem zelltypspezifische Charakteristika, wie z.B. Rezeptorausstattung sowie die Konzentration und Dauer der TNF-Stimulation darüber, welche Signalwege aktiviert werden. Die hier wohl wichtigsten TNF-induzierten Signalwege, die zur NF κ B- (nuclear factor kappaB) Aktivierung (TNFR1 und TNFR2) (Kapitel 1.3.1), der Apoptoseinduktion (nur TNFR1) (Kapitel 1.3.2) sowie der JNK- (c-jun N-terminal kinase) Aktivierung (TNFR1 und TNFR2) (Kapitel 1.3.3) führen, werden in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben.

1.3.1 TNF-vermittelte NF κ B-Aktivierung

Die beschriebene proinflammatorische Wirkung von TNF ist zu einem großen Teil auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B zurückzuführen (Luo et al., 2005; Ghosh and Karin, 2002; Karin and Lin, 2002). Unter dem Begriff NF κ B fasst man eine Gruppe von dimeren Transkriptionsfaktoren zusammen, die nach Aktivierung (z.B. IL-1, TNF) vom Zytoplasma in den Zellkern translozieren und dort die Expression verschiedener inflammatorischer Proteine induzieren. Bei Säugerzellen besteht diese aus den fünf Mitgliedern NF κ B1 (p50), NF κ B2 (p52), c-Rel, RelB und RelA (p65). Als gemeinsames Merkmal besitzt die NF κ B-Familie eine RHD-Domäne (Rel homology domain), welche die DNA-Bindung, Dimerisierung und die Interaktion mit spezifischen Inhibitoren, den I κ Bs (inhibitor of κ Bs), vermittelt (Verma et al., 1995). Die TNF-induzierte NF κ B-Aktivierung wird in erster Linie über den TNFR1 vermittelt (Chan et al., 2000a). Nach Liganden-Bindung kommt es dabei zunächst zu einer Translokation von TNFR1 in *lipid rafts* (Legler et al., 2003). Unter *lipid rafts* werden cholesterinreiche Mikrodomänen in Zellmembranen verstanden (Simons and van Meer, 1988). Anschließend kommt es zur Rekrutierung der für die NF κ B-Aktivierung benötigten Adapterproteine. In einem ersten Schritt wird TRADD (TNFR1 associated death domain) über seine Todesdomäne an den Rezeptor rekrutiert (Hsu et al., 1995). Rezeptorgebundenes TRADD kann nun als Plattform für die Rekrutierung der nachfolgenden Proteine TRAF2 (TNF receptor associated factor 2) und RIP (receptor-interacting protein) dienen (Hsu et al., 1996b; Hsu et al., 1996a). TRAF2 ist Mitglied der

phylogenetisch konservierten TRAF-Proteinfamilie, deren charakteristisches Merkmal eine 180 AS lange C-terminale TRAF-Domäne ist (siehe Kapitel 1.4.1) (Wajant et al., 2003; Wajant and Scheurich, 2001). Studien mit TRAF2- und RIP-defizienten embryonalen Mausfibroblasten (MEF) konnten zeigen, dass TRAF2 entscheidend ist für die darauffolgende Rekrutierung des IKK-Komplexes und RIP darüber hinaus für dessen Aktivierung nötig ist (Devin et al., 2001). Der IKK-Komplex besteht aus den katalytischen Untereinheiten IKK α (IKK1) und IKK β (IKK2) (Mercurio et al., 1997; DiDonato et al., 1997) sowie der regulatorischen Untereinheit IKK γ (IKK3) (Yamaoka et al., 1998). Nach erfolgter Aktivierung kann der IKK-Komplex I κ Bs phosphorylieren. Anschließend kommt es zu einer Ubiquitin-abhängigen Degradation (Karin and Lin, 2002). Die nach der Degradation der I κ Bs freiwerdende nukleare Lokalisationssequenz der NF κ B-Dimere vermittelt daraufhin den Transport in den Zellkern.

1.3.2 TNF-vermittelte Apoptoseinduktion

Unter Apoptose versteht man einen Mechanismus, bei dem der Organismus auf geregelte Art und Weise Zellen eliminiert. Im Gegensatz zur Nekrose, bei der die Zelle anschwillt und es zu einem Platzen der Plasmamembran sowie zu einer unkontrollierten Freisetzung des zytoplasmatischen Inhalts kommt, bleibt bei der Apoptose die Integrität der Plasmamembran erhalten. Es bilden sich vielmehr apoptotische Vesikel, die dann von Makrophagen einfach und ohne Entstehung einer Entzündungsreaktion, wie sie bei der Nekrose auftritt, aufgenommen werden können (Hengartner, 2000). Wichtige Merkmale der Apoptose sind neben dem Schrumpfen der Zelle oftmals die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Kluck et al., 1997) sowie die DNA-Kondensation mit nachfolgender Spaltung in ca. 180 Basenpaare große Stücke (Wyllie et al., 1984). Eine Schlüsselrolle bei der Apoptose spielen die Caspasen (cysteiny-aspartate-specific proteinases) (Kidd et al., 2000; Thornberry and Lazebnik, 1998). Dies ist eine hochkonservierte Proteasefamilie, die in ihrem aktiven Zentrum einen Cysteinrest besitzt und ihre Substrate stets nach einem Asparginsäurerest spaltet. Allgemein wird unterschieden zwischen Initiator- (z.B. Caspase-8) und Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3, -7). Initiatorcaspasen stehen am Anfang einer Caspase-Kaskade und werden nach einem entsprechenden Todessignal autokatalytisch aktiviert. Daraufhin können sie Effektorcaspasen spalten und aktivieren.

Diese spalten ihrerseits zahlreiche zelluläre Substrate, was schließlich zum Zelltod führt. Grundsätzlich kann der TNFR1 ebenso wie die anderen Mitglieder der Todesrezeptor-Untergruppe der TNFR-Familie Apoptose induzieren. *In vivo* scheint der TNF-induzierte Zelltod im Vergleich zu den TNF-induzierten entzündlichen Prozessen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Der Grund hierfür ist, dass die TNF-induzierte Aktivierung von NF κ B die TNF-vermittelte Apoptose überlagert. Dies unterscheidet den TNFR1 von anderen Todesrezeptoren wie beispielsweise Fas, bei denen die Apoptoseinduktion über die NF κ B-Aktivierung dominiert. Knock-out Studien konnten zeigen, dass die Caspase-8 und -10 sowie das Adapterprotein FADD (Fas-associating protein with a death domain) für den Todesrezeptor-vermittelten Zelltod essentiell sind (Varfolomeev et al., 1998; Sanchez et al., 1999; Zhang et al., 1998; Yeh et al., 1998; Kischkel et al., 1995). Bei Fas und den TRAIL-Todesrezeptoren wurden diese Proteine in einem membrangebundenen, apoptoseinduzierenden Signalkomplex, dem so genannten DISC (death-inducing-signaling-complex) nachgewiesen. In dem „induced-proximity“ Modell wird davon ausgegangen, dass zahlreiche Caspase-8 Moleküle bei der Bildung von supramolekularen Clustern in räumliche Nähe zueinander kommen (Boatright et al., 2003). Dies induziert dann die aktivierende Dimerisierung sowie die darauf folgende autoproteolytische Spaltung und Aktivierung der Caspase-8. Erstaunlicherweise konnte trotz zahlreicher Versuche bis heute kein vergleichbarer TNFR1-DISC immunpräzipitiert werden (Harper et al., 2003).

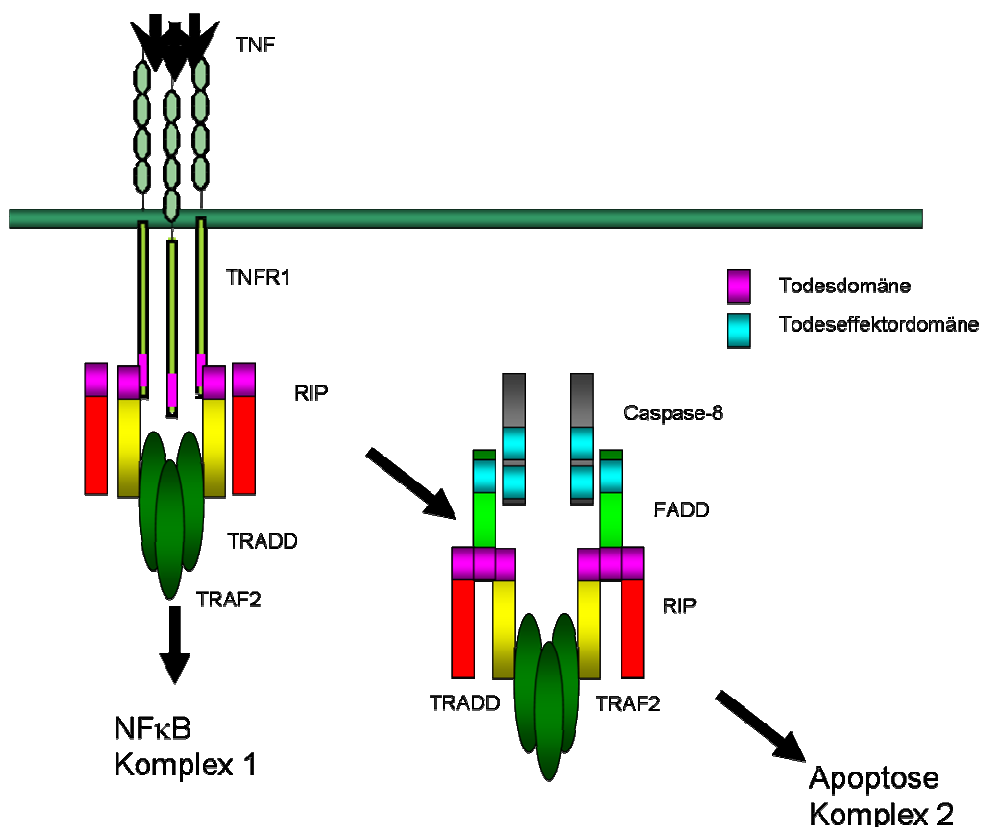


Abbildung 3: Modell der TNF-induzierten Bildung von sequentiellen Signalkomplexen. Zunächst bildet sich ein membranständiger NFκB-induzierender TNFR1-Komplex (Komplex 1), der aus TNFR1, TRADD, TRAF2 und RIP besteht. In einem zweiten Schritt wird der zytosolische apoptoseinduzierende Komplex 2 aus TRADD, TRAF2, RIP, FADD und Caspase-8 gebildet.

2003 wurde durch Micheau und Tschopp erstmals gezeigt, dass dieser Befund dadurch zu erklären war, dass die Bildung zweier aufeinander folgender Signalkomplexe die TNF-induzierte Apoptose auslöst (Abb. 3) (Micheau and Tschopp, 2003). Der initiale membrangebundene Komplex (Komplex 1) enthält neben TNFR1 das Adapterprotein TRADD, RIP sowie TRAF2 und kann innerhalb von Minuten NFκB aktivieren. Anschließend kommt es zu Modifikationen an diesen Proteinen. Dies führt zur Dissoziation des Komplexes vom TNFR1 und zur Bildung eines zweiten zytosolischen Komplexes (Komplex 2). Darin bindet TRADD über seine Todesdomäne an FADD, was zur Caspase-8-Aktivierung und Apoptose führt. Das Modell zweier sequentieller Komplexe ist auch gut mit der Bedeutung von *lipid rafts* bei der NFκB-Aktivierung vereinbar. Wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, ist die Translokation von TNFR1 in *lipid rafts* für die TNF-vermittelte NFκB-Aktivierung nötig. Bei einer chemischen Zerstörung der *lipid rafts* konnte eine verminderte NFκB-Aktivierung und verstärkte Apoptoseinduktion nachgewiesen werden (Legler et al., 2003). Dies ist

möglicherweise darauf zurückzuführen, dass sich der NF κ B-kompetente Komplex 1 nicht mehr bilden kann und TRADD daher direkt an den Apoptose-vermittelnden Komplex 2 rekrutiert wird. Wie die Bildung des Komplexes 2 in einem solchen Fall initiiert wird, ist jedoch unklar.

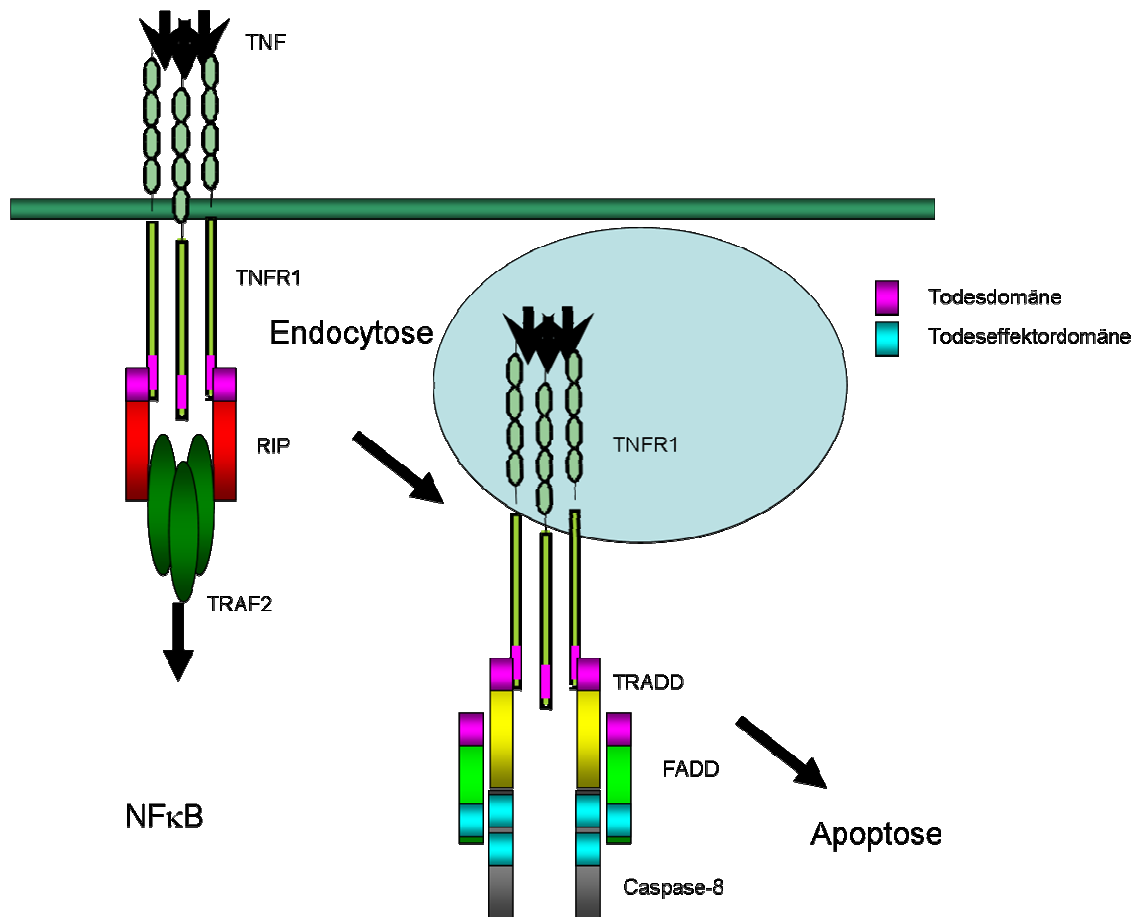


Abbildung 4: Internalisierungsabhängige Apoptoseinduktion durch TNFR1. An der Plasmamembran bilden TNFR1, TRAF2 und RIP den NF κ B-aktivierenden Komplex. Nach der Rezeptorinternalisierung wird in den Rezeptosomen aus TNFR1, TRADD, FADD und Caspase-8 der TNFR1-DISC gebildet.

2004 wurde ein alternatives Modell des TNF-vermittelten Zelltods von Schneider-Brachert und Kollegen veröffentlicht (Schneider-Brachert et al., 2004). Darin werden die Internalisierung von TNFR1 und die darauf folgende Ausbildung von so genannten Rezeptosomen als initiales Ereignis der Apoptoseinduktion beschrieben (Abb. 4). Im Gegensatz zu dem Modell der sequentiellen Signalkomplexe kommt es zunächst zu einer TRADD-unabhängigen Rekrutierung von TRAF2 und RIP an den membranständigen TNFR1. Nach ggf. erfolgter NF κ B-Aktivierung, wird der TNFR1

innerhalb von Minuten internalisiert und TRADD, FADD und Caspase-8 bilden schließlich den TNFR1-DISC. Die Tatsache, dass in dieser Studie erstmals die TRADD-unabhängige NF κ B-Aktivierung und das Vorhandensein eines TNFR1-DISC nachgewiesen werden konnte, steht im klaren Widerspruch zu den bisherigen Erkenntnissen der TNF-Signaltransduktion. Insbesondere der Befund, dass TRADD erst nach erfolgter Rezeptorinternalisierung rekrutiert wird, ist bis heute höchst umstritten. Dennoch könnten Zelltyp-spezifische sowie methodische Besonderheiten diese unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

1.3.3 TNF-vermittelte c-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Aktivierung

1.3.3.1 Allgemeines über JNK

Die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) bilden eine Unterfamilie der „mitogen activated protein kinase“ (MAPK) -Superfamilie (Hibi et al., 1993). Mit JNK1, JNK2 und JNK3 sind bis heute drei verschiedene Isoformen gefunden worden (Davis, 2000; Chang and Karin, 2001). Während JNK1 und JNK2 in nahezu allen Zelltypen exprimiert werden, findet man JNK3 hauptsächlich in neuronalem Gewebe sowie im Herzgewebe. Zahlreiche zelluläre Prozesse wie Inflammation, Differenzierung und Apoptose werden durch JNK maßgeblich reguliert. Die Aktivierung der JNK durch Zytokine (z.B. TNF, IL-1) oder zellulären Stress erfolgt stets durch eine MAPKinase-Kaskade (Lin et al., 1995; Derijard et al., 1995; Sanchez et al., 1994; Lu et al., 1997; Tournier et al., 2001). Dabei wird zunächst eine MAP3Kinase (MAP3K) aktiviert. Diese phosphoryliert und aktiviert dann eine MAP2Kinase (MAP2K), welche schließlich JNK spezifisch an den Aminosäuren Threonin 183 und Tyrosin 185 phosphoryliert und aktiviert. Wie in Abbildung 5 dargestellt, spielen bei der TNF-abhängigen JNK-Aktivierung die drei MAP3Kinasen TGF β -activated kinase-1 (TAK-1), apoptosis-signal-regulating kinase-1 (ASK-1) und MAP/ERK kinase kinase-1 (MEKK-1) sowie die MAP2Kinase MKK-7 (MAPKinase-Kinase-7) eine entscheidende Rolle (Davis, 2000). In den folgenden Kapiteln sollen insbesondere die molekularen Mechanismen der TNF-vermittelten JNK-Aktivierung sowie deren proinflammatorische und proapoptotische Wirkung genauer beleuchtet werden.

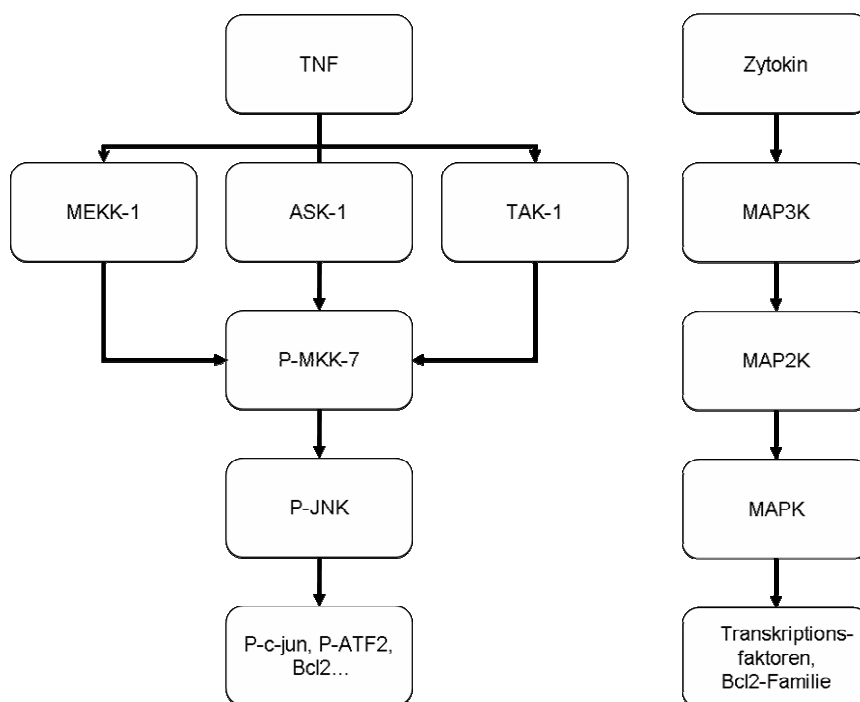


Abbildung 5: Die TNF-vermittelten JNK-Aktivierung. Schematisch dargestellt ist die TNF-induzierte Kinase-Kaskade, die zur JNK-Aktivierung führt.

1.3.3.2 Mechanismen der TNF-induzierten JNK-Aktivierung

1.3.3.2.1 Caspase-unabhängige JNK-Aktivierung

Der Mechanismus der TNF-vermittelten JNK-Aktivierung, ihr Zusammenspiel mit dem NF κ B-Signalweg und der Apoptoseinduktion waren in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten. Je nach zellulärem Kontext wurden sowohl antiapoptotische als auch proapoptotische Wirkungen der JNK-Aktivierung durch TNF beschrieben. So wurde in JNK1- und JunD-defizienten MEF ein antiapoptotischer Effekt der TNF-induzierten JNK-Aktivierung nachgewiesen (Lamb et al., 2003). Des Weiteren wurde in TNF-stimulierten TRAF2-defizienten MEF, die eine normale NF κ B-Aktivierung, aber komplett inhibierte JNK-Aktivierung aufwiesen, eine erhöhte Apoptoserate gefunden (Yeh et al., 1997). TNF induziert in den meisten Zelltypen nach fünf bis 30 Minuten zunächst eine transientes JNK-Aktivierung, woraufhin bei NF κ B-inhibierten Zellen eine zweite andauernde Aktivierung der JNK folgt (ab zwei Stunden)

(Nakano, 2004). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die transiente JNK-Aktivierung in erster Linie Geninduktion und Inflammation vermittelt, während die andauernde JNK-Aktivierung mit der Induktion von Apoptose assoziiert ist (Chen et al., 1996; Guo et al., 1998; Deng et al., 2003; Chang et al., 2006). Die proapoptotische Wirkung der persistierenden JNK-Induktion wird dabei der Caspase-unabhängigen Spaltung des BH3-only Proteins BID in jBID, sowie der Aktivierung der E3-Ligase Itchy zugeschrieben (Deng et al., 2003; Chang et al., 2006). jBID kann die spezifische Freisetzung von Smac/Diablo aus den Mitochondrien induzieren. Dies führt dann zu einer Ablösung der Caspase-inhibierenden IAPs (inhibitor of apoptosis) von den Effektorcaspasen und somit zu einer erhöhten Apoptoserate (Deng et al., 2003). Itchy kann die proteasomale Degradation von Flip-L (Flice-inhibitory protein-long) induzieren und dadurch die TNF-vermittelte Caspase-8-Aktivierung und somit Apoptose fördern (Chang et al., 2006). Aufgrund von *in vitro* Experimenten wurde zunächst vermutet, dass die NF κ B-Zielgene A20, GADD45 β und X-linked IAP (XIAP) die andauernde JNK-Aktivierung nach TNFR1-Stimulation verhindern (Nakano, 2004). In den entsprechenden knock-out Mäusen konnte diese Annahme bisher jedoch noch nicht bestätigt werden. 2005 wurde von Kamata und Kollegen gezeigt, dass die persistierende JNK-Induktion aufgrund der oxidativen Inhibierung von JNK-inaktivierenden Phosphatasen erfolgen kann (Kamata et al., 2005). Es ist bekannt, dass der NF κ B-Signalweg nicht nur Apoptose (siehe Kapitel 1.3.1 und 1.3.2), sondern auch die Produktion von ROS (reactive oxygen species) und Nekrose durch die Induktion von ROS-neutralisierenden Enzymen, wie MnSOD (manganese superoxide dismutase) und FHC (ferritin heavy chain) verhindern kann (Wong et al., 1989; Pham et al., 2004). Des Weiteren wird die TNF-vermittelte JNK-Aktivierung zumindest zum Teil durch die JNK-aktivierenden MAP3K ASK-1, welche durch ROS aktiviert wird, vermittelt (Tobiume et al., 2001; Liu et al., 2000). Bemerkenswerterweise wird in MEF je nach Art der Sensitivierung (CHX, NF κ B-Inhibition) Apoptose, Nekrose oder beides induziert. In nekrotischen MEF wurde gezeigt, dass das persistente JNK-Signal durch ROS vermittelt wird (Sakon et al., 2003). Ob dies durch die Inhibierung von JNK-inaktivierenden Phosphatasen oder durch die ASK-1-Aktivierung geschieht, ist jedoch unklar. Das komplexe Zusammenspiel und die entsprechenden Rückkopplungsmechanismen zwischen JNK, ROS, Flip-L, NF κ B-Aktivierung, Caspasen, Apoptose und jBID sind in Abbildung 6 dargestellt.

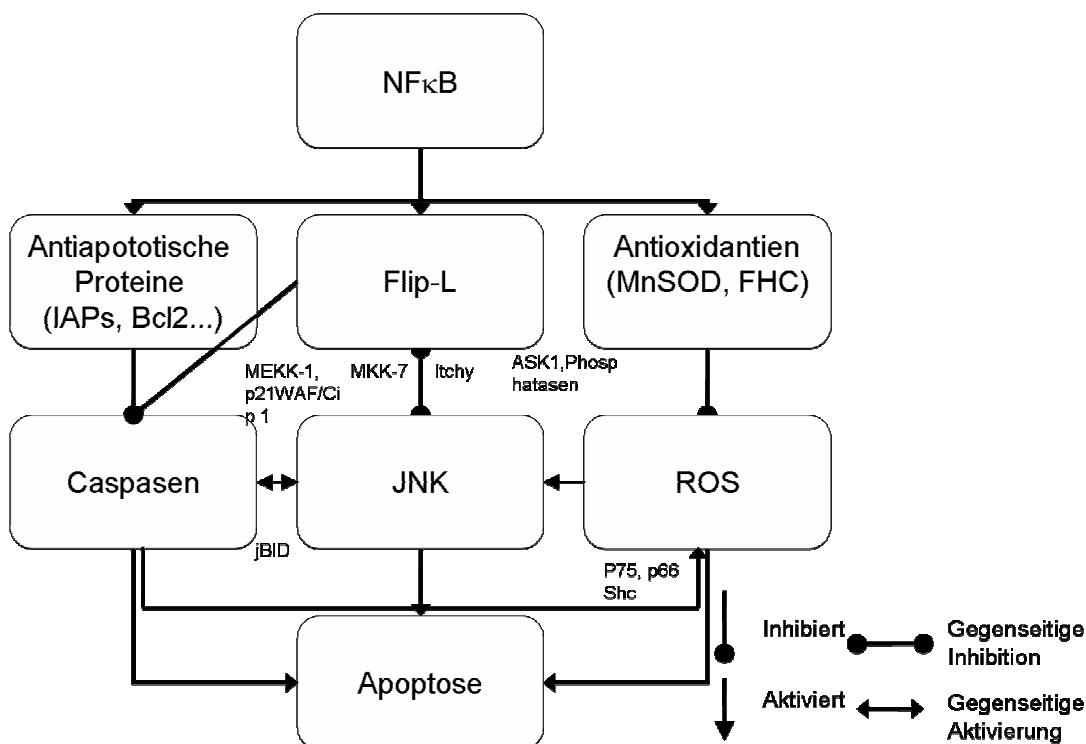


Abbildung 6: Das komplexe Zusammenspiel zwischen NFκB-Aktivierung, Apoptoseinduktion, ROS-Generierung und der TNF-induzierten andauernden JNK-Aktivierung. Nach NFκB-Induktion kann die TNF-induzierte JNK-Aktivierung durch verschiedene Mechanismen inhibiert werden. Durch die Hochregulierung antiapoptotischer Proteine (IAPs, Flip-L) wird die Prozessierung der Caspasen verhindert und somit die in Kapitel 1.3.3.2.2 beschriebenen Mechanismen der TNF-induzierten JNK-Aktivierung inhibiert. Des Weiteren kann Flip-L durch Interaktionen mit MKK-7 direkt die Aktivierung von JNK verhindern. Zudem werden durch die Induktion von Radikalfängern (Antioxidantien) die in Kapitel 1.3.3.2.1 dargestellten Signalwege der ROS-abhängigen JNK-Aktivierung inhibiert. JNK kann seinerseits durch Aktivierung der Ligase Itchy den Abbau von Flip-L induzieren und durch die Freisetzung von Smac aus den Mitochondrien die Aktivierung von Caspasen und somit Apoptose auslösen.

1.3.3.2.2 Caspase-abhängige JNK-Aktivierung

Ein Großteil der bis heute publizierten Untersuchungen zur TNF-induzierten JNK-Aktivierung wurde in nekrotischen MEF durchgeführt. Die dabei entstehenden ROS und die darauf folgende JNK-Induktion wurden dabei Caspase-unabhängig vermittelt. In den letzten Jahren zeigte sich jedoch, dass auch Caspasen eine wichtige Rolle bei der JNK-Induktion spielen können. Auf der einen Seite können Caspasen über die Spaltung bestimmter Proteine ROS generieren und somit die in Kapitel 1.3.3.2.1

beschrieben Mechanismen der JNK-Aktivierung induzieren. So kann z.B. die Effektorcaspase-3 durch Spaltung der p75-Untereinheit der mitochondrialen Elektronentransportkette die Funktion des Komplexes I des Mitochondriums zerstören (Ricci et al., 2004). Als Folge davon kommt es zu einer Anreicherung von ROS. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Freisetzung von p66 Shc nach proapoptotischen Signalen aus einem inhibitorischen Komplex zu einer ROS-Akkumulierung führt (Giorgio et al., 2005). Caspasen können durch Spaltung bestimmter Proteine aber auch Fragmente generieren, die ROS-unabhängig eine JNK-aktivierende Wirkung haben. Als Beispiele sind hier die MAP3Kinase MEKK-1 sowie das Zellzyklusprotein p21WAF/Cip 1 zu nennen (Deak et al., 1998c; Cardone et al., 1997; Ham et al., 2003). Zudem konnte in einer vor kurzem veröffentlichten Arbeit gezeigt werden, dass das antiapoptotische Protein Flip-L durch Bindung an die MAP2K MKK-7 den JNK-Signalweg direkt unterbrechen kann (Nakajima et al., 2006). Dies ist insofern bemerkenswert, da NF κ B die Flip-L-Expression induziert (Kreuz et al., 2001), die Caspase-8 Flip-L spaltet und JNK seinerseits über die Ligase Itchy den Abbau von Flip-L auslöst (Abb. 6) (Chang et al., 2006).

1.4 Der apoptotische Crosstalk von TNFR1 und TNFR2

1.4.1 Die TNF receptor associated factor (TRAF)-Familie

Die TRAF-Proteine bilden eine große Gruppe von intrazellulären Adapterproteinen, die direkt oder indirekt an viele Mitglieder der TNFR- und IL-1/Toll-like-Rezeptor-Familie binden können (Dempsey et al., 2003; Leitges et al., 2001; Wajant and Scheurich, 2001). Bis heute konnten sechs verschiedene TRAFs in Säugetierzellen (TRAF1 bis TRAF6), drei in *Drosophila melanogaster* (DTRAF1, DTRAF2, DTRAF3) (Liu et al., 1999; Grech et al., 2000) und ein TRAF Protein (ceTRAF) in *Caenorhabditis elegans* identifiziert werden (Wajant et al., 1998). Des Weiteren wurden in *Dictostelium dicoideum* (Regnier et al., 1995) und *Arabidopsis thaliana* (Zapata et al., 2000) TRAF-verwandte Proteine nachgewiesen. Alle TRAF-Proteine besitzen eine konservierte C-terminalen TRAF-Domäne, welche weiter in eine variable N-terminale- (TRAF-N) und

eine hochkonservierte C-terminale-(TRAF-C) Subdomäne unterteilt wird (Abb. 7). Die TRAF-Domäne vermittelt die Bindung an Rezeptoren, die Homo- und Heterotrimerisierung von TRAF-Proteinen, sowie die Interaktionen mit zahlreichen anderen intrazellulären Proteinen. So konnte gezeigt werden, dass die TRAF-C-Domäne die Bindung an Proteine wie TANK (TRAF family member associated NF κ B activator) (Cheng and Baltimore, 1996) und NIK (NF κ B-inducing kinase) (Malinin et al., 1997) vermittelt und die TRAF-N-Domäne die antiapoptotischen Proteine c-IAP1 und c-IAP2 binden kann (Song et al., 1997; Rothe et al., 1995). Mit Ausnahme von TRAF1 weisen alle TRAF-Proteine an ihrem N-Terminus ein Ring-Finger-Motiv auf (Saurin et al., 1996; Freemont, 2000), worauf fünf bis sieben Zink-Finger-Motive (Chung et al., 2002) folgen. Es konnte gezeigt werden, dass die Ring-Finger- und die Zink-Finger-Domänen dabei essentiell für die TRAF-vermittelte Signaltransduktion wie NF κ B- (Rothe et al., 1995; Takeuchi et al., 1996; Brink and Lodish, 1998) und JNK-Aktivierung (Dadgostar and Cheng, 1998) sind und Deletionen in diesem Bereich zu dominant-negativen Mutanten führen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass diese Bereiche entscheidend für die Funktion der TRAF-Proteine als Ubiquitin-E3-Ligasen sind (Deng et al., 2000; Chen, 2005). Da TRAF1 keine Ring- und Zink-Finger-Domäne besitzt und mit TRAF2 interagieren kann, wurde zunächst vermutet, dass TRAF1 ein negativer Regulator der TRAF2-abhängigen Signalwege ist. Tatsächlich kann TRAF1 die CD40- und IL-1-Signaltransduktion inhibieren (Fotin-Mleczek et al., 2004; Carpentier and Beyaert, 1999). Zudem proliferieren TRAF1-defiziente T-Zellen nach TNFR2-Stimulation deutlich stärker als normale T-Zellen (Tsitsikov et al., 2001). Bezüglich der TNF-vermittelten NF κ B-Aktivierung sind sowohl verstärkende als auch inhibierende Wirkungen von TRAF1 beschrieben worden (Tsitsikov et al., 2001; Schwenzler et al., 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass TRAF1 zusammen mit TRAF2 die TNF-vermittelte Caspase-8-Aktivierung verhindern kann (Speiser et al., 1997; Wang et al., 1998). Die verschiedenartigen Funktionen, die TRAF1 in der Zelle ausüben kann, liegen einerseits an der Fähigkeit dieses Proteins, die Interaktionen von TRAF2 mit den TRAF-interagierenden Rezeptoren differentiell zu regulieren. Andererseits kann TRAF1 nicht nur den NF κ B-Weg und die Apoptose direkt regulieren, sondern wird seinerseits durch diese Wege reguliert. So wird TRAF1 nach NF κ B-Induktion verstärkt exprimiert. Die Caspase-8 kann wiederum TRAF1 spezifisch spalten (Wang et al., 1998; Schwenzler et al., 1999; Fotin-Mleczek et al., 2004; Irmiler et al., 2000; Henkler et al., 2003). Das dabei entstehende Fragment wirkt dann seinerseits als genereller Inhibitor von NF κ B (Henkler et al., 2003).

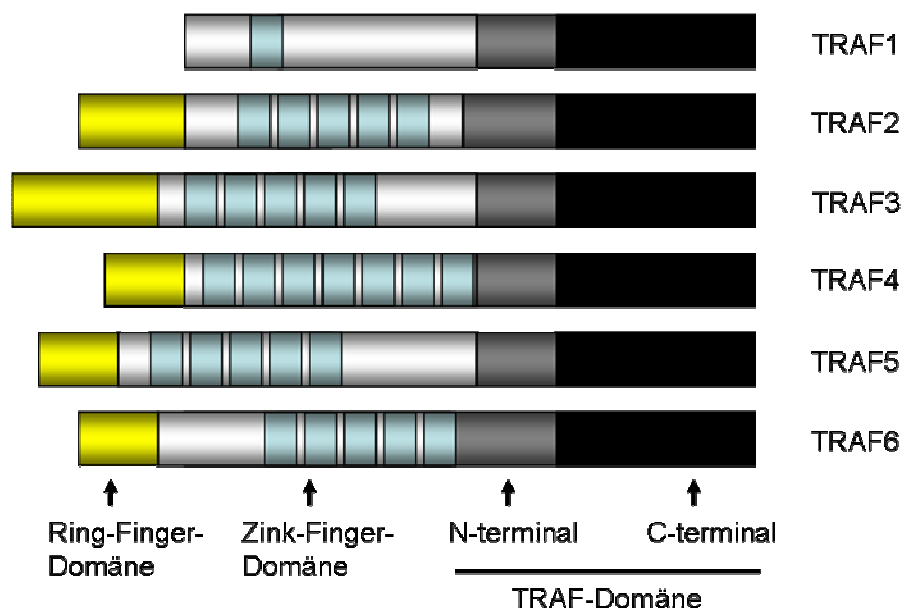


Abbildung 7: Die TRAF-Superfamilie: Schematische Darstellung der sechs humanen TRAF-Proteine. Die verschiedenen Sequenzmotive sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

1.4.2 Das TNFR1-TNFR2-Zusammenspiel

Während in den vorangegangenen Kapiteln vor allem ausführlich auf die molekularen Mechanismen der TNFR1-vermittelten NF κ B- und JNK-Aktivierung sowie der Apoptoseinduktion eingegangen worden ist, soll nun der Einfluss des TNFR2 auf diese Signalwege genauer beleuchtet werden. So wurde gefunden, dass der TNFR2 neben einer vergleichsweise schwachen NF κ B- und JNK-Aktivierung durch Kostimulation die TNFR1-vermittelte Apoptose beträchtlich verstärken kann (Abb. 8) (Fotin-Mieczek et al., 2002; Grell et al., 1999). Der TNFR2 besitzt keine Todesdomäne, kann aber über ein kurzes TRAF-interagierendes Motiv direkt mit den Mitgliedern der TRAF-Familie interagieren (Wajant et al., 2001). Obwohl eine essentielle Rolle von TRAF2 für die TNFR1-vermittelte NF κ B- und JNK-Aktivierung nachgewiesen werden konnte, ist seine Bedeutung für die TNFR2-vermittelte Aktivierung dieser Signalwege weitestgehend unklar. Allerdings kann der TNFR2 den TNFR1 über TRAF2 regulieren. So führt eine spezifische Stimulation des TNFR2 zunächst zu einer Rekrutierung von TRAF2 in *lipid rafts*. Anschließend kommt es zur proteasomalen Degradation von TRAF2 und den TRAF2-assoziierten IAP-Proteinen (Li et al., 2002; Chai et al., 2000; Wu et al., 2005;

Fotin-Mleczek et al., 2002; Wang et al., 1998). Als Folge davon kommt es nach Stimulation des TNFR1 zu einer erhöhten Apoptoseinduktion sowie einer verminderten Aktivierung von NF κ B und JNK. Bemerkenswerterweise konnten diese Effekte auch durch Vorstimulation an anderen TRAF-interagierenden Rezeptoren wie CD40 oder TWEAKR (TNF related, weak ability to induce apoptosis receptor) nachgewiesen werden (Fotin-Mleczek et al., 2002). Zusätzlich zur TRAF2-Depletion kann der TNFR2, wie auch der TNFR1, über die Induktion von endogenem mTNF wirken (Grell et al., 1999; Weingartner et al., 2002). MTNF kann dann durch Stimulation des TNFR2 mit nachfolgender TRAF2 Depletion für die TNFR1-vermittelte Apoptose sensitivieren (Weingartner et al., 2002).

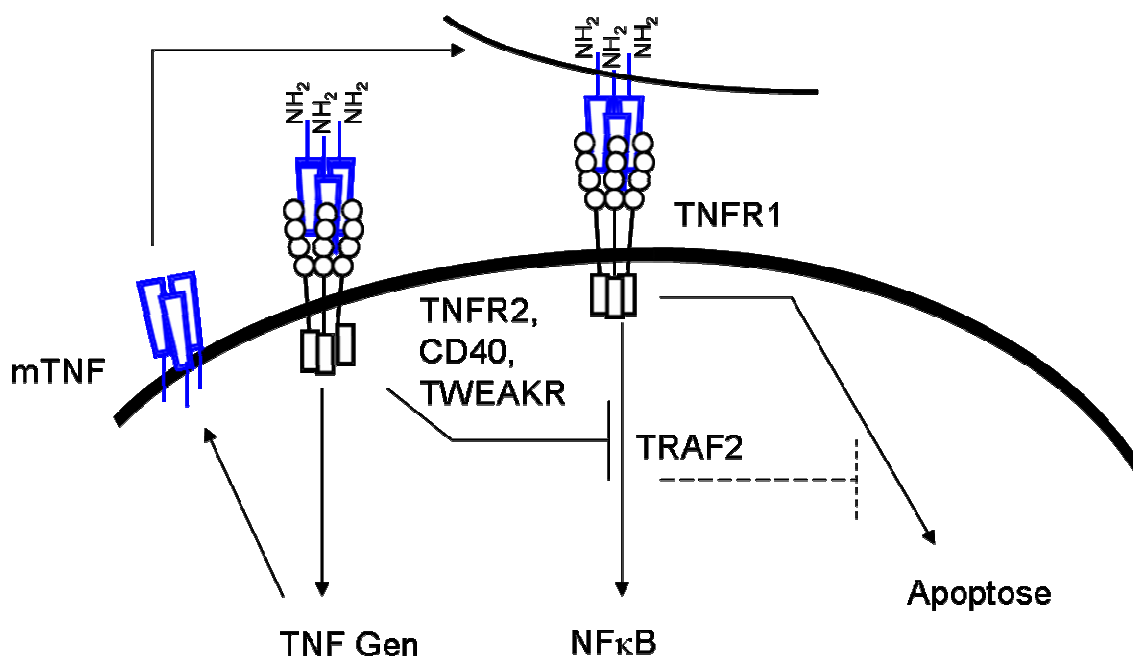


Abbildung 8: Molekulare Mechanismen des TNFR-Zusammenspiels. Der TNFR2, aber auch andere TRAF-interagierende Rezeptoren wie CD40 oder TWEAKR können die TNFR1-induzierte Apoptose verstärken sowie die NF κ B- und JNK-Induktion inhibieren. Dies geschieht sowohl durch die Depletion der TRAF2/IAP Komplexe als auch durch die Induktion von mTNF.

1.5 Ziel der Arbeit

TNF vermittelt seine biologischen Funktionen über Interaktionen mit TNFR1 und TNFR2. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der TNFR2 durch die zytosmatische Depletion von TRAF2 die Apoptoseinduktion über den TNFR1 verstärken kann. Zudem war bekannt, dass TRAF1, ein anderes Mitglied der TRAF-Familie, mit TRAF2 interagieren kann. Deshalb stand in diesem Teil der Arbeit die Rolle von TRAF1 bei der TNFR-Signaltransduktion und speziell beim Crosstalk zwischen TNFR1 und TNFR2 im Mittelpunkt.

Die wichtigsten TNF-induzierten Signalwege sind neben der Apoptoseinduktion die Aktivierung von NF κ B und JNK. Während die beiden erstgenannten Signalwege bereits sehr gut charakterisiert sind, werden die molekularen Mechanismen der TNF-vermittelten JNK-Aktivierung in der Literatur noch kontrovers diskutiert. Daher sollte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit insbesondere die Rolle der Caspasen, aber auch das Zusammenspiel der JNK-Aktivierung mit der NF κ B-Aktivierung und Apoptoseinduktion bei der TNF-induzierten Signaltransduktion untersucht werden.

2. Materialien

2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Anti-Flag mAk M2-Agarose	Sigma, Deisenhofen
APS	Sigma, Deisenhofen
BHA	Sigma, Deisenhofen
Cyclohexamid	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Roth, Karlsruhe
DMEM-Medium	PAA, Pasching
ECL-Kit	Amersham, Braunschweig
FCS	PAA, Pasching
Lipofektamine	Invitrogen, Karlsruhe
MG132	Calbiochem, Schwabach
Milchpulver	Sigma, Deisenhofen
Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schuell, Dassel
Protein G-Sepharose	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching
Phosphataseinhibitor I und II	Sigma, Deisenhofen
Proteaseinhibitorcocktail	Roche, Mannheim
RPMI 1640-Medium	PAA, Pasching
TNF	Knoll AG, Ludwigshafen
SP600125	Calbiochem, Schwabach
Sucrose	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA, Pasching
z-VAD-fmk	Bachem, Heidelberg
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Antikörper und Antiseren

Anti-Caspase-8, Maus monoklonal	Schulze-Osthoff, Universität Düsseldorf
Anti-Caspase-9, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-Caspase-3, Maus monoklonal	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
Anti-JNK, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-phospho-JNK, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-c-Jun, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-phospho-c-Jun, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-I κ B α , Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-phospho-I κ B α , Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-Cytochrom c, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-HSP60, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-MEKK-1, Maus monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Smac, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-BID, Kaninchen polyklonal	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-poly-(ADP)-ribose polymerase, Maus monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Tubulin, Maus monoklonal	Dunn Labortechnik, Ansbach,
Anti-p21WAF1/Cip 1, Maus monoklonal	Millipore, Billerica, MA, USA
Anti-TNFR1, Maus monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Anti-TNFR2, Maus monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-TRAF1, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-TRAF2, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-RIP, Maus monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-IKK1, Maus monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg
80M2 Anikörper	P. Scheurich, Institut für Zellbiologie und Immunologie, Stuttgart
Anti-Maus HRP, Kaninchen polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-Kaninchen HRP, Kaninchen polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-Kaninchen HRP, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA

2.3 Zelllinien

Die aus einem Cervix-Karzinom abgeleitete Zelllinie HeLa, die T-Zelllinie Jurkat und HEK293 Zellen (humane Nierenzelllinie) wurden von der American Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA erworben. Die TNFR2- (HeLa TNFR2) und CD40 (HeLa CD40) überexprimierenden HeLa-Populationen wurden von T. Weiss und M. Flotin-Mleczek am Institut für Zellbiologie und Immunologie Stuttgart hergestellt. Die Keratinozyten Zelllinie KB wurde von M. Kracht von der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. KB Bcl2-GFP-Zellen waren in der Arbeitsgruppe vorhanden. Die NEMO-defizienten Jurkat-Zellen wurden von S.-C. Sun von der Pennsylvania State Universität zur Verfügung gestellt. Die HaCaT-, HaCaT IKK2DN-GFP-, KB IKK2DN-GFP-Zellen sowie die amphotrophe Zelllinie Phönix waren ein Geschenk von M. Leverkus, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg. Die embryonalen Mausfibroblasten wurden von Bernd Baumann, Universität Ulm zur Verfügung gestellt.

2.4 Fusionsproteine

Die Fusionsproteine Fc-CD40L, Fc-CD95L, Fc-TNF(143N/145R) sowie Fc-TNF(32W/86T) wurden von Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Inneren Medizin, Würzburg kloniert und in HEK293-Zellen produziert.

2.5 Lösungen und Puffer

Blotpuffer	0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 20% (v/v) Methanol, pH 8,3
Coating Buffer	0,1 M Carbonat, pH 9,5
Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,05 M Tris, 0,38 M Glycin, 0,004 M SDS, pH 8,3
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	0,02 M Na-Phosphat, 0,7% NaCl, pH 7,2
PBS-T	1 x PBS, 0,05% Tween-20
PBS-T-MLK	0,02 M Tris, 8% NaCl, pH 7,6, 0,05% Tween-20, 5% Magermilch
Puffer zur Zelllyse	0,03 M Tris-HCL, pH 7,5, 1% Triton X-100, 10% Glycerol, 0,120 M NaCl
Probenpuffer (SDS-PAGE, 4fach)	8% SDS, 0,1 M DTT, 40% Glycerol, 0,2 M Tris, Bromphenolblau, pH 8,0
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	0,5 M Tris, 0,015 M SDS, pH 6,8
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M Tris, 0,015 M SDS, pH 8,8
Tris gepufferte Saline (TBS)	0,02M Tris, 8% NaCl, pH 7,6
TBS-T	0,02M Tris, 8% NaCl, pH 7,6, 0,05% Tween-20
TBS-T-MLK	1 x PBS, 0,05% Tween-20, 5% Magermilch

3. Methoden

3.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

KB-, HeLa- und Jurkat-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS kultiviert. HaCaT- und MEF-Zellen wurden in DMEM-Medium (10% FCS) unter 5% CO₂ Begasung bei 37°C gehalten. Adhärenente Zellen wurden mit Trypsin (0,025%) und EDTA (10 mM) für fünf Minuten abgelöst. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer.

3.2 Retrovirale Transfektion von HeLa TNFR2- und HeLa CD40-Zellen

Zur retroviralen Transfektion der HeLa TNFR2- und HeLa-CD40-Zellen wurde ein pEGZ Vektor verwendet, welcher neben einer Zeocin-Resistenz und einer IRES-Sequenz die cDNA von TRAF1 enthielt. Zunächst wurden, entsprechend dem Lipfektamine Herstellerprotokoll (Invitrogen), 3×10^6 Zellen der amphiotrophen virusproduzierenden Zelllinie Phönix mit 10 µg des retroviralen Vektors pEGZ-TRAF1 transfiziert. Nach siebentägiger Selektion mit 0,5 µg Zeocin wurden die Zellen zur Virusproduktion über Nacht in DMEM-Medium inkubiert. Nach Sterilfiltration der Virusüberstände (0,4 µm) wurden je 4 Milliliter Virusüberstand zu den HeLa-Zellen zugegeben und für drei Stunden bei 21°C in der Gegenwart von 1 µg/ml Polybren zentrifugiert. Nach zehntägiger Selektion mit 0,5 µg/ml Zeocin wurde die TRAF1 Expression im Western-Blot verifiziert.

3.3 Zytoxizitätsassay

Die adhärenenten Zelllinien HeLa, MEF, KB (2×10^4 /Well) wurden in einer 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die zytotoxischen Reagenzien (TNF, Fc-TNF(143N/145R), Fc-TNF(32W/86T), Fas) entweder in sequentiellen Verdünnungen oder in konstanten Konzentrationen zugegeben. In einigen Experimenten wurden die Zellen zusätzlich für eine Stunde mit Inhibitoren von Signalwegen (BHA, SP600125, z-VAD-fmk) oder CHX vorstimuliert. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde nach weiteren 16 Stunden mittels Kristallviolett-Färbung ermittelt. Dazu wurden der Überstand zunächst verworfen und die Zellen für 15 Minuten in 100 µl Kristallviolett-Lösung (0,5% Kristallviolett, 20% Methanol) inkubiert. Danach wurden die 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten mehrmals mit Wasser gewaschen und für eine Stunde an der Luft getrocknet. Schließlich wurde das Kristallviolett in 200 µl Methanol per Well gelöst und die Platten im ELISA-Reader (Anthos Lucy 2) bei 590 nm analysiert. Der Zytoxizitätsassay von Suspensionszellen (Jurkat) erfolgte durch eine MTT-Färbung. Hierfür wurden 2×10^4 /Well Zellen pro Well in einer 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach Stimulation wurde nach 16 Stunden 10 µl der MTT Lösung (10 mg/ml) in jedes Well gegeben und die Zellen für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellyse mit 90 µl/Well MTT-Lysispuffer (1 Teil Dimethylformamid, 1 Teil H₂O, 15% SDS, pH 4,7 mit Essigsäure) für weitere 16 Stunden durchgeführt. Die Mikrotiterplatten wurden daraufhin im ELISA-Reader bei 570 nm analysiert.

3.4 Bestimmung der IL-8-Produktion

Zunächst wurden 2×10^4 HeLa-CD40- bzw. HeLa TNFR2-Zellen pro Well in einer 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen für sechs Stunden mit den angegebenen Konzentrationen Fc-CD40L oder TNF stimuliert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die IL-8-Mengen entsprechend dem Herstellerprotokoll des OptEIA IL-8-ELISA-Kit (Pharmingen, San Diego, USA) bestimmt.

3.5 Herstellung von Zelllysaten

Die Zelllysate zur Western-Blot Analyse für phospho-spezifische Antikörper wurden mit 4x Ladepuffer (8% SDS, 0,1 M Dithiothreitol, 40% Glycerol, 0,2 M Tris pH 8,0) hergestellt. Zusätzlich wurden kurz vor Versuchsbeginn die Phosphataseinhibitoren I und II zum Lysispuffer zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt und zusammen mit kaltem PBS in ein 15 ml Falcon überführt. Nach Zentrifugation (2000 rpm, 3 Minuten) wurden die Zellen direkt in 100 μ l/1.5x10⁶ Zellen 4x Ladepuffer lysiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 Sekunden sonifiziert, bei 96°C für 5 Minuten erhitzt und schließlich bei 13000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Zelllysate für die nicht phospho-spezifischen Antikörper und die Immunpräzipitationen wurden in Triton X-100 Lysispuffer (0,03 M Tris-HCL pH 7,4, 0,120 M NaCL, 10% Glycerol, 1% Triton X-100) zusammen mit einem Proteaseninhibitor hergestellt. Dazu wurde das Zellpellet in 100 μ l/5x10⁶ Zellen Triton X-100 Lysispuffer resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zwei sequentiellen Zentrifugationen (5000 rpm, 5 Minuten, 4°C und 14000 rpm, 20 Minuten, 4°C) wurde der Überstand mit 4x Ladepuffer vereinigt und im Western-Blot analysiert.

3.6 Ko-immunpräzipitationen

Die Ko-immunpräzipitationen der TNFR1- und TNFR2-Signalkomplexe wurden mit Fc-TNF(32W/86T), Flag-TNF(32W/86T) sowie Fc-TNF(143N/145R) durchgeführt. Pro Gruppe wurde jeweils eine konfluente (20x10⁶ Zellen) 175-cm²-Zellkulturflasche mit HeLa-Zellen verwendet. Zunächst wurden die Flaschen in zehn Millilitern Medium für 60 Minuten zusammen mit 400 ng/ml Fc-TNF(32W/86T), Flag-TNF(32W/86T) oder einer Mischung aus 600 ng/ml Fc-TNF(143N/145R) und 1 μ g/ml 80M2 auf Eis vorinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für die in den Abbildungen angegebenen Zeiten bei 37°C im Inkubator inkubiert. Um die ungebundenen Liganden zu entfernen wurden die Flaschen mehrmals mit kaltem PBS gewaschen und schließlich in Triton X-100 Lysispuffer (0,03 M Tris-HCL pH 7,4, 0,120 M NaCL, 10% Glycerol, 1% Triton X-100) zusammen mit einem Proteaseinhibitor lysiert. Die Immunpräzipitation der TNFR-Komplexe erfolgte mit Protein G-Sepharose Beads (40 μ l) oder M2-Agarose Beads (30

µl) bei 4°C für 16 Stunden. Als Kontrolle wurden Lysate von unstimulierten Zellen zusammen mit 60 ng von Flag-TNF(32W/86T, Fc-TNF(32W/86T) oder einer Mischung aus 80 ng Fc-TNF(143N/145R) und 100 ng 80M2 immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden fünfmal mit kaltem Lysispuffer gewaschen und zusammen mit 4x Ladebuffer bei 75°C für zehn Minuten erhitzt. Die Analyse der TNFR-Signalkomplexe und der Gesamtzelllysate erfolgte durch Western-Blot Analysen.

3.7 Isolation von lipid rafts

Zunächst wurden 20×10^6 Zellen, wie in Kapitel 3.6 beschrieben, stimuliert, geerntet und in 200 µl serum-freien RPMI-Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zellyse (0,8% Triton X-100, 0,025 M Tris pH 7,5, 0,150 M NaCl, 0,005 M EDTA, 0,001 M Pefabloc, 0,005 M Iodacetamid, 0,001 M Na_3VO_4 , 0,001 M NaF) auf Eis für 20 Minuten. Danach wurden die Lysate in 400 µl Sucroselösung (80% Sucrose in TNE-Puffer) aufgenommen und in Allomerröhrchen (Beranek Laborgeräte, Weinheim) überführt. Die Lysat/Sucrose-mischungen wurden daraufhin mit 2,8 Millilitern einer 30 prozentigen Sucroselösung in TNE-Puffer und 400 µl TNE Puffer (0,025 M Tris pH 7,5, 0,150 M NaCl, 0,005 M EDTA, 0,001 M Pefabloc, 0,005 M Iodacetamid, 0,001 M Na_3VO_4 , 0,001 M NaF) überschichtet. Die Fraktionierung erfolgte durch Zentrifugation für 22 Stunden bei 50000 rpm und 4°C in einem Beckmann SKW60 Rotor. Von jeder Probe wurden vier Fraktionen abgenommen und analysiert. Die oberste Fraktion (Fraktion 1) enthielt die Detergenz-unlöslichen Membranbestandteile einschließlich den *lipid rafts*.

3.8 Zelluläre Fraktionierung

Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und in 5×10^6 Zellen pro Milliliter Puffer (0,1 M KCl, 0,0025 M MgCl_2 , 0,25 M Sucrose, 0,020 M HEPES/KOH pH 7,5, 0,001 M Dithiothreitol, 5 µg/ml Cytochalasin B, 50 µg/ml Cyclohexamid, 0,05% Digitonin) zusammen mit einem Proteaseinhibitorcocktail resuspendiert. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Auftrennung in

Pellet- (Membranbestandteile, Mitochondrien) und zytoplasmatische-Fraktion durch Zentrifugation (10000 rpm, 10 Minuten, 4°C). Die beiden Fraktionen wurden, wie unter Kapitel 3.5 beschrieben, in Triton X-100 Lysispuffer lysiert und im Western-Blot analysiert. Als Marker für die Mitochondrien wurde ein Antikörper gegen Hsp60 verwendet, als Marker für die zytoplasmatische Fraktion diente anti-Tubulin.

3.9 Western-Blot

3.9.1 SDS-PAGE

Die Zellysate wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Zur Herstellung des Trenngels wurde eine Trenngellösung (0,374 M Tris pH 8,8, 0,0035 M SDS, 0,1% APS) mit verschiedenen Konzentrationen Acrylamid (8%, 10%, 12%, 13,5%) verwendet. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von TEMED (0,1%) gestartet. Daraufhin wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet (6% Polyacrylamid in 0,123 M Tris pH 6,8, 0,00375 M SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED) und der Kamm vor der Auspolymerisation eingesetzt. Anschließend wurde der Kamm entfernt und die Proteinproben auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 90 Minuten bei 90 bis 130 Volt.

3.9.2 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose

Der Transfer der Proteine erfolgte in einer horizontalen Blotkammer (Pegulab, Erlangen). Die Nitrozellulosemembran wurde in Blotpuffer getränkt und in folgender Anordnung auf die Blotkammer gelegt: Anode/ 2 Blatt Whatman-Papier/ Nitrozellulose/ Gel/ 2 Blatt Whatman-Papier/ Kathode. Das Blotting erfolgte je nach Proteingröße für 90 bis 120 Minuten bei Raumtemperatur und einer Stromstärke von 1,5 mA je cm² Gelfläche.

3.9.3 Immunfärbung

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt: Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran zunächst für eine bis drei Stunden bei Raumtemperatur in Blockpuffer (PBST-MLK oder TBST-MLK) geschwenkt und dann entweder über Nacht bei 4°C oder bei Raumtemperatur für zwei Stunden mit dem ersten Antikörper in PBST oder TBST inkubiert. Nach dem Waschen der Membran (3x5 Minuten mit PBST bzw. TBST) erfolgte bei Raumtemperatur eine einstündige Inkubation mit einem zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörper in PBST oder TBST-MLK. Anschließend wurde die Membran erneut, wie oben beschrieben, gewaschen und die Nachweisreaktion unter Verwendung des ECL-Systems durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Die Rolle von TRAF1 beim TNFR-Crosstalk

4.1.1 Die TNFR2-induzierte TRAF2-Depletion reguliert die Zusammensetzung des TNFR1-Signalkomplexes

In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass die TNFR2-induzierte TRAF2-Depletion zu einer Verstärkung der TNFR1-vermittelten Apoptose und einer verminderten Aktivierung von NF κ B und JNK führt (Li et al., 2002; Chai et al., 2000; Wu et al., 2005; Fotin-Mleczek et al., 2002; Wang et al., 1998). Um diesen Befund zu bestätigen, wurden HeLa-Transfektanten benutzt, die den TNFR2 stabil überexprimieren (HeLa TNFR2) (Weiss et al., 1997). Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit auf bereits funktionell charakterisierte Flag- und Fc-getaggte TNF-Mutanten zurückgegriffen, die spezifisch an TNFR1 (Fc-TNF(32W/86T) = 60Fc; Flag-TNF(32W/86T) = 60Flag) bzw. TNFR2 (Fc-TNF(143N/145R) = 80Fc) binden (Warnke, unveröffentlicht). Die Rezeptorselektivität der TNF-Mutanten wurde dabei durch die Einführung bestimmter Punktmutationen erreicht (TNFR2-spezifisch: 143N/145R; TNFR1-spezifisch: 32W/86T) (Loetscher et al., 1993).

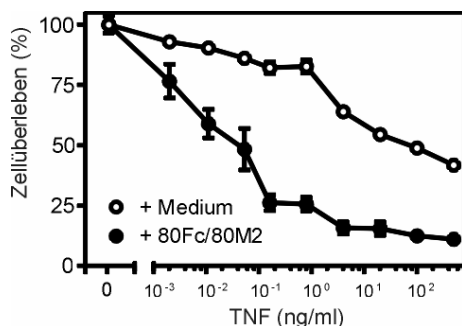


Abbildung 9: Vorstimulation am TNFR2 führt zu einer Verstärkung der TNFR1-induzierten Apoptose. Zunächst wurden HeLa TNFR2-Zellen entweder mit einer Mischung aus der TNFR2-spezifischen TNF-Mutante Fc-TNF(32W/86T) (600 ng/ml) und dem TNFR2-spezifischen mAk 80M2 (1 µg/ml) für sechs Stunden vorstimuliert oder unbehandelt gelassen. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen Fc-TNF(32W/86T) in Gegenwart von 2,5 µg/ml CHX inkubiert. Die Vitalität der Zellen wurde nach weiteren 18 Stunden mittels Kristallviolettffärbung ermittelt.

Um die Bioaktivität des löslichen TNFR2-spezifischen TNF-Fc-Fusionsproteins Fc-TNF(143N/145R) zu steigern (siehe Kapitel 1.2), wurde zusätzlich der mAk 80M2 eingesetzt. Der Antikörper kann auf bisher unverstandene Weise die Aktivität von sTNF am TNFR2 verstärken (Grell et al., 1998).

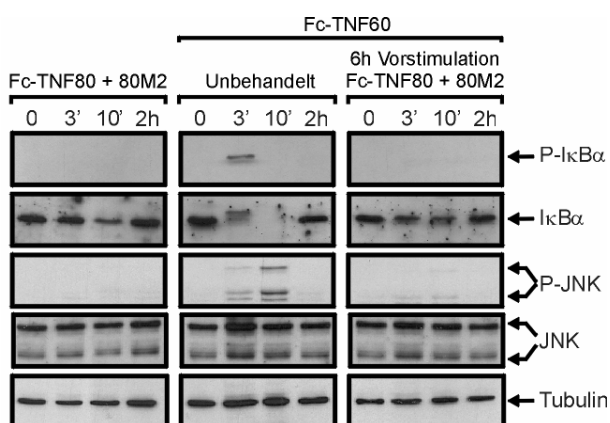


Abbildung 10: Vorstimulation des TNFR2 führt zu einer verminderten TNFR1-induzierten Aktivierung von NFκB und JNK. HeLa TNFR2-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit Fc-TNF(143N/145R) (600 ng/ml) und dem mAk 80M2 (1 µg/ml) sowie Fc-TNF(32W/86T) (400 ng/ml) stimuliert. Um die Aktivierung des NFκB- und JNK-Signalweges nachzuweisen, wurden Zelllysate für Western-Blot Analysen angefertigt und mit Antikörpern für phospho-JNK, der aktiven Form von JNK sowie phospho-IκBα als Marker für die Aktivierung des IKK-Komplexes und IκBα, um die Degradation dieses Proteins zu verfolgen, untersucht.

Wie erwartet konnte zunächst festgestellt werden, dass der TNFR1 den NF κ B- und JNK-Signalweg deutlich stärker aktiviert als der TNFR2 (Abb. 10). Darüber hinaus konnte, wie in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt, nach Vorstimulation am TNFR2 sowohl die in der Literatur beschriebene erhöhte TNFR1-vermittelte Apoptoserate, als auch die verminderte Aktivierung von JNK und NF κ B reproduziert werden (siehe Kapitel 1.4.2). Wie bereits erwähnt, wird die TNFR2-vermittelte Depletion von TRAF2, welche für die TNFR1-induzierte Aktivierung von JNK und NF κ B nötig ist, als Ursache für diese Effekte angesehen (Li et al., 2002; Wu et al., 2005; Fotin-Mleczek et al., 2002). Da TRAF2 in den Zellen häufig um den Faktor 100 höher exprimiert wird als der TNFR1 war bisher allerdings unklar, ob die TNFR2-induzierte Reduktion der zytoplasmatischen TRAF2-Expression ausreicht, um die TNFR1-TRAF2-Stöchiometrie im TNFR1-Komplex zu beeinflussen. Um dies zu untersuchen, wurden im Folgenden Koimmunpräzipitationen durchgeführt (Abb. 11). Dazu wurde der TNFR1-Signalkomplex sowohl in TNFR2-vorstimulierten als auch in unstimulierten HeLa TNFR2-Zellen analysiert. Hierzu wurden zunächst HeLa TNFR2-Zellen für sechs Stunden mit einer Mischung aus 600 ng/ml des Fc-TNF(143N/145R) und dem mAk 80M2 (1 μ g/ml) spezifisch über den TNFR2 stimuliert.

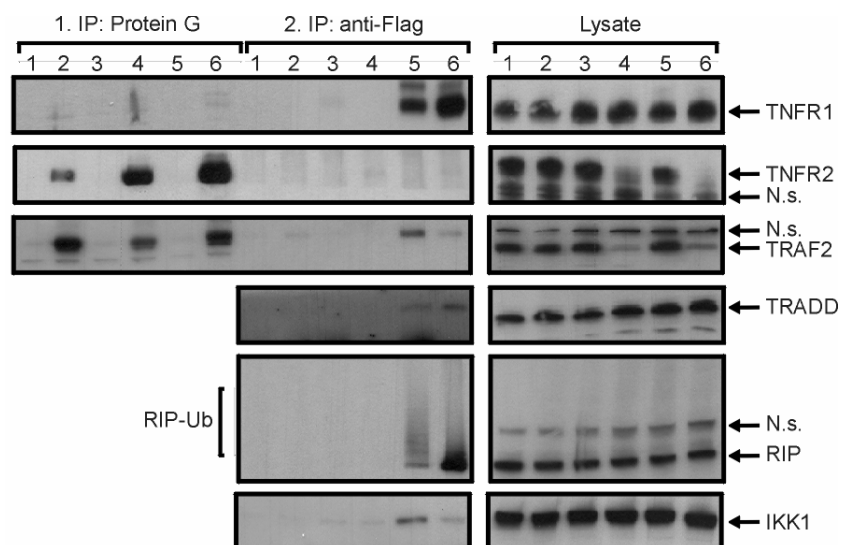


Abbildung 11: Vorstimulation des TNFR2 verändert den Aufbau des TNFR1-Signalkomplexes. HeLa TNFR2-Zellen wurden spezifisch für sechs Stunden mit einer Mischung aus 600 ng/ml des Fc-TNF(143N/145R) und dem mAk 80M2 (1 µg/ml) stimuliert (Spur vier und sechs). Eine dieser TNFR2-stimulierten Gruppen (Spur sechs) und unbehandelte Zellen wurden im Folgenden für 20 Minuten mit 400 ng/ml des TNFR1-spezifischen Liganden Flag-TNF(32W/86T) inkubiert (Spur fünf). Die TNFR2- und TNFR1-Komplexe wurden nacheinander mit Protein G-Sepharose und anti-Flag mAk M2-Agarose isoliert. Anschließend wurden die Immunpräzipitate und Gesamtzelllysate mit den angegebenen Antikörpern mittels Western-Blot analysiert. Unspezifische Banden wurden als N.s. markiert. Zelllysate von unbehandelten Zellen versetzt mit Puffer (Spur eins) oder einer Mischung aus 50 ng Fc-TNF(143N/145R) und 100 ng mAk 80M2 (Spur zwei) oder 60 ng Flag-TNF(32W/86T) (Spur drei) wurden als Kontrollgruppen immunpräzipitiert.

Anschließend wurde der TNFR1 für weitere 20 Minuten mit der TNF-Mutante Flag-TNF(32W/86) aktiviert. Um die TNFR1- und TNFR2-Komplexe aus der gleichen Probe analysieren zu können, wurde eine sequentielle Immunpräzipitation durchgeführt. Dabei wurde zunächst der TNFR2-Komplex über das Fc-Motiv von Fc-TNF(143N/145R) mit Protein G-Sepharose immunpräzipitiert. Daraufhin wurde der TNFR1-Komplex mittels des Flag-tag von Flag-TNF(32W/86T) und anti-Flag mAk M2-Agarose aufgereinigt. Es zeigte sich, dass es nach TNFR2-Stimulation zu einer deutlichen Abnahme von TRAF2 im Zytoplasma und im TNFR1-Komplex kam. Überdies wurden weniger Modifikationen von RIP, welche essentiell für die TNFR1-vermittelte Aktivierung von NFκB sind (Legler et al., 2003; Park et al., 2004; Li et al., 2006), und eine Abnahme von IKK1 am TNFR1-Komplex nach Vorstimulation festgestellt. TRADD und TNFR1 wurden hingegen in beiden zu vergleichenden Gruppen in ähnlicher Menge immunpräzipitiert. Dies lässt den Schluss zu, dass die TNFR2-induzierte TRAF2-Depletion sowohl die Funktion als auch die Bildung des

TNFR1-Komplexes unterhalb von TRADD beeinflusst. Der Befund, dass es nach Vorstimulation am TNFR2 neben einer Reduktion von TRAF2 und IKK1 am TNFR1 auch zu geringeren RIP-Modifikationen kommt, steht somit im Einklang mit der verminderten NF κ B-Aktivierung über den TNFR1 nach Vorstimulation des TNFR2.

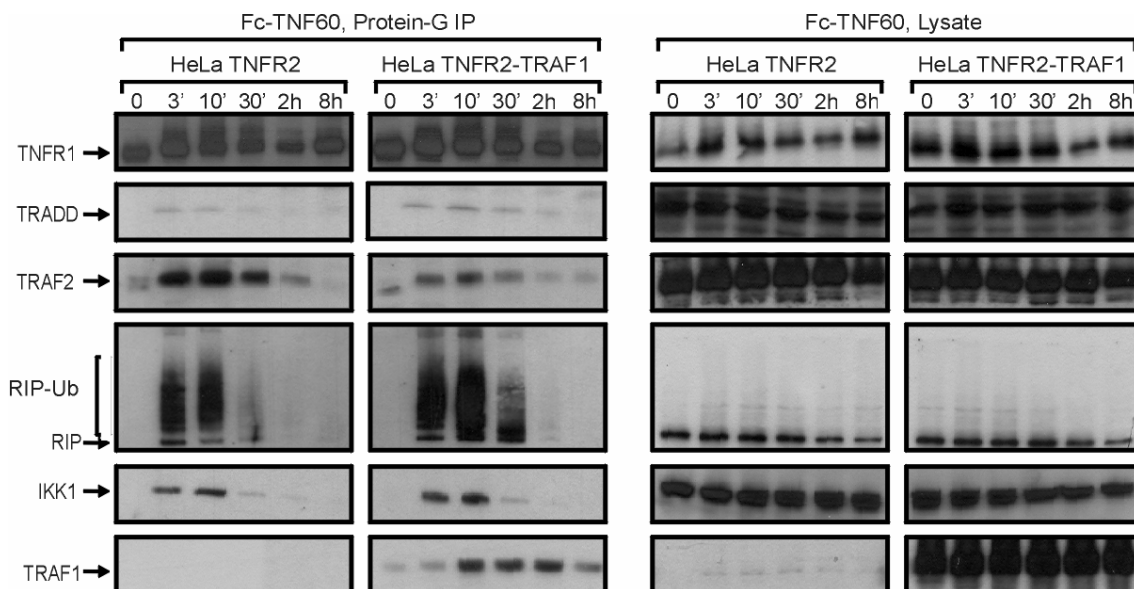


Abbildung 12: TRAF1 wird an den TNFR1 rekrutiert, ohne die Modifikationen von RIP und die IKK1-Rekrutierung zu beeinflussen. HeLa TNFR2-Zellen, die entweder mit dem leeren retroviralen Expressionsvektor pEGZ oder mit dem TRAF1-kodierenden pEGZ stabil transfiziert waren, wurden für die angegebenen Zeiten mit 400 ng/ml Fc-TNF(32W/86T) stimuliert und mit Protein G-Sepharose immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate und die entsprechenden Lysate wurden mittels Western-Blot Analyse auf die Präsenz der angegebenen Proteine untersucht. Als Kontrollgruppe (Zeitpunkt null) wurden Zelllysate von unbehandelten Zellen versetzt mit 60 ng Fc-TNF(32W/86T) immunpräzipitiert.

4.1.2 TRAF1 reguliert TNF-induzierte zelluläre Effekte

Es ist bekannt, dass TRAF1 mit TRAF2 interagieren kann (Wajant et al., 2003). Daher stellte sich die Frage, wie TRAF1 die in Kapitel 4.1.1 untersuchten Signalwege von TNFR1 und TNFR2 sowie deren Kooperation beeinflussen kann. In unbehandelten HeLa TNFR2-Zellen wird TRAF1 nur sehr schwach exprimiert, wohingegen es nach NF κ B-Aktivierung zu einer starken Induktion von TRAF1 kommt (Schwenzer et al., 1999).

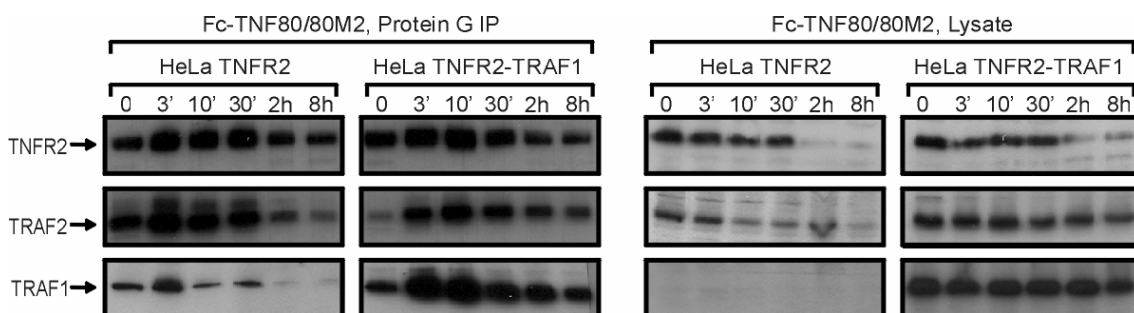


Abbildung 13: TRAF1 wird an den TNFR2 rekrutiert. HeLa TNFR2- und HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 600 ng/ml Fc-TNF(143N/145R) und 1 μ g/ml mAK 80M2 stimuliert und mit Protein G-Sepharose immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate und die entsprechenden Lysate wurden anschließend mittels Western-Blot Analyse auf die Anwesenheit der angegebenen Proteine untersucht. Als Kontrollgruppe (Zeitpunkt null) wurden Zelllysate von unbehandelten Zellen versetzt mit 50 ng Fc-TNF(143N/145R) und 100 ng mAK 80M2 immunpräzipitiert.

Es ist daher anzunehmen, dass TRAF1 seine regulatorischen Funktionen insbesondere nach NF κ B-Induktion ausübt. Da nach NF κ B-Aktivierung neben TRAF1 auch die Expression einer Vielzahl anderer Proteine induziert wird, wurden, um die Funktionen von TRAF1 auf die TNFR-Signaltransduktion gezielt untersuchen zu können, stabil überexprimierende HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen (siehe Kapitel 3.2) hergestellt. In diesen Zellen wurden zunächst sowohl der TNFR1-Signalkomplex mittels Immunpräzipitation als auch die Aktivierung der wichtigsten TNFR1-induzierten Signalwege (JNK, NF κ B) durch Western-Blot Analysen und ELISA Experimente untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass in den HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen TRAF1 an den TNFR1 rekrutiert wird, ohne die Modifikationen von RIP oder die IKK1-Rekrutierung zu stören (Abb. 12). Allerdings wurde, verglichen mit den HeLa TNFR2-Zellen, eine geringere Menge von TRAF2 am TNFR1 gefunden. Dies hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die TNFR1-induzierte JNK- und I κ B α -

Phosphorylierung (Abb. 14A). Auch die TNFR1-induzierte Produktion von IL-8, einem gut charakterisierten NF κ B-regulierten Chemokin, welches sich gut für den Nachweis der TNF-induzierten NF κ B-Aktivierung eignet, unterschied sich zwischen den HeLa TNFR2-TRAF1- und HeLa TNFR2-Zellen nur marginal (Daten nicht gezeigt).

Da der TNFR2 mittels eines TRAF-interagierenden Motivs ebenfalls mit TRAF2 interagieren kann, wurde im Folgenden, analog zum TNFR1, der Einfluss von TRAF1 auf die TNFR2-Signaltransduktion untersucht. Wie in Abbildung 13 gezeigt ist, wird TRAF1 ebenfalls sehr effizient an den TNFR2 rekrutiert.

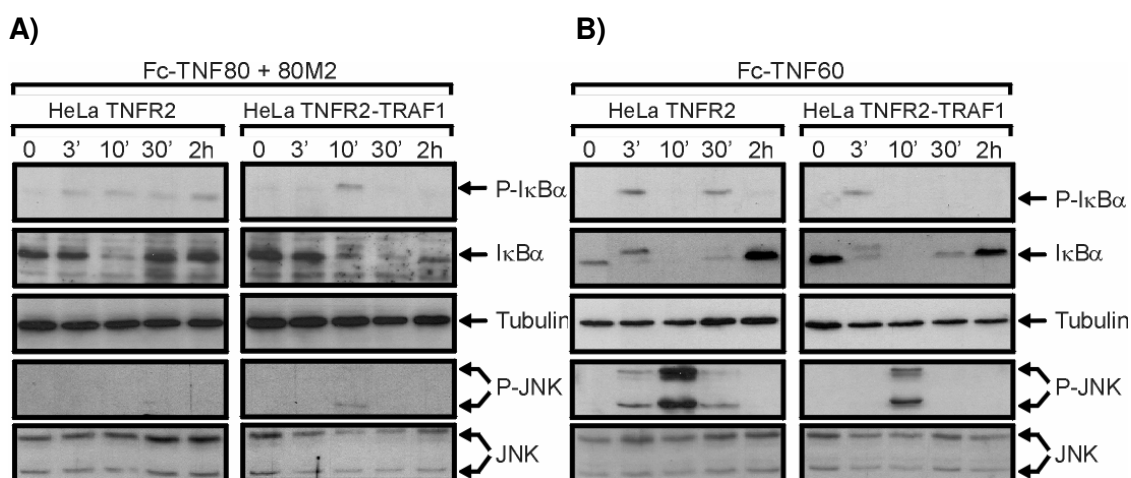


Abbildung 14: TRAF1 hat keinen wesentlichen Einfluss auf die JNK- und I κ B α -Phosphorylierung nach TNFR1- und TNFR2-Stimulation. HeLa TNFR2- und HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit **A)** 400 ng/ml Fc-TNF(32W/86T) oder **B)** 600 ng/ml Fc-TNF(143N/145R) und 1 μ g/ml mAK 80M2 stimuliert und lysiert. Anschließend wurden die JNK- und NF κ B-Aktivierung mittels Western-Blot Analyse und Antikörpern für anti-JNK, anti-phospho-JNK, anti-I κ B α und anti-phospho-I κ B α nachgewiesen.

Während bezüglich der TNFR2-induzierten JNK- und I κ B α -Phosphorylierung zwischen den HeLa TNFR2-TRAF1- und den HeLa TNFR2-Zellen keine signifikanten Unterschiede erkennbar waren (Abb. 14B), war die TNFR2-vermittelte IL-8-Produktion (Abb. 15) in den HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen deutlich erhöht.

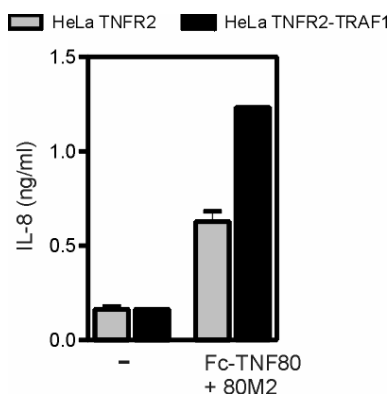


Abbildung 15: TRAF1 verstärkt die TNFR2-vermittelte IL-8-Produktion. HeLa TNFR2- und HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen wurden für sechs Stunden mit 600 ng/ml Fc-TNF(143N/145R) und 1 µg/ml mAK 80M2 stimuliert oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurde die Menge des produzierten IL-8 im ELISA bestimmt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass TRAF1 an beide TNFR rekrutiert wird. Zudem verstärkt TRAF1 die TNFR2-vermittelte IL-8-Produktion, wohingegen es auf die TNFR1-vermittelten Signalwege keinen Einfluss ausübt.

4.1.3 TRAF1 verhindert die TRAF2-Degradation und blockiert die TNFR2-vermittelte Inhibition der TNFR1-Signaltransduktion

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass TRAF1 die TNFR2-induzierte IL-8-Produktion verstärken kann, aber keinen Einfluss auf die TNFR1-induzierte Signaltransduktion ausübt. Die Vorstimulation am TNFR2 verstärkt, wie in Kapitel 4.1.1 gezeigt, durch die Depletion von TRAF2 die TNFR1-vermittelte Apoptose und inhibiert die TNFR1-induzierte JNK- und NFκB-Aktivierung. Es stellte sich daher die Frage, ob TRAF1 in dieses Zusammenspiel der beiden TNFR eingreift. Es zeigte sich, dass die TNFR2-vermittelte Verstärkung der TNFR1-induzierten Apoptose in den TRAF1-exprimierenden Zellen deutlich reduziert war (Abb. 16) und die TNFR1-Signalkomplexe der TNFR2-vorstimulierten Zellen spezifische RIP-Modifikationen aufwiesen (Abb. 17).

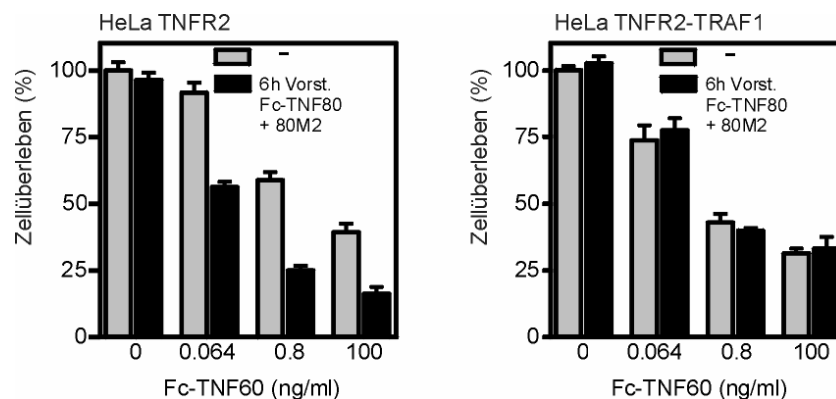


Abbildung 16: TRAF1 inhibiert die TNFR2-abhängige Verstärkung der TNFR1-vermittelten Apoptose. HeLa TNFR2- und HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen wurden entweder mit einer Mischung aus 600 ng/ml Fc-TNF(143N/145R) und 1 µg/ml mAK 80M2 für sechs Stunden vorstimuliert oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen Fc-TNF(32W/86T) in Gegenwart von 2,5 µg/ml CHX inkubiert. Das Zellüberleben wurde nach weiteren 18 Stunden mittels Kristallviolett färbung bestimmt.

Dennoch wurde auch in den HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen nach Vorstimulation des TNFR2 eine Abnahme von TRAF2 und IKK1 im TNFR1-Signalkomplex gefunden. Die TNFR2-induzierte TRAF2-Depletion und die Inhibition der TNFR1-vermittelten JNK- und NFκB-Aktivierung waren hingegen in den HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen deutlich reduziert (Abb. 18). Auch die TNFR2-vermittelte Hemmung der TNFR1-induzierten IL-8-Produktion, die zur Inhibition der NFκB-Aktivierung passt, war in den HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen aufgehoben (Abb. 19). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die TRAF2-Translokation in *lipid rafts* (Abb. 20), sowie die anschließende TRAF2-Degradation in den HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen blockiert war (Abb. 21). Bemerkenswerterweise wurde auch der TNFR2 nach Aktivierung herunterreguliert. Während die TNFR2-induzierte TRAF2-Depletion in den TNFR2-TRAF1-Zellen inhibiert war, war die Abnahme des TNFR2 nicht blockiert. Die TNFR2-induzierte TRAF2-Depletion konnte erwartungsgemäß durch den Proteasomeninhibitor Mg132 in den HeLa TNFR2 Zellen geblockt werden, wohingegen die TNFR2-Abnahme durch diese Behandlung nahezu unbeeinflusst blieb. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass TRAF1 den TNFR1 vom Einfluss des TNFR2 dadurch befreit, dass die TNFR2-induzierte proteasomale TRAF2-Degradation verhindert wird.

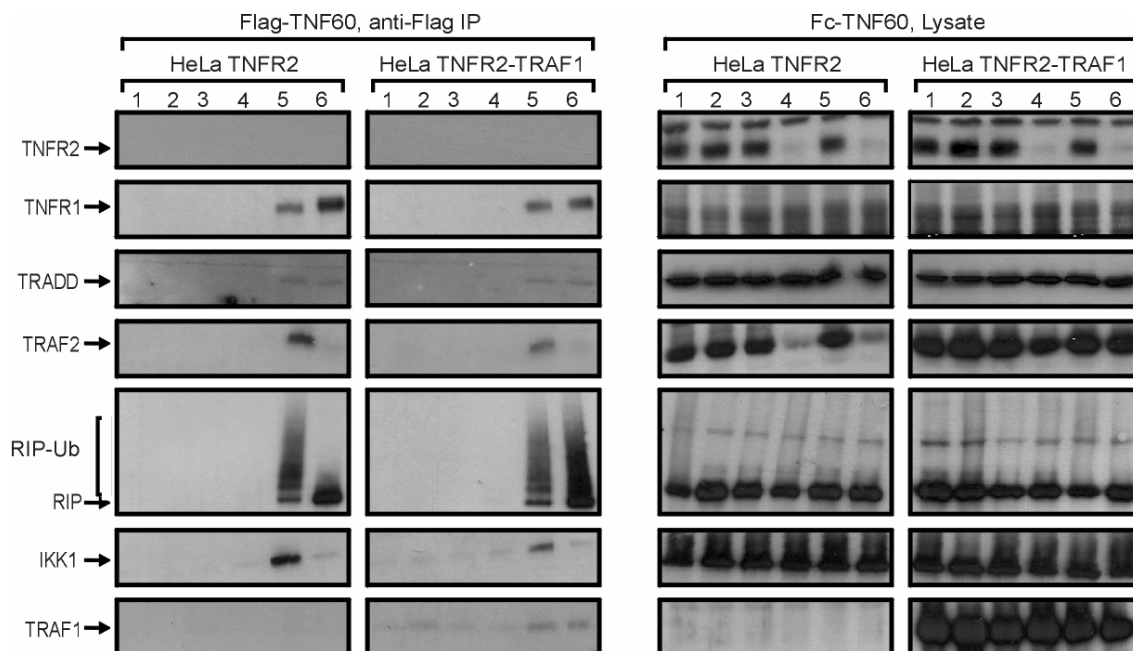


Abbildung 17: TRAF1 modifiziert den TNFR1-Signalkomplex nach TNFR2-Stimulation. HeLa TNFR2- und HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen wurden für sechs Stunden mit einer Mischung aus 600 ng/ml Fc-TNF(143N/145R) und dem mAk 80M2 (1 µg/ml) stimuliert (Spur vier und sechs). Eine dieser TNFR2-stimulierten Gruppen (Spur sechs) und unbehandelte Zellen (Spur fünf) wurden dann für fünf Minuten mit 400 ng/ml Flag-TNF(32W/86T) inkubiert. Die TNFR1-Komplexe wurden mit anti-Flag mAk M2-Agarose isoliert und die Immunpräzipitate und Gesamtzelllysate mittels Western-Blot auf die Präsenz der angegebenen Proteine untersucht. Zelllysate von unbehandelten Zellen versetzt mit Puffer (Spur eins) oder einer Mischung aus 50 ng Fc-TNF(143N/145R) und 100 ng mAk 80M2 (Spur zwei) oder 60 ng Flag-TNF(32W/86T) (Spur drei) wurden als Kontrollgruppen immunpräzipitiert.

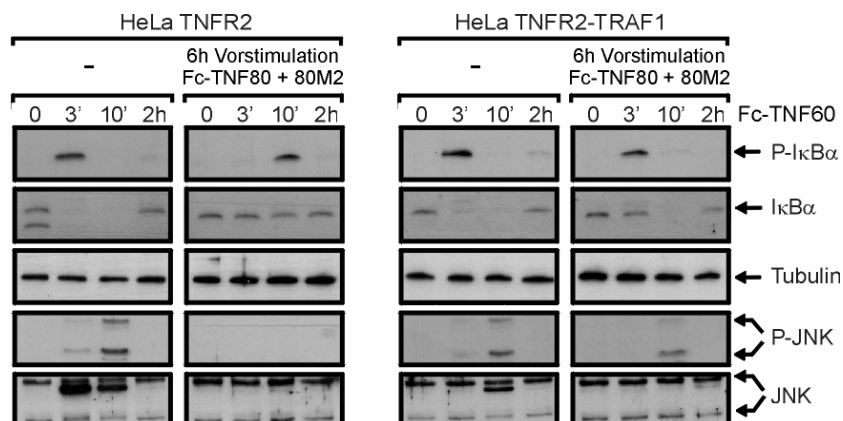


Abbildung 18: TRAF1-Expression verhindert die TNFR2-abhängige Inhibition der TNFR1-vermittelten JNK- und NFκB-Aktivierung. Um die TNFR1-induzierte Aktivierung des NFκB- und JNK-Signalweges nach TNFR2-Vorstimulation zu untersuchen, wurden HeLa TNFR2- und HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen für sechs Stunden mit einer Mischung aus 600 ng/ml Fc-TNF(143N/145R) und mAk 80M2 (1 µg/ml) vorstimuliert oder blieben unbehandelt und dann für die angegebenen Zeiten mit 400 ng/ml Fc-TNF(32W/86T) stimuliert. Die Zellysate wurden anschließend mit Antikörpern für phospho-JNK, JNK, phospho-IκBα sowie IκBα mittels Western-Blot analysiert.

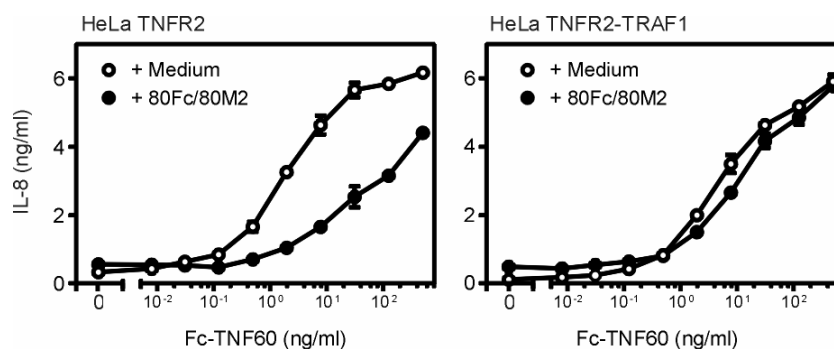


Abbildung 19: TRAF1 hebt die TNFR2-vermittelte Hemmung der TNFR1-induzierten IL-8-Produktion auf. HeLa TNFR2- und HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen, wurden entweder mit einer Mischung aus 600 ng/ml Fc-TNF(143N/145R) und 1 µg/ml mAK 80M2 für sechs Stunden vorstimuliert oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere acht Stunden mit den angegebenen Konzentrationen Fc-TNF(32W/86T) inkubiert. Die Menge des produzierten IL-8 wurde dann im ELISA bestimmt.

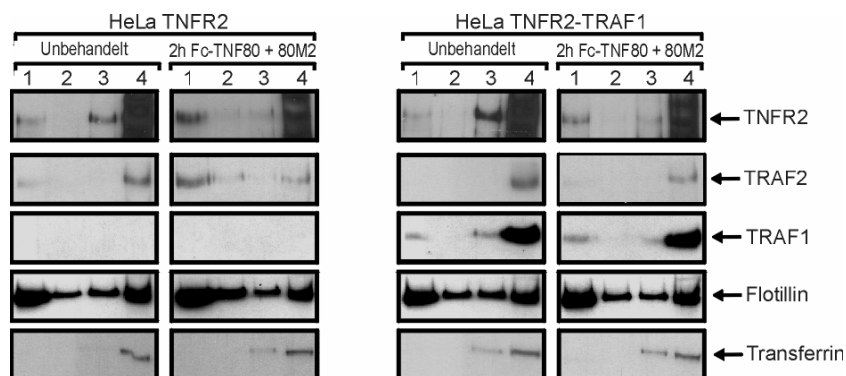


Abbildung 20: TRAF1 verhindert die TNFR2-vermittelte Translokation von TRAF2 in lipid rafts. HeLa TNFR2- und HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen wurden mit einer Mischung aus 600 ng/ml Fc-TNF(143N/145R) und 1 µg/ml mAK 80M2 für zwei Stunden stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach der Zellyse erfolgte die Fraktionierung über einen Sucrose-Gradienten. Anschließend wurden die Fraktionen mittels Western-Blot auf die Präsenz der angegebenen Proteine untersucht. Als Marker für lipid rafts (Fraktion 1) wurde Flotillin verwendet, Transferrin diente als Zytosol-Marker (Fraktion 4).

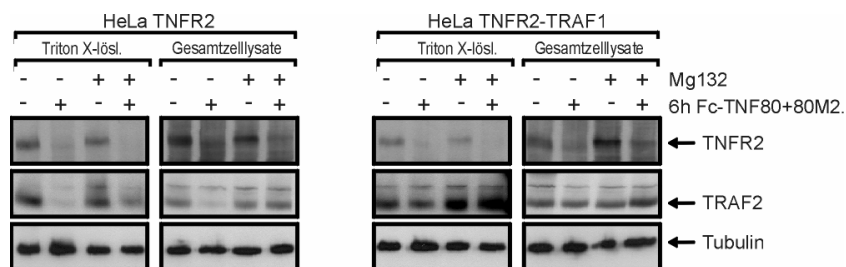


Abbildung 21: TRAF1 verhindert den proteasomalen Abbau von TRAF2. HeLa TNFR2- und HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen wurden in Gegenwart oder in Abwesenheit von 20 µM Mg132 mit einer Mischung aus 600 ng/ml Fc-TNF(143N/145R) und 1 µg/ml mAK 80M2 für sechs Stunden stimuliert oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurden sie entweder direkt in 4x Ladepuffer (Gesamtzelllysate) oder in 1% Triton X-100 Lysispuffer (Triton X-lösliche Fraktion) lysiert. Die direkt in 4x Ladepuffer lysierten Proben und die Triton X-lösliche Fraktion wurde dann mit den angegebenen Antikörpern im Western-Blot analysiert.

4.1.4 TRAF1 blockiert die Signaltransduktion von CD40

Nachdem in den Kapiteln 4.1.2 und 4.1.3 ein neutraler Effekt von TRAF1 auf die TRAF2-abhängige TNFR1-Signaltransduktion und eine verstärkende Wirkung auf die TNFR2-induzierte IL-8-Produktion nachgewiesen werden konnte, sollte nun die Spezifität dieser Effekte anhand eines anderen TRAF2-interagierenden Mitgliedes der TNFR-Familie, dem CD40, untersucht werden. In einer früheren Arbeit wurde berichtet, dass TRAF1 die CD40-abhängige NF κ B-Aktivierung inhibieren kann (Fotin-Mleczek et al., 2004). Daher wurden stabil exprimierende HeLa CD40-TRAF1-Zellen verwendet, um die Effekte von TRAF1 auf die CD40-induzierte JNK- und NF κ B-Aktivierung zu untersuchen. Im Einklang mit den Literaturdaten konnte gezeigt werden, dass TRAF1 sowohl die CD40-induzierte JNK- und NF κ B-Aktivierung (Abb. 22A) als auch die Produktion von IL-8 deutlich reduzierte (Abb. 22B). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die verstärkte TNFR2-Signaltransduktion in TRAF1-exprimierenden Zellen nicht auf eine generelle Verstärkung der Signaltransduktion bei TRAF2-interagierenden Rezeptoren zurückzuführen ist.

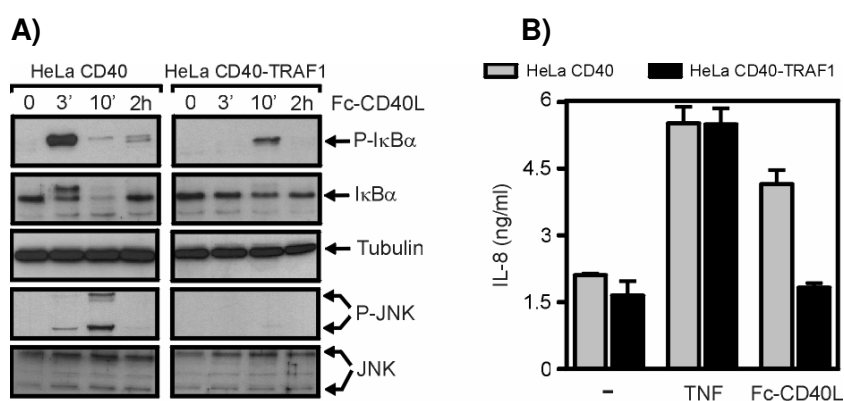


Abbildung 22: TRAF1 verhindert die CD40-abhängige JNK- und NF κ B-Aktivierung. **A)** HeLa-CD40-Zellen, die entweder mit dem leeren retroviralen Expressionsvektor pEGZ oder mit dem TRAF1-kodierenden pEGZ stabil transfiziert waren, wurden für die angegebenen Zeiten mit 400 ng/ml Fc-CD40L stimuliert. Die Zelllysate wurden anschließend mit Antikörpern für phospho-JNK, JNK, phospho-I κ B α sowie I κ B α mittels Western-Blot analysiert. **B)** HeLa-CD40- und HeLa-CD40-TRAF1-Zellen wurden für sechs Stunden mit 40 ng/ml Fc-CD40L oder 50 ng/ml TNF stimuliert und anschließend die Menge des produzierten IL-8 im ELISA bestimmt.

4.2 TNF induziert die JNK-Aktivierung Caspase-abhängig

In den Kapiteln 4.1.1 bis 4.1.4 der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRAF1 wichtige modulatorische Funktionen beim Crosstalk der beiden TNFR sowie bei der Signaltransduktion der TRAF-interagierenden Rezeptoren (TNFR2, CD40) ausübt. In diesem Zusammenhang wurde auch die TNFR1-, TNFR2- sowie die CD40-induzierte JNK-Aktivierung untersucht (Abb. 10, 22A). Dabei konnte, insbesondere bei der Aktivierung von TNFR1 und CD40, nach fünf bis 30 Minuten eine transiente JNK-Aktivierung nachgewiesen werden. Wie in Kapitel 1.3.3.2 detaillierter beschrieben, wird durch diese transiente JNK-Aktivierung in erster Linie Geninduktion und Inflammation vermittelt. Im zweiten Teil der Arbeit soll nun das Apoptose-assoziierte andauernde JNK-Signal untersucht werden, das insbesondere bei NF κ B-inhibierten Zellen beobachtet wird (Nakano, 2004). Die molekularen Mechanismen der persistierenden JNK-Aktivierung, das Zusammenspiel mit dem NF κ B-Signalweg und der Apoptoseinduktion waren dabei von besonderem Interesse.

4.2.1 Inhibition des NF κ B-Signalweges kann für die TNF-induzierte Apoptose sensitivieren

Um das Zusammenspiel zwischen NF κ B-Aktivierung, Apoptose- und JNK-Induktion untersuchen zu können, wurden vier Paare von Zelllinien verwendet, bei denen der NF κ B-Signalweg intakt bzw. blockiert war. Im Einzelnen wurden neben den entsprechenden Parentalzellen ein Klon der T-Zelllinie Jurkat, welcher einen genetischen Defekt bei der NEMO-Expression besitzt, NEMO-defiziente embryonale Mausfibroblasten, KB- und HaCaT-Zellen verwendet, die eine dominant-negative Mutante von IKK2 (IKK2-DN) überexprimieren. In den NF κ B-inhibierten Jurkat-, HaCaT- und MEF-Zellen waren die I κ B-Phosphorylierung und Degradation nach TNF-Stimulation im Vergleich zu den Parentalzellen nahezu komplett inhibiert (Abb. 23). Lediglich bei den IKK2-DN überexprimierenden KB-Zellen war noch eine reduzierte I κ B-Phosphorylierung nachweisbar. Des Weiteren war die IL-8-Produktion nach TNF-Behandlung bei den NF κ B-inhibierten humanen Zelllinien im Vergleich zu den Parentalzellen deutlich reduziert (Daten nicht gezeigt).

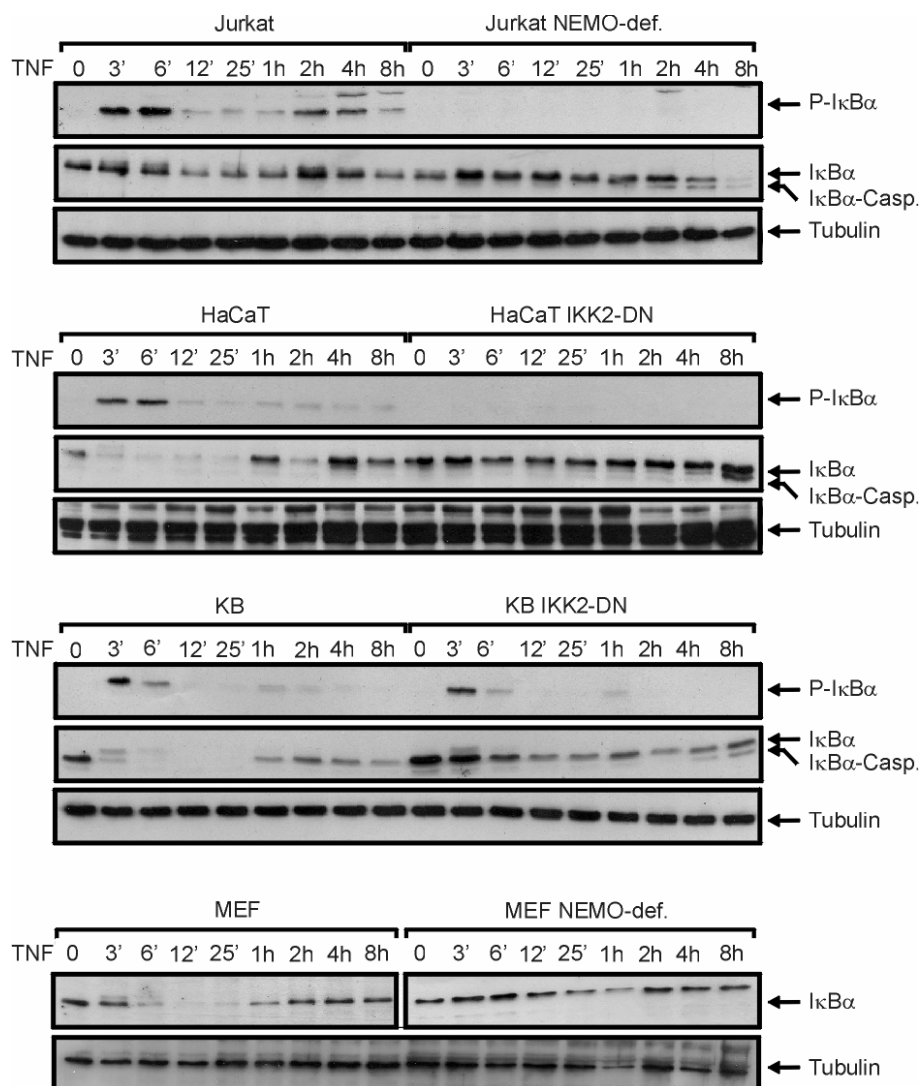


Abbildung 23: Die TNF-induzierte NFκB-Aktivierung ist in NEMO-defizienten und IKK2-DN-überexprimierenden Zellen inhibiert. Die verschiedenen Zelllinien wurden für die angegebenen Zeiten mit 20 ng/ml TNF stimuliert und anschließend lysiert. Die Aktivierung des NFκB-Signalweges wurde in Western-Blot Analysen über die Phosphorylierung von IκBα und dessen Degradation nachgewiesen. Das durch Caspasen generierte C-terminale Spaltprodukt von IκBα wurde als IκBα-Casp. bezeichnet. Die Detektion von Tubulin diente als Ladekontrolle.

Es ist bekannt, dass die TNF-vermittelte NFκB-Aktivierung in den meisten Fällen die Apoptoseinduktion verhindert (siehe Kapitel 1.3.2). Es war daher zu erwarten, dass es nach Inhibition des NFκB-Signalweges zu einer Verstärkung der TNF-vermittelten Apoptose kommt. Diese Erwartung konnte, wie in Abbildung 24 gezeigt, auch bestätigt werden. Bei den NFκB-inhibierten KB- und MEF-Zellen war jedoch, um eine effiziente Apoptoseinduktion zu erreichen, zusätzlich eine Behandlung mit Cyclohexamid (CHX)

nötig. In geringen Konzentrationen inhibiert CHX die Produktion kurzlebiger antiapoptotischer Proteine (z.B. Flip-L), während die Neusynthese von NF κ B-regulierten Proteinen unbeeinflusst bleibt (Daten nicht gezeigt).

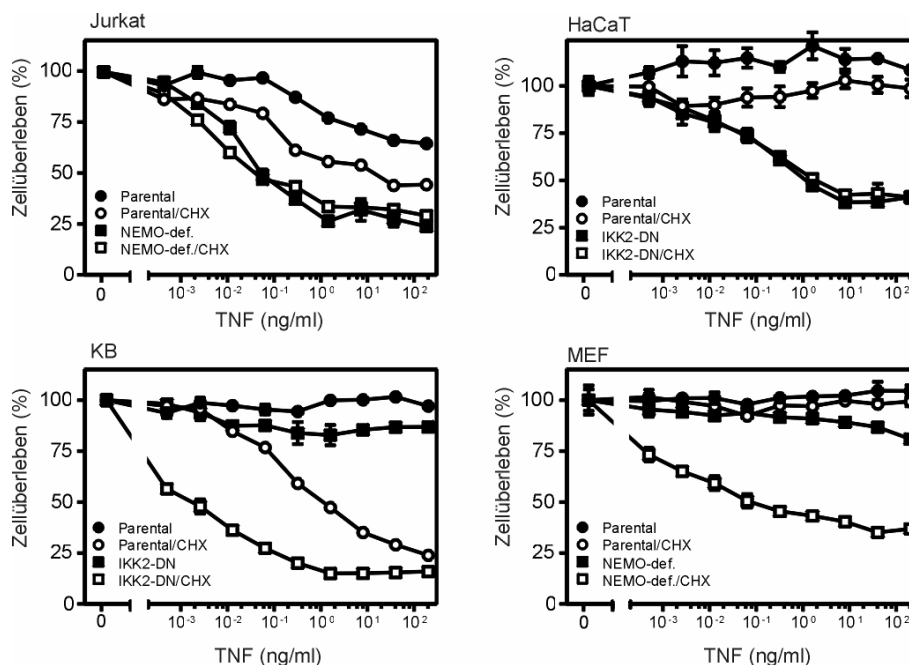


Abbildung 24: TNF verstärkt den Zelltod in NEMO-defizienten und IKK2-DN-überexprimierenden Zellen. Die verschiedenen Zelllinien wurden in einer 96-Well Platte ausgesät und am nächsten Tag in Abwesenheit oder Anwesenheit von 2,5 μ g/ml CHX mit den angegebenen Konzentrationen TNF für 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Zellüberleben mittels MTT- (Jurkat) oder Kristallviolett-Färbung (HaCaT, KB, MEF) ermittelt.

Im Einklang mit der festgestellten erhöhten Apoptoseinduktion bei den NF κ B-inhibierten humanen Zelllinien stehen auch die in Abbildung 25 gezeigten Western-Blot Analysen der Prozessierung der Caspase-8, -9 und -3 sowie der Caspasesubstrate PARP (poly-(ADP)-ribose polymerase) und BID. Insbesondere bei den NF κ B-inhibierten HaCaT- und Jurkat-Zellen zeigte sich eine starke Zunahme der Prozessierung der Caspasen und deren Substrate im Verhältnis zu den entsprechenden NF κ B-kompetenten Parentalzellen. Entsprechend der Sensitivität der CHX-vorstimulierten parentalen KB-Zellen für die TNF-induzierten Apoptose war hier, trotz eines intakten NF κ B-Signalweges, bereits eine Aktivierung der Caspasen sowie eine PARP- und BID-Spaltung nachweisbar.

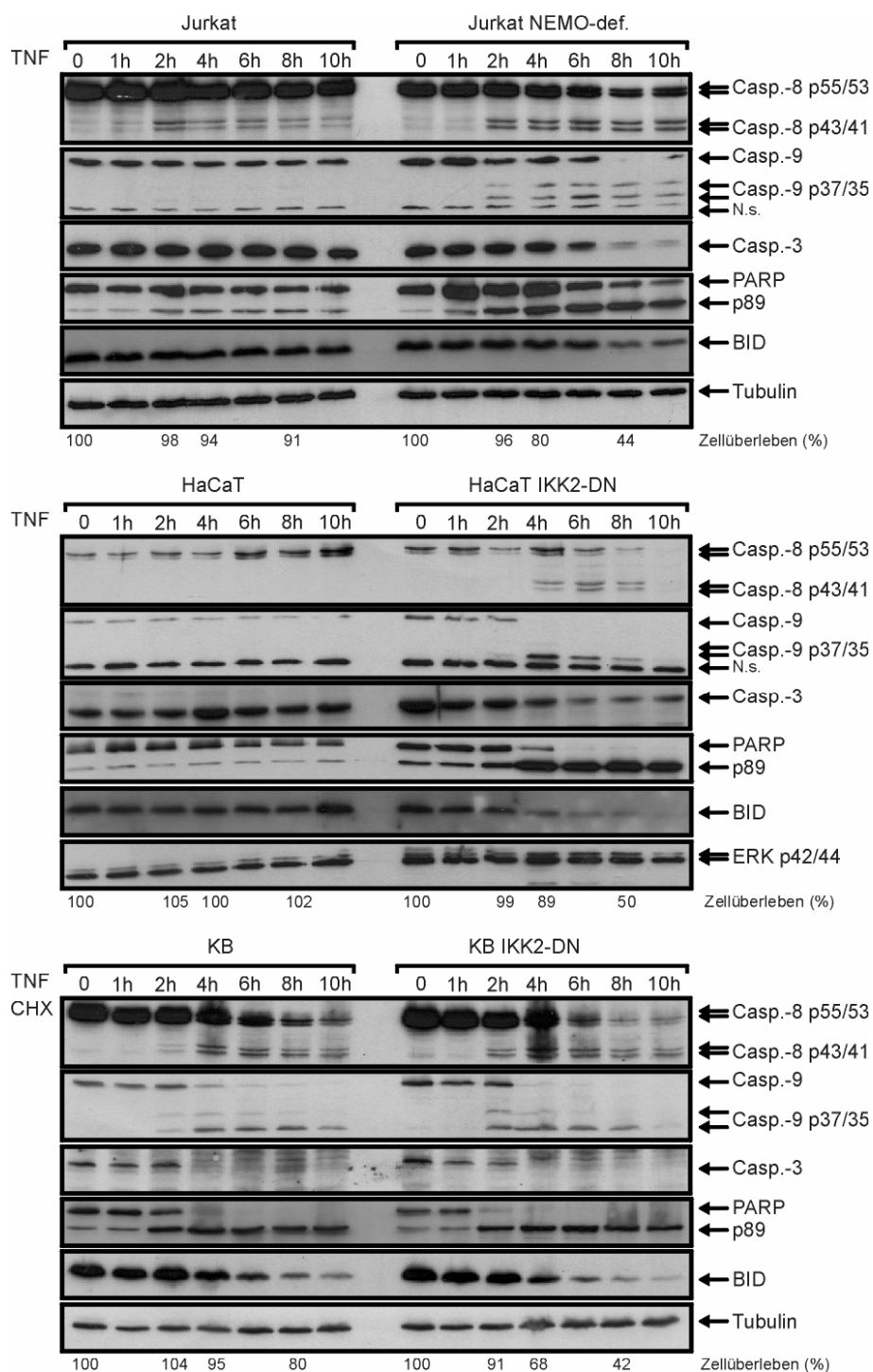


Abbildung 25: Die TNF-induzierte Prozessierung der Caspasen und der Caspasesubstrate ist in den NEMO-defizienten und IKK2-DN-überexprimierenden Zellen verstärkt. Die verschiedenen Zelllinien wurden für die angegebenen Zeiten mit 20 ng/ml TNF inkubiert. Die KB- und KB IKK2-DN-Zellen wurden zusätzlich für zwei Stunden mit 2,5 µg/ml CHX vorbehandelt. Anschließend wurden Zellysate angefertigt und im Western-Blot auf die Prozessierung der dargestellten Proteine untersucht. Die Detektion von Tubulin oder ERK diente als Ladekontrolle. Unspezifische Banden wurden als N.s. markiert. Zusätzlich wurde zu den angegebenen Zeitpunkten das Zellüberleben mittels MTT- (Jurkat) oder Kristallviolett-Färbung (KB, HaCaT) ermittelt.

Die Inhibierung des NF κ B-Signalweges bei diesen Zellen führte dabei zu einer zusätzlichen Erhöhung der TNF-induzierten Apoptoserate sowie zu einer verstärkten Prozessierung von Caspasen und deren Substrate.

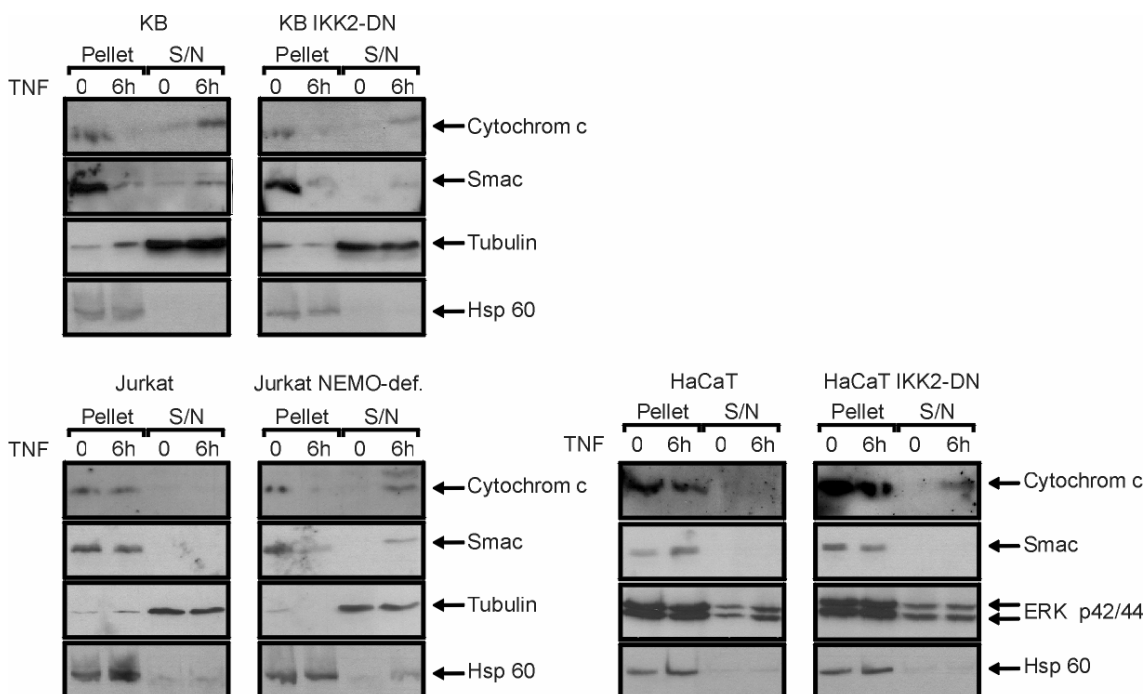


Abbildung 26: TNF induziert die Freisetzung von Cytochrom c und Smac aus den Mitochondrien. Die verschiedenen Zelllinien wurden für sechs Stunden mit 20 ng/ml TNF (Jurkat und HaCaT) oder mit 20 ng/ml TNF und 2,5 μ g/ml CHX (KB) stimuliert. Anschließend wurde die Zytosol- (S/N) und Mitochondrien-enhaltende- (Pellet) Fraktion isoliert und im Western-Blot analysiert. Hsp 60 diente als Marker für die Mitochondrien-enhaltende Fraktion und Tubulin oder ERK wurden als Zytosol-Marker verwendet. Die Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges wurde über die Freisetzung von Cytochrom c und Smac aus der Pellet- in die Zytosol-Fraktion nachgewiesen

Experimente, bei denen nach TNF-Stimulation die Freisetzung von Smac und Cytochrom c aus den Mitochondrien nachgewiesen werden konnte (Abb. 26), zeigten zudem, dass die Apoptoseinduktion in den untersuchten Zelllinien stets unter Einbeziehung des mitochondrialen Apoptoseweges ablief. Um zu überprüfen, ob der TNF-induzierte Zelltod ausschließlich über die Aktivierung von Caspasen erfolgt, oder ob auch Caspase-unabhängige Prozesse von Bedeutung sind, wurden Untersuchungen mit dem Caspaseinhibitor z-VAD-fmk durchgeführt. Während bei den KB-Zellen nach Vorbehandlung mit z-VAD-fmk eine komplette Inhibierung des TNF-vermittelten Zelltodes festgestellt werden konnte, war dies bei den anderen Zelllinien

nur partiell der Fall (Abb. 27). Dies lässt den Schluss zu, dass der TNF-vermittelte Zelltod bei den KB-Zellen ausschließlich Caspase-abhängig verläuft, wohingegen bei den HaCaT-, Jurkat- und MEF-Zellen hierbei auch Caspase-unabhängige Prozesse wie z.B. Nekrose eine wichtige Rolle spielen.

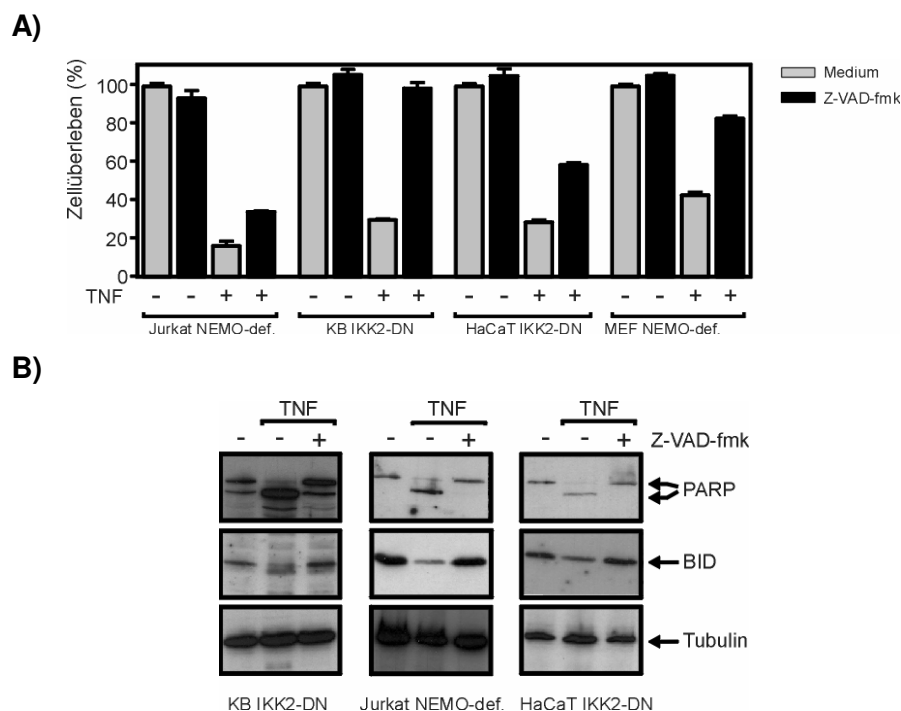


Abbildung 27: Der TNF-induzierte Zelltod verläuft Zelltyp-abhängig sowohl über Caspase-abhängige als auch Caspase-unabhängige Signalwege. A) Die verschiedenen Zelllinien wurden mit 100 ng/ml TNF (Jurkat NEMO-def. und HaCaT IKK2-DN) oder mit 100 ng/ml TNF und 2,5 µg/ml CHX (KB IKK2-DN und MEF NEMO-def.) in Anwesenheit oder Abwesenheit von 40 µM z-VAD-fmk stimuliert. Anschließend wurde das Zellüberleben mittels MTT- (Jurkat NEMO-def.) oder Kristallviolett-Färbung (HaCaT IKK2-DN, KB IKK2-DN, MEF NEMO-def.) ermittelt. **B)** Die angegebenen Zelllinien wurden für sechs (Jurkat NEMO-def. und KB IKK2-DN) oder neun Stunden (HaCaT IKK2-DN) mit 20 ng/ml TNF (Jurkat NEMO-def. und HaCaT IKK2-DN) oder einer Mischung aus 20 ng/ml TNF und 2,5 µg/ml CHX (KB IKK2-DN) in Anwesenheit oder Abwesenheit von 40 µM z-VAD-fmk stimuliert. Die Zellysate wurden daraufhin im Western-Blot auf die Spaltung der Caspasesubstrate BID und PARP untersucht. Die Detektion von Tubulin diente als Ladekontrolle.

In anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des NFκB-Signalweges die Apoptoseinduktion über den TNFR1-verwandten Todesrezeptor Fas nur geringfügig verstärkt (Wicovsky et al., 2006). Dies ist insofern bemerkenswert, da die Apoptoseinduktion über TNFR1 und Fas über einen ähnlichen Signalweg unter Einbeziehung der Initiatorcaspase-8 verläuft (Wajant et al., 2003). Die unterschiedliche

Regulation der Fas- und TNFR1-induzierten Apoptose legt daher den Schluss nahe, dass ein oder mehrere durch NF κ B-regulierte Proteine selektiv bei der TNFR1-vermittelten Apoptose die Aktivierung der Caspase-8 inhibieren.

4.2.2 Die TNF-induzierte persistierende JNK-Aktivierung wird Zelltyp-abhängig durch z-VAD-fmk inhibiert

Nachdem in Kapitel 4.2.1 an vier Zelllinien (Jurkat, HaCaT, MEF, KB) der Zusammenhang zwischen NF κ B-Inhibition, der TNF-induzierten Apoptose- bzw. Nekroseinduktion mittels Zytotoxizitätsassays und Western-Blot Analysen untersucht worden ist, sollte nun die Aktivierung der JNK analysiert werden. Dabei wurde zunächst der zeitliche Verlauf der TNF-induzierten JNK-Aktivierung genauer betrachtet (Abb. 28).

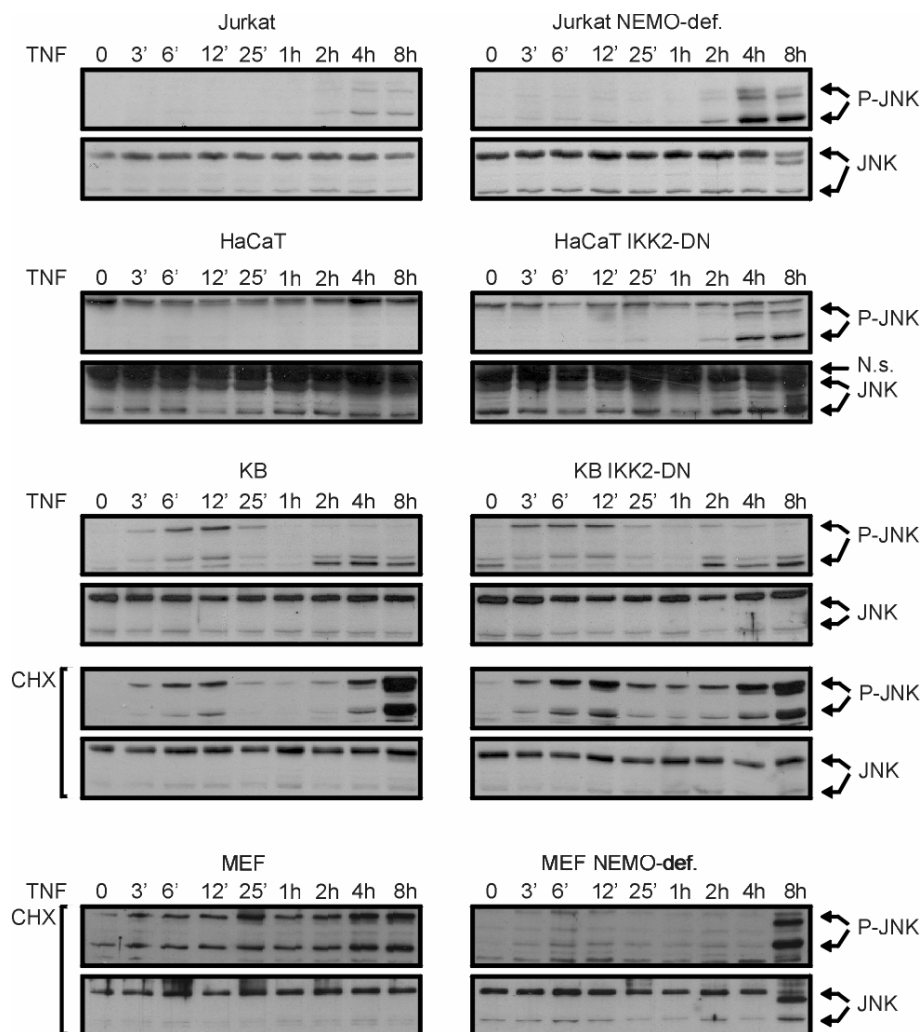


Abbildung 28: Die TNF-induzierte anhaltende JNK-Aktivierung erfolgt in Zelltyp-abhängiger Weise. Die verschiedenen Zelllinien wurden für die angegebenen Zeiten mit 20 ng/ml TNF inkubiert und anschließend lysiert. Die MEF- und KB-Zellen wurden zusätzlich für zwei Stunden mit 2,5 µg/ml CHX vorbehandelt. Als Indikator für die Aktivierung des JNK-Signalweges wurde die Phosphorylierung der JNK mit einem anti-phospho-JNK Antikörper im Western-Blot untersucht. Die Detektion der gesamten zellulären JNK diente als Ladekontrolle. Unspezifische Banden wurden als N.s. markiert.

In der Literatur wird beschrieben, dass TNF in den meisten Zelltypen nach fünf bis 30 Minuten zunächst eine transiente JNK-Aktivierung induziert, woraufhin bei NFκB-inhibierten Zellen eine zweite andauernde JNK-Aktivierung folgt (siehe Kapitel 1.3.3.) (Nakano, 2004). Im Einklang mit diesen Daten konnte ein deutliches andauerndes JNK-Signal in den NFκB-inhibierten Jurkat- und HaCaT-Zellen nachgewiesen werden. Auch die beschriebene transiente Aktivierung der JNK konnte in einigen Experimenten sowohl bei den parentalen als auch den NFκB-inhibierten Jurkat- und HaCaT-Zellen

gezeigt werden (Abb. 28 und Daten nicht gezeigt). Interessanterweise wurde sowohl in den parentalen als auch in den NEMO-defizienten MEF-Zellen eine transiente und andauernde Aktivierung der JNK gefunden. Auch bei den KB-Zellen konnte die in zahlreichen Publikationen beschriebene Korrelation zwischen NF κ B-Inhibition und andauernder JNK-Aktivierung nicht bestätigt werden (siehe Kapitel 1.3.3.2.1). So wurde nach CHX-Vorstimulation sowohl bei den KB-Zellen als auch den KB IKK2-DN-Zellen in gleichem Maße eine fortwährende Aktivierung der JNK nachgewiesen. Auf der anderen Seite war ohne Sensitivierung mit CHX in diesen Zelllinien keine andauernde JNK-Aktivierung nachweisbar. Um den Zusammenhang zwischen NF κ B-Inhibition, Apoptoseinduktion und JNK-Aktivierung in dieser Zelllinie weiter zu untersuchen, wurden im Folgenden Experimente mit KB-Zellen durchgeführt, welche das antiapoptotische Protein Bcl2 überexprimieren. Diese Zellen waren so vor der TNF-induzierten Apoptose geschützt (Abb. 29A, 29C), konnten aber den NF κ B-Signalweg noch normal aktivieren (Kreuz et al., 2004). Wie aus Abbildung 29B ersichtlich, zeigte sich, dass die TNF-vermittelte andauernde JNK-Induktion in den KB-Bcl2-Zellen inhibiert war. Somit kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass in KB-Zellen die andauernde JNK-Aktivierung eher mit der TNF-induzierten Apoptose- und Caspase-Aktivierung korreliert, als mit der Inhibition von NF κ B. Analoge Experimente, bei denen NF κ B-inhibierte HaCaT-Zellen durch Überexpression des antiapoptotischen Proteins Flip-L vor der TNF-induzierten Apoptose und Nekrose geschützt waren, deuteten gleichfalls auf eine enge Korrelation zwischen Apoptose bzw. Nekrose und andauernder JNK-Aktivierung, die unabhängig von NF κ B ist, hin (Abb. 29A, 29B).

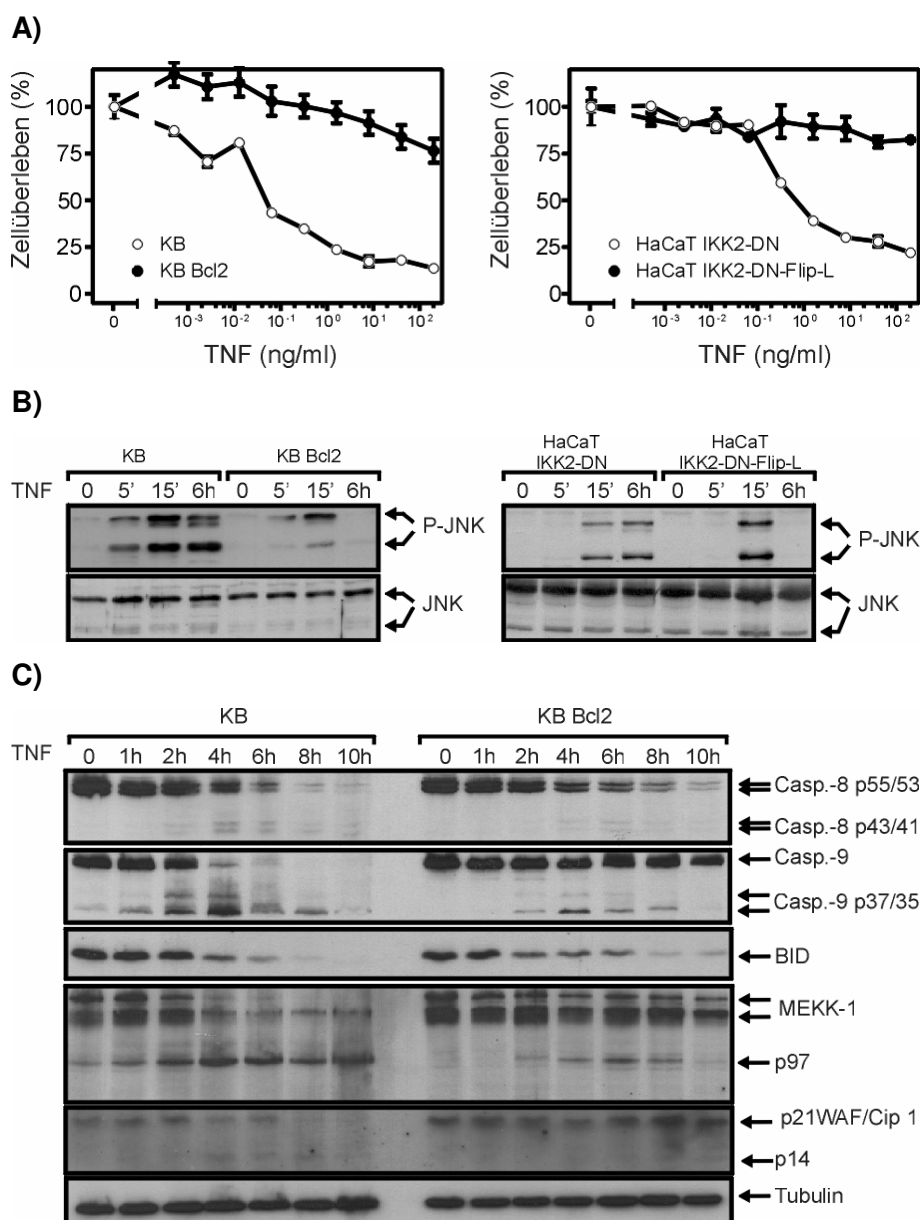


Abbildung 29: Die TNF-induzierte andauernde JNK-Aktivierung erfolgt Caspase-abhängig. **A)** Die verschiedenen Zelllinien wurden in einer 96-Well Platte ausgesät und am nächsten Tag mit den angegebenen Konzentrationen TNF für 16 Stunden inkubiert. Die KB-Zellen wurden zusätzlich für zwei Stunden mit 2,5 µg/ml CHX vorbehandelt. Anschließend wurde das Zellüberleben mittels Kristallviolett-Färbung ermittelt. **B)** Die verschiedenen Zelllinien wurden für die angegebenen Zeiten mit 20 ng/ml TNF inkubiert und anschließend lysiert. Die KB-Zellen wurden zusätzlich für zwei Stunden mit 2,5 µg/ml CHX vorbehandelt. Als Indikator für die Aktivierung des JNK-Signalweges wurde die Phosphorylierung der JNK mit einem anti-phospho-JNK Antikörper im Western-Blot untersucht. Die Detektion der gesamten zellulären JNK diente als Ladekontrolle. **C)** Die Apoptoseinduktion bei den KB- und KB Bcl2-Zellen wurde über die Prozessierung der dargestellten Caspasen und Caspasesubstrate verfolgt. Die Detektion von Tubulin diente als Ladekontrolle.

Für den TNFR1-verwandten Todesrezeptor Fas konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die andauernde JNK-Aktivierung Caspase-abhängig reguliert wird (Wajant et al., 2003). Um zu untersuchen, ob bei der TNF-vermittelten JNK-Induktion ebenfalls Caspasen eine Rolle spielen, wurden Experimente mit dem Caspaseinhibitor z-VAD-fmk durchgeführt. Das andauernde JNK-Signal wurde in Jurkat-, KB- und HaCaT-Zellen durch z-VAD-fmk nahezu vollständig inhibiert, ohne die transiente JNK-Aktivierung zu beeinflussen (Abb. 30). Dies deutet darauf hin, dass in diesen Zelllinien die frühe und die andauernde JNK-Induktion durch verschiedene Caspase-abhängige und Caspase-unabhängige Signalwege gesteuert werden. Im Gegensatz dazu scheinen bei der TNF-induzierten JNK-Aktivierung in MEF-Zellen Caspasen keine oder nur eine geringe Rolle zu spielen.

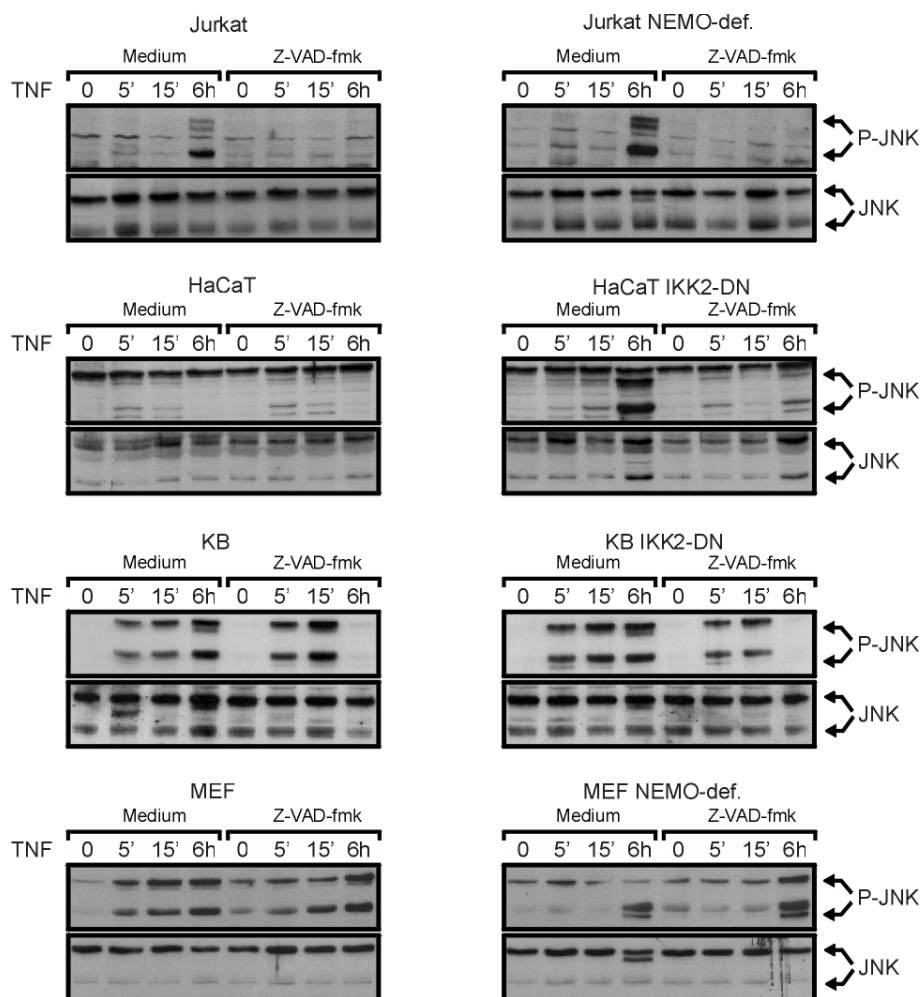


Abbildung 30: Z-VAD-fmk inhibiert die andauernde JNK-Aktivierung in einer Zelltyp-abhängigen Weise. Die verschiedenen Zelllinien wurden für die angegebenen Zeiten mit 20 ng/ml TNF in Anwesenheit oder Abwesenheit von 40 μ M z-VAD-fmk inkubiert und anschließend lysiert. Die MEF- und KB-Zellen wurden zusätzlich für zwei Stunden mit 2,5 μ g/ml CHX vorbehandelt. Als Indikator für die Aktivierung des JNK-Signalweges wurde die Phosphorylierung der JNK mit einem anti-phospho-JNK Antikörper im Western-Blot untersucht. Die Detektion der gesamten zellulären JNK diente als Ladekontrolle.

Wie in Kapitel 1.3.3.2.2 beschrieben, kann die Caspase-vermittelte Spaltung von p21WAF/Cip 1 und MEKK-1 zur Generierung von Spaltprodukten mit hoher JNK-stimulierender Aktivität führen (Deak et al., 1998; Cardone et al., 1997; Ham et al., 2003). Erstaunlicherweise konnte auch in den NF κ B-inhibierten Jurkat-, HaCaT und KB-Zellen eine Spaltung dieser Proteine nachgewiesen werden (Abb. 31). Si RNA Experimente, bei denen versucht wurde, die Expression von MEKK-1 und p21WAF/Cip 1 zu inhibieren, konnten allerdings keine entscheidende Bedeutung dieser Proteine bei der TNF-induzierten andauernden JNK-Aktivierung nachweisen (Daten nicht gezeigt).

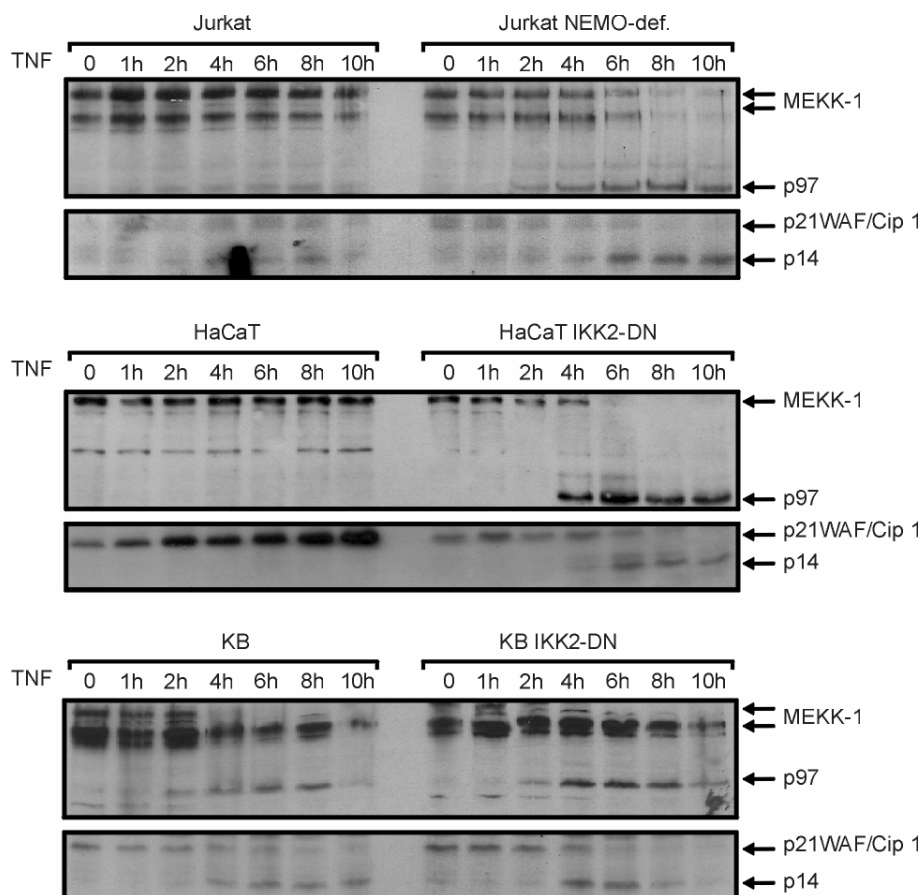


Abbildung 31: Die TNF-induzierte Prozessierung von MEKK-1 und p21WAF/Cip 1 ist in den NEMO-defizienten und IKK2-DN-überexprimierenden Zellen verstärkt. Die verschiedenen Zelllinien wurden für die angegebenen Zeiten mit 20 ng/ml TNF inkubiert. Die KB-Zellen wurden zusätzlich für zwei Stunden mit 2,5 µg/ml CHX vorbehandelt. Anschließend wurden Zellysate angefertigt und im Western-Blot auf die Prozessierung von MEKK-1 und p21WAF/Cip 1 untersucht.

4.2.3 Die TNF-induzierte JNK-Aktivierung besitzt weder eine proapoptotische noch eine antiapoptotische Wirkung

In den Kapiteln 4.2.1 und 4.2.2 konnte gezeigt werden, dass die TNF-vermittelte andauernde JNK-Aktivierung in den humanen Zelllinien Jurkat, HaCaT und KB in erster Linie Caspase-vermittelt induziert wird. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass NFκB-induzierte Faktoren keine oder nur eine geringe Rolle bei der Regulation der TNF-vermittelten andauernden JNK-Aktivierung spielen. In diesem Kapitel sollte nun die funktionelle Bedeutung der TNF-induzierten JNK-Aktivierung genauer untersucht

werden. Zu diesem Zweck wurden Experimente mit dem pharmakologischen JNK-Inhibitor SP600125 durchgeführt (Bennett et al., 2001). Während die Phosphorylierung des JNK-Substrates c-jun in den NF κ B-inhibierten Jurkat-, HaCaT-, KB- und MEF-Zellen nahezu vollständig inhibiert war (Abb. 32A), wurde der TNF-induzierte Zelltod durch SP600125 nicht oder nur gering beeinflusst (Abb. 32B). Dies deutet darauf hin, dass JNK in diesen zellulären Systemen keine oder nur eine geringe pro- bzw. anti-apoptotische Wirkung ausübt.

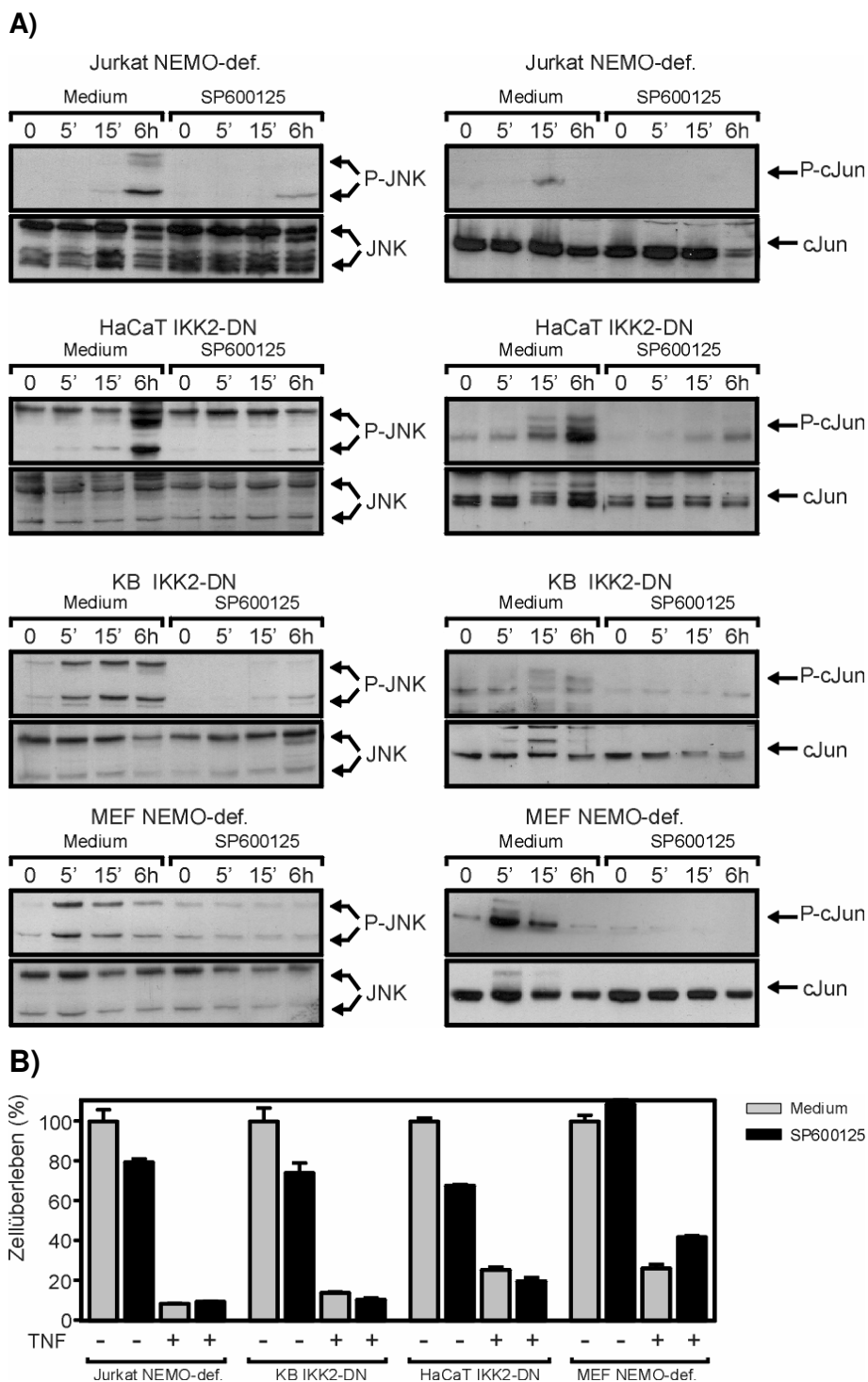


Abbildung 32: Die TNF-induzierte JNK-Aktivierung übt keinen Einfluss auf den TNF-vermittelten Zelltod aus. A) Die verschiedenen Zelllinien wurden für die angegebenen Zeiten mit 20 ng/ml TNF in Anwesenheit oder Abwesenheit von 20 μ M SP600125 inkubiert und anschließend lysiert. Die MEF NEMO-def.- und KB IKK2-DN-Zellen wurden zusätzlich für zwei Stunden mit 2,5 μ g/ml CHX vorbehandelt. Als Indikator für die Aktivität der JNK wurde die Phosphorylierung der JNK und c-jun mit anti-phospho-JNK und anti-phospho-c-jun Antikörpern im Western-Blot untersucht. Die

Detektion der gesamten zellulären JNK und c-jun diente als Ladekontrolle. **B)** Die verschiedenen Zelllinien wurden mit 100 ng/ml TNF (Jurkat NEMO-def. und HaCaT IKK2-DN) oder mit 100 ng/ml TNF und 2,5 µg/ml CHX (KB IKK2-DN und MEF NEMO-def.) in Anwesenheit oder Abwesenheit von 20 µM SP600125 stimuliert. Daraufhin wurde das Zellüberleben mittels MTT- (Jurkat NEMO-def.) oder Kristallviolett-Färbung (HaCaT IKK2-DN, KB IKK2-DN, MEF NEMO-def.) ermittelt.

4.2.4 Die TNF-induzierte anhaltende JNK-Aktivierung wird Zelltyp-abhängig durch ROS reguliert.

In den meisten bisher publizierten Untersuchungen wurden ROS als die zentralen Mediatoren der TNF-induzierten JNK-Aktivierung identifiziert (siehe Kapitel 1.3.3.2.1). ROS können bei nekrotischen Zellen, aber auch durch die Caspase-vermittelte Spaltung bestimmter Substrate entstehen. In den Kapiteln 4.2.1 und 4.2.2 konnte gezeigt werden, dass in vielen humanen Zelllinien Caspasen für die Induktion der TNF-vermittelten andauernden JNK-Aktivierung verantwortlich sind. Daher sollte nun mit Hilfe des Antioxidanten BHA die Rolle von ROS in den untersuchten Zelllinien überprüft werden. Während in den NEMO-defizienten Jurkat- und den MEF-Zellen ein starker inhibitorischer Effekt nachgewiesen werden konnte, war die TNF-vermittelte JNK-Induktion in den HaCaT- und KB-Zellen nicht oder nur moderat eingeschränkt (Abb. 33). Des Weiteren konnte ein Zelltyp-abhängiger Effekt von BHA bei dem TNF-vermittelten Zelltod nachgewiesen werden. Während BHA die NFκB-inhibierten Jurkat- und KB-Zellen nicht, und die HaCaT IKK2-DN-Zellen nur zu einem geringen Teil vor dem TNF-vermittelten Zelltod schützte, waren die NEMO-defizienten MEF-Zellen nahezu vollständig geschützt. Interessanterweise korrelierte, im Gegensatz zu den NEMO-defizienten MEF-Zellen, in den NEMO-defizienten Jurkat-Zellen die Inhibition der JNK-Induktion durch BHA nicht mit seiner Schutzfunktion beim TNF-vermittelten Zelltod. Dennoch kann auch bei den NEMO-defizienten MEF-Zellen die Inhibition der andauernden JNK-Aktivierung nur teilweise die Schutzfunktion von BHA beim TNF-vermittelten Zelltod erklären, da der JNK-Inhibitor SP600125 (Abb. 32B) ebenfalls die persistierende JNK-Induktion inhibiert, aber nur einen moderaten Schutz beim TNF-vermittelten Zelltod vermittelt. Es ist daher anzunehmen, dass ROS unabhängig von der JNK-Aktivierung auch noch andere zytotoxische Effekte vermittelt.

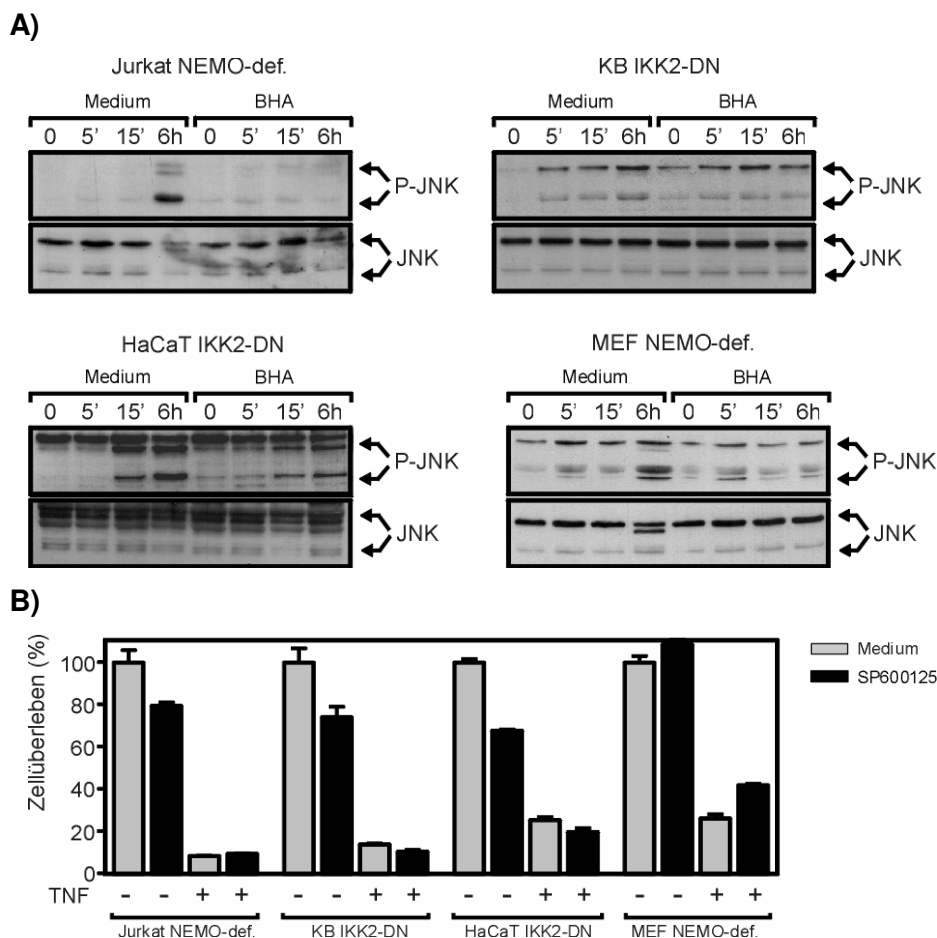


Abbildung 33: Die TNF-induzierte JNK-Aktivierung wird Zelltyp-abhängig durch ROS reguliert. A) Die verschiedenen Zelllinien wurden für die angegebenen Zeiten mit 20 ng/ml TNF in Anwesenheit oder Abwesenheit von 200 μ M des Antioxidanten BHA inkubiert und anschließend lysiert. Die MEF NEMO-def.- und KB IKK2-DN-Zellen wurden zusätzlich für zwei Stunden mit 2,5 μ g/ml CHX vorbehandelt. Als Indikator für die Aktivierung des JNK-Signalweges wurde die Phosphorylierung der JNK mit einem anti-phospho-JNK Antikörper im Western-Blot untersucht. Die Detektion der gesamten zellulären JNK diente als Ladekontrolle. **B)** Die verschiedenen Zelllinien wurden mit 100 ng/ml TNF (Jurkat NEMO-def. und HaCaT IKK2-DN) oder mit 100 ng/ml TNF und 2,5 μ g/ml CHX (KB IKK2-DN und MEF NEMO-def.) in Anwesenheit oder Abwesenheit von 200 μ M des Antioxidanten BHA stimuliert. Anschließend wurde das Zellüberleben mittels MTT- (Jurkat NEMO-def.) oder Kristallviolett-Färbung (HaCaT IKK2-DN, KB IKK2-DN, MEF NEMO-def.) ermittelt.

5. Diskussion

5.1 Die Rolle von TRAF1 beim TNFR-Crosstalk

TNF vermittelt seine biologischen Funktionen durch Interaktionen mit seinen Rezeptoren TNFR1 und TNFR2. Wie in Abbildung 2 dargestellt, unterscheiden sich dabei die lösliche und die membranständige Form von TNF in ihrer Fähigkeit, die beiden TNFR zu aktivieren. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten die molekularen Mechanismen des TNFR-Crosstalks und dessen Regulation durch TRAF1 untersucht werden. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des TNFR2 zu einer Verstärkung der TNFR1-abhängige Apoptose führen kann (Fotin-Mleczek et al., 2002; Li et al., 2002). Dieser Befund wurde sowohl der Induktion von mTNF als auch der cIAP1-abhängigen Ubiquitylierung und nachfolgenden proteasomalen Degradation von TRAF2 durch den TNFR2 zugeschrieben (Bodmer et al., 2002; Fotin-Mleczek et al., 2002; Li et al., 2002). Da TRAF2 in erster Linie antiapoptotische Funktionen wie die Rekrutierung von cIAP1 und cIAP2 an den TNFR1 (Wang et al., 1998; Fotin-Mleczek et al., 2002) sowie die Aktivierung von NF κ B zugeschrieben werden, ist dessen Depletion durch den TNFR2 von entscheidender Bedeutung bei der Verstärkung der TNFR1-induzierten Apoptose. Dennoch ist in den vorangegangenen Studien bisher nicht untersucht worden, wie sich die TNFR2-vermittelte TRAF2-Depletion auf die Bildung des TNFR1-Signalkomplexes auswirkt. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die zytoplasmatische TRAF2-Degradation auch zu einer Abnahme der TNF-induzierten TNFR1-TRAF2-Interaktion führt (Abb. 11). Des Weiteren führte die Abnahme von TRAF2 im TNFR1-Signalkomplex zu einer Verringerung der Ubiquitylierung von RIP, welche von entscheidender Bedeutung bei der Aktivierung von NF κ B ist (Park et al., 2004; Li et al., 2006; Legler et al., 2003). Hierzu passt auch der Befund, dass in TNFR2-vorstimulierten Zellen die TNFR1-vermittelte Aktivierung von NF κ B und JNK blockiert ist (Abb. 10). Bemerkenswerterweise verhinderte die Überexpression von TRAF1 die TNFR2-abhängige Rekrutierung von TRAF2 in *lipid rafts* sowie dessen darauf folgende proteasomale Degradation. Dieser Befund steht im Einklang mit einer Studie von Arron und Kollegen, bei der die CD40-abhängige TRAF2-Rekrutierung in *lipid rafts* und die

darauf folgende TRAF2-Degradation in Dendritischen Zellen durch die Expression von TRAF1 ebenfalls inhibiert war (Arron et al., 2002). Im Gegensatz zu der zitierten Studie, bei der von einer positiven Rolle von TRAF1 bei der CD40-Signaltransduktion ausgegangen wird, wurde in der vorliegenden Arbeit bei TRAF1-überexprimierenden HeLa-CD40-Zellen eine hemmende Funktion bei der NF κ B- und JNK-Aktivierung beobachtet (Abb. 22). Dieser Widerspruch ist vermutlich durch die Tatsache zu erklären, dass die von Arron und Kollegen verwendeten TRAF1-defizienten Dendritischen Zellen, aufgrund der nicht inhibierten TRAF2-Degradation eine deutlich verringerte Expression von TRAF2 im Vergleich zu den Parentalzellen aufwiesen. Die verminderte CD40-Signaltransduktion ist in diesen Zellen somit eher auf das Fehlen des TRAF1-vermittelten Schutzes vor dem TRAF2-Abbau zurückzuführen, als auf eine aktive Rolle von TRAF1 bei der CD40-induzierten JNK- und NF κ B-Aktivierung. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass TRAF1 bei einem gleichzeitigen geringeren Einbau von TRAF2 in den TNFR1-Signalkomplex rekrutiert werden kann, ohne die JNK- und NF κ B-Aktivierung zu inhibieren (Abb. 12, 14A). Dies ist insofern bemerkenswert, da TRAF1 im Gegensatz zu TRAF2 keine Ring- und Zink-Finger-Domänen besitzt, welche wegen ihrer E3-Ligase Aktivität essentiell bei der TNF-induzierten JNK-Aktivierung sind (Habelhah et al., 2004). Dieser Befund lässt vermuten, dass TRAF1 TRAF2 funktionell ersetzen kann, wenn es mit TRAF2 Heterotrimere bildet. Da TRAF1 indirekt über TRAF2 auch mit dem TNFR2 interagieren kann, erklärt dies auch das Ergebnis, dass die TRAF1-Überexpression eher zu einer Verstärkung als zu einer Verringerung der TNFR2-vermittelten IL-8-Produktion führt. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde zudem gezeigt, dass TNFR2-Stimulation zu einem Abbau der JNK-aktivierenden MAP3Kinase ASK-1 führt (Zhao et al., 2007). Daher ist es auch möglich, dass die erhöhte TNFR2-induzierte IL-8-Expression in den TRAF1-überexprimierenden Zellen nicht nur auf die Verhinderung des TRAF2-Abbaus, sondern auch auf die Blockierung der ASK1-Degradation zurückzuführen ist. Es konnte auch festgestellt werden, dass die TRAF1-Expression die kooperative TNFR-Signaltransduktion von der Apoptoseinduktion zu proinflammatorischen Signalwegen verschiebt (Abb. 16 bis 19). Insbesondere bei Zellen des Immunsystems wie den T-Zellen oder Makrophagen, die beide TNFR exprimieren sowie selbst TNF produzieren können (Wajant et al., 2003) scheint TRAF1 eine wichtige Rolle bei der Regulation des TNFR-Crosstalks zu spielen. So spielen bei der Auslösung einer Immunreaktion die TNF-induzierten proinflammatorischen Signalwege NF κ B und JNK eine wichtige Rolle, wohingegen bei der Eliminierung peripherer T-Zellen die TNF-induzierte Apoptose von

großer Bedeutung ist (Zheng et al., 1995; Speiser et al., 1996). Zukünftige Studien müssen zeigen ob TRAF1, dessen Expression bei aktivierten T-Zellen und Makrophagen induziert werden kann, einen vorübergehenden Schutz vor der kooperativen TNFR1/TNFR2-vermittelten Apoptose ausübt. Zusammengefasst sind die in dieser Arbeit untersuchten Funktion von TRAF1 bei der TNFR-Signaltransduktion in Abbildung 34 dargestellt.

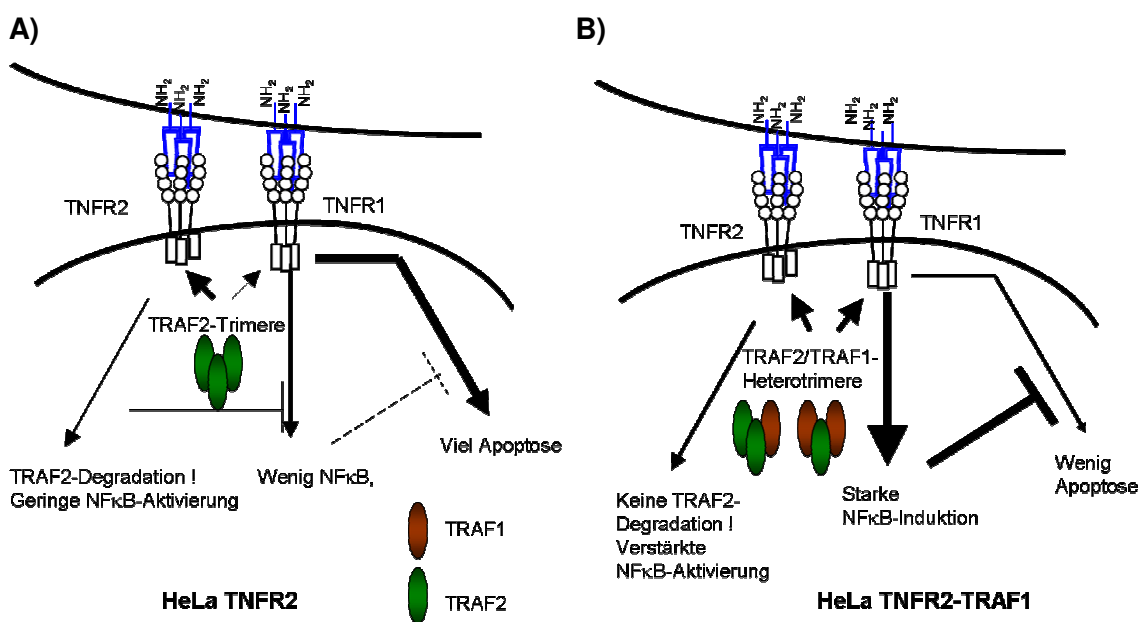


Abb. 34 Die Rolle von TRAF1 bei der TNFR-Signaltransduktion: **A)** Aktivierung des TNFR2 führt in HeLa TNFR2-Zellen zur Rekrutierung von TRAF2-Trimeren an den TNFR2. Anschließend kommt es zu einer schwachen Aktivierung von NFκB sowie zur Degradation der TRAF2-Proteine. Als Folge davon können die TRAF2-Trimeren nicht mehr an den TNFR1 rekrutiert werden und die TNFR1-vermittelte Apoptoseinduktion dominiert über die Aktivierung von NFκB. **B)** In HeLa TNFR2-TRAF1-Zellen kommt es nach TNFR2-Aktivierung zu einer Rekrutierung von TRAF2/TRAF1-Heterotrimeren an den TNFR2. Daraufhin kommt es zu einer verstärkten Aktivierung von NFκB im Vergleich zu den HeLa-Zellen. Da die TRAF2/TRAF1-Heterotrimeren nicht degradiert werden, können sie an den TNFR1 rekrutiert werden und die TNFR1-vermittelte Aktivierung von NFκB dominiert über die Apoptoseinduktion.

5.2 Die TNF-induzierte andauernde JNK-Aktivierung verläuft in vielen Zelllinien Caspase-abhängig

TNF wird eine zentrale Rolle bei entzündlichen Prozessen sowie bei Wachstums- und Differenzierungsvorgängen zugeschrieben. Die wichtigsten durch TNF induzierten Signalwege, die hierbei eine Rolle spielen, sind neben der Apoptoseinduktion die Aktivierung von NF κ B und JNK (siehe Kapitel 1.3). Während das antagonistische Zusammenspiel zwischen NF κ B-Aktivierung und Apoptoseinduktion bei der TNF-Signaltransduktion weitgehend bekannt ist, ist die Rolle der JNK-Aktivierung in diesem Zusammenhang vergleichsweise wenig untersucht worden. Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass die TNF-induzierte Aktivierung der JNK die Balance zwischen Zellüberleben und Apoptoseinduktion beeinflussen kann (Davis, 2000c; Varfolomeev and Ashkenazi, 2004). TNF induziert in den meisten Zelltypen nach zehn bis 30 Minuten zunächst eine transiente JNK-Aktivierung, woraufhin bei NF κ B-inhibierten Zellen, eine zweite andauernde Aktivierung der JNK erfolgt (Nakano, 2004e). Die Zelltod-induzierende Wirkung der JNK wird vor allem der zweiten, andauernden JNK-Aktivierung zugeschrieben, die die Caspase-unabhängige Spaltung von BID sowie die proteasomalen Degradation von Flip-L vermitteln kann (Abb.6) (Deng et al., 2003; Chang et al., 2006). Allerdings war bisher unklar, ob die Aktivierung der Caspasen seinerseits zu einer TNF-vermittelten Aktivierung der JNK führen kann. In der Literatur ist beschrieben, dass Caspasen durch die Spaltung bestimmter Proteine wie MEKK-1 oder p21WAF1/Cip 1 JNK-aktivierende Fragmente generieren können und das die Fas-induzierte JNK-Aktivierung in einigen Zelllinien Caspase-abhängig verläuft (Deak et al., 1998; Cardone et al., 1997; Ham et al., 2003). Im Gegensatz dazu wurde die TNF-induzierte andauernde JNK-Aktivierung in MEF-Zellen als ROS-abhängig und Caspase-unabhängig beschrieben (Sakon et al., 2003). Um die Rolle der Caspasen bei der TNF-induzierten andauernden JNK-Aktivierung insbesondere in humanen Zellen genauer untersuchen zu können, wurden vier Zelllinien verwendet, deren NF κ B-Signalweg intakt bzw. inhibiert war. Im Einklang mit den Literaturdaten konnte festgestellt werden, dass die Inhibition von NF κ B zu einer verstärkten Apoptoseinduktion und persistierenden JNK-Aktivierung führte (Abb. 24, 28) (Nakano, 2004). Allerdings konnte auch in einigen Zelltypen eine andauernde Aktivierung von JNK trotz intakten NF κ B-Signalweges nachgewiesen werden (Abb. 28, 29B und Daten nicht gezeigt). Dieser Befund lässt sich nicht durch Veröffentlichungen erklären, worin NF κ B-induzierte Radikalfänger wie MnSOD und FHC die persistierende

TNF-vermittelte JNK-Aktivierung inhibieren (siehe Kapitel 1.3.3.2.1) (Nakano et al., 2004). Vielmehr scheint in diesen Zelllinien die andauernde Aktivierung der JNK nicht mit der Induktion von NF κ B, sondern mit der Apoptose bzw. Nekroserate zu korrelieren. Diese Annahme wird zudem durch das Resultat gestützt, dass in NF κ B-inhibierten Zellen die Verhinderung des Zelltods durch die Überexpression von Flip-L zu einer deutlichen Abnahme des TNF-induzierten persistierenden JNK-Signals im Vergleich zu den Parentalzellen führte (Abb. 29A, 29B). Es ist daher anzunehmen, dass die NF κ B-Induktion in diesen Zelllinien die TNF-vermittelte andauernde JNK-Aktivierung nicht direkt durch die Expression von bestimmten JNK-inhibierenden Proteinen (z.B. A20, GADD45 β , MnSOD, FHC), sondern indirekt durch antiapoptotische Proteine (z.B. Flip-L, IAPs), die die Aktivierung der Caspasen und Apoptose inhibieren, verhindern. Um zu untersuchen, ob die JNK-Aktivierung durch TNF-induzierte Nekrose oder Apoptose vermittelt wird, wurden Experimente mit dem Caspaseinhibitor z-VAD-fmk und dem Radikalfänger BHA durchgeführt (Abb. 27, 30, 33). In den humanen NF κ B-inhibierten Zellen wurde das andauernde JNK-Signal durch z-VAD-fmk komplett gehemmt (Abb. 30), wohingegen die Apoptoseinduktion je nach Zelltyp nur partiell zurückging (Jurkat 23%, KB 100%, HaCaT 35%) (Abb. 27). Auch die Inkubation mit dem Antioxidanten BHA führte zu Zelltyp-abhängigen Resultaten bezüglich der Hemmung von Nekrose und JNK. So wurde in den NEMO-defizienten MEF im Einklang mit den Literaturdaten eine nahezu komplette Inhibition der Nekrose und JNK nachgewiesen (Abb. 33) (Sakon et al., 2003). Bei den humanen Zelllinien zeigte sich hingegen bei einer unterschiedlich ausgeprägten Blockade der JNK-Aktivierung (Jurkat komplett, HaCaT partiell, KB nicht) keine Inhibierung der Nekrose durch BHA. Zudem konnte bei Experimenten, bei dem durch den pharmakologischen Inhibitor SP600125 die TNF-induzierte JNK-Induktion gehemmt wurde, keine proapoptotische Rolle von JNK nachgewiesen werden (Abb. 32). Zusammengefasst kann man somit feststellen, dass die TNF-induzierte andauernde JNK-Aktivierung Zelltyp-abhängig durch Caspasen und ROS reguliert wird, ohne selbst eine essentielle Rolle bei der Zelltod-Induktion zu spielen. Um zu untersuchen, wie die Caspasen die TNF-induzierte JNK-Induktion vermitteln, wurde zudem die Prozessierung zahlreicher Caspasesubstrate untersucht (Abb. 25, 29C, 31). Wie in Kapitel 1.3 detaillierter beschrieben, können durch die Caspase-abhängige Spaltung von MEKK-1 und p21WAF/Cip 1 JNK-stimulierende Fragmente generiert werden. Da die Spaltung dieser Proteine auch in den NF κ B-inhibierten Jurkat-, HaCaT-, und KB-Zellen nachgewiesen werden konnte, deutet dies auf eine mögliche Rolle dieser Fragmente bei der TNF-

induzierten persistierenden JNK-Aktivierung in diesen Zelllinien hin (Abb.29C, 31). Aus der Literatur sind zudem zahlreiche weitere Mechanismen bekannt, wie NF κ B-Induktion, Apoptose und Nekrose miteinander verknüpft sind, sich gegenseitig beeinflussen und somit die andauernde Aktivierung von JNK induzieren bzw. regulieren können: Caspasen können a) durch die Spaltung von RIP Nekrose inhibieren (Holler et al., 2000; Ting et al., 1996; Kelliher et al., 1998); b) durch Prozessierung zahlreicher Proteine (z.B. RIP) NF κ B-Induktion direkt inhibieren (Wajant et al., 2003f) c) durch die Spaltung von PARP und p75 (Ricci et al., 2004) die Balance von Apoptose zu Nekrose verschieben. NF κ B kann durch a) die Expression von Radikalfängern (z.B. MnSOD, FHC) (Nakano, 2004) Nekrose inhibieren b) die Expression von antiapoptotischen Proteinen (z.B. IAPs, Flip-L) Apoptose inhibieren. Die molekularen Mechanismen der TNF-induzierten Aktivierung von JNK sowie deren Regulation durch NF κ B der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien sind in Abbildung 35 dargestellt.

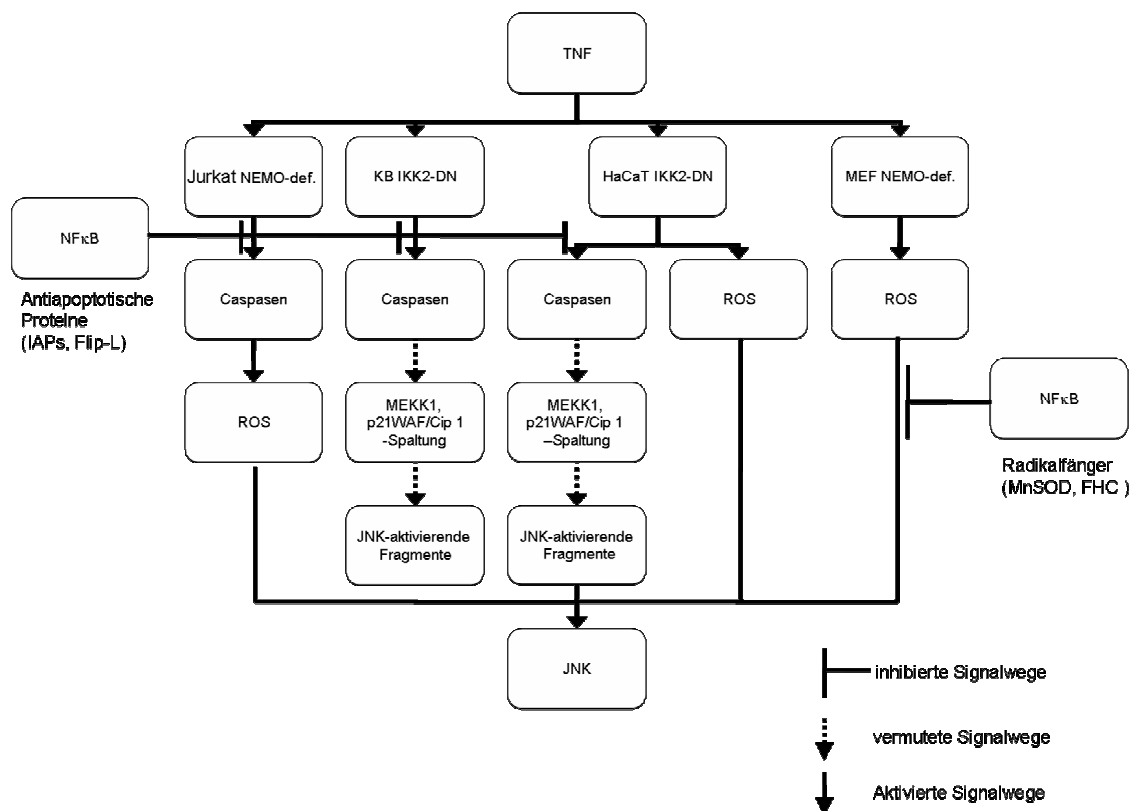


Abbildung 35: Die molekularen Mechanismen der TNF-vermittelten andauernden JNK-Aktivierung in Jurkat-, KB- HaCaT- und MEF-Zellen. Während in MEF-Zellen die JNK-Induktion ausschließlich ROS-abhängig verläuft, spielen in den humanen Zelllinien vor allem Caspase-abhängige Prozesse (Spaltung in JNK-aktivierende Fragmente, Generierung von ROS) eine Rolle. Außerdem ist die JNK-inhibierende Wirkung von NFκB in den humanen Zellen im Gegensatz zu den MEF-Zellen in erster Linie auf die Verhinderung der Apoptose (z.B. IAPs, Flip-L) und nicht auf die Expression von Radikalfängern (z.B. MnSOD, FHC) zurückzuführen.

6. Zusammenfassung

TNF (Tumor Nekrose Faktor) vermittelt seine biologischen Funktionen durch Interaktionen mit TNFR1 (TNFRezeptor 1) und TNFR2 (TNFRezeptor 2). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der TNFR2 sowohl durch die Induktion von membrangebundenem TNF als auch durch die proteasomale Degradation von TRAF2 (TNFRezeptor-assoziiertes Faktor 2) die TNFR1-vermittelte Apoptose verstärken kann. Des Weiteren war bekannt, dass TRAF1 (TNFRezeptor-assoziiertes Faktor 1), ein anderes Mitglied der TRAF-Familie, mit TRAF2 Heterotrimer bilden kann und zudem nach TNF-induzierter NF κ B- (nuclear factor kappaB) Aktivierung verstärkt exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass TRAF1 in beide TNFR-Signalkomplexe rekrutiert wird und darin in einem TRAF2/TRAF1-Heterotrimer TRAF2 funktionell ersetzen kann. Darüber hinaus verhindert TRAF1 die Rekrutierung von TRAF2 in *lipid rafts* sowie dessen anschließende proteasomale Degradation. Auf diese Weise kann TRAF1 die TNFR2-abhängige Verstärkung der TNFR1-induzierten Apoptose verhindern.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die TNF-vermittelte Aktivierung der JNK (c-Jun N-terminale Kinase), dessen Regulation durch ROS (reactive oxygen species), Caspasen (Cysteinyl-Aspartat-spezifische Proteasen) sowie NF κ B-induzierte Faktoren untersucht. TNF induziert in den meisten Zellen zunächst nach zehn bis 30 Minuten eine transiente JNK-Aktivierung, woraufhin bei NF κ B-inhibierten Zellen eine zweite andauernde JNK-Aktivierung folgt. Die meisten in der Literatur beschriebenen Studien gehen dabei von einem ROS-abhängigen, Caspase-unabhängigen Mechanismus der persistierenden JNK-Aktivierung aus. Des Weiteren wurde in den vor allem bei embryonale Mausfibroblasten durchgeführten Untersuchungen davon ausgegangen, dass bestimmte NF κ B-induzierte Radikalfänger die andauernde Aktivierung der JNK verhindern. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in den humanen Zelllinien KB, Jurkat und HaCaT die andauernde Aktivierung der JNK, im Gegensatz zur transienten JNK-Aktivierung, Caspase-abhängig verläuft. Es ergab sich überdies, dass die inhibierende Wirkung des NF κ B-Signalweges auf die persistierende JNK-Aktivierung in diesen Zelllinien in erster Linie auf die indirekte Verhinderung der Apoptose durch die Induktion von antiapoptotischen Proteinen wie Flip-L (FLICE-inhibitory protein long) und IAPs (inhibitor of apoptosis) zurückzuführen ist, als auf die direkte Expression von Radikalfängern. Zudem wurde in den untersuchten Zelllinien die Caspase-vermittelte

Spaltung von MEKK-1 (MAP/ERK kinase kinase-1) und p21WAF/Cip 1 nachgewiesen, von denen bekannt ist, dass die Spaltprodukte eine JNK-stimulierende Wirkung haben. Dennoch müssen künftige Studien zeigen, ob die Spaltung von p21WAF/Cip 1 und MEKK-1 in Fragmente mit JNK–stimulierender Aktivität oder andere Caspasesubstrate für die Caspase-vermittelte andauernde Aktivierung der JNK verantwortlich sind.

7. Summary

TNF (tumor necrosis factor) induces its biological functions by interactions with TNFR1 (TNF receptor 1) and TNFR2 (TNF receptor 2). In recent studies it has been shown that stimulation of TNFR2 results in an enhancement of the TNFR1-induced apoptosis. The reason of this finding is the transcriptional induction of membrane-bound TNF as well as the proteasomal degradation of TRAF2 (TNF receptor associated factor 2). Furthermore it was known that TRAF1 (TNF receptor associated factor 1), whose expression is induced by TNF mediated NF κ B (nuclear factor kappaB) activation, can interact with TRAF2. In the first part of this thesis it could be demonstrated that TRAF1 co-recruits with TRAF2 to TNFR1 and TNFR2 without affecting the downstream signalling pathways. Moreover, TRAF1 expression inhibits TNFR2 induced recruitment of TRAF2 into *lipid rafts* and its subsequent depletion. In this manner, TRAF1 abrogates the TNFR2-mediated enhancement of TNFR1-induced apoptosis.

In the second part of this thesis the TNF-induced activation of JNK (c-Jun N-terminal kinase) as well as its regulation by ROS (reactive oxygen species), caspases (cysteinyln-aspartat-specific proteases) and NF κ B-induced proteins were examined. In most cell types TNF induces a transient activation of the JNK pathway, whereas in NF κ B-inhibited cells a second sustained activation of JNK is observed. Based on previous studies, it has been suggested that TNF-induced prolonged JNK activation is predominantly mediated by ROS. Moreover, in some studies based on mouse embryonal fibroblasts it has been suggested that expression of NF κ B-induced antioxidants prevents prolonged JNK activation upon TNF stimulation. In this thesis it could be shown in various human cellular systems, including KB, Jurkat and HaCaT, that TNF-induced prolonged activation of JNK is in contrast to the transient activation mediated by caspases. Furthermore, it was demonstrated that NF κ B induction inhibits the TNF-induced prolonged JNK activation indirectly by inhibiting apoptosis rather than directly by expression of antioxidants. In addition, caspase-dependent cleavage of MEKK-1 (MAP/ERK kinase kinase-1) and p21WAF/Cip 1 was found in these cellular systems. As it is known from previous studies, cleavage of these proteins results in fragments with high JNK-stimulating activity, these caspase substrates could therefore play an important role in TNF-induced prolonged JNK-activation. However, further studies have to evaluate if the cleavage of MEKK-1 and p21WAF/Cip 1 or other

caspase substrates mediates the TNF-induced caspase-dependent prolonged JNK-activation.

8. Literaturverzeichnis

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

Arron, J.R., Pewzner-Jung, Y., Walsh, M.C., Kobayashi, T., and Choi, Y. (2002). Regulation of the subcellular localization of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)2 by TRAF1 reveals mechanisms of TRAF2 signaling. *J. Exp. Med.* 196, 923-934.

Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.J., Broger, C., Loetscher, H., and Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73, 431-445.

Bennett, B.L., Sasaki, D.T., Murray, B.W., O'Leary, E.C., Sakata, S.T., Xu, W., Leisten, J.C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S.S., Manning, A.M., and Anderson, D.W. (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 13681-13686.

Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J., and Cerretti, D.P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729-733.

Blam, M.E., Stein, R.B., and Lichtenstein, G.R. (2001). Integrating anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease: current and future perspectives. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 1977-1997.

Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherland, D.P., Green, D.R., and Salvesen, G.S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell* 11, 529-541.

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

Brink, R. and Lodish, H.F. (1998). Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 2A (TRAF2A), a TRAF2 splice variant with an extended RING finger domain that inhibits TNFR2-mediated NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 273, 4129-4134.

Cardone, M.H., Salvesen, G.S., Widmann, C., Johnson, G., and Frisch, S.M. (1997). The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 90, 315-323.

Carpentier, I. and Beyaert, R. (1999). TRAF1 is a TNF inducible regulator of NF-kappaB activation. *FEBS Lett.* 460, 246-250.

Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 72, 3666-3670.

- Chai,J., Du,C., Wu,J.W., Kyin,S., Wang,X., and Shi,Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855-862.
- Chan,F.K., Chun,H.J., Zheng,L., Siegel,R.M., Bui,K.L., and Lenardo,M.J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351-2354.
- Chang,L., Kamata,H., Solinas,G., Luo,J.L., Maeda,S., Venuprasad,K., Liu,Y.C., and Karin,M. (2006). The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 124, 601-613.
- Chang,L. and Karin,M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.
- Chen,Y.R., Wang,X., Templeton,D., Davis,R.J., and Tan,T.H. (1996). The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J. Biol. Chem.* 271, 31929-31936.
- Chen,Z.J. (2005). Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat. Cell Biol.* 7, 758-765.
- Cheng,G. and Baltimore,D. (1996). TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD 40L-mediated NF-kappaB activation. *Genes Dev.* 10, 963-973.
- Chung,H.R., Schafer,U., Jackle,H., and Bohm,S. (2002). Genomic expansion and clustering of ZAD-containing C2H2 zinc-finger genes in Drosophila. *EMBO Rep.* 3, 1158-1162.
- Dadgostar,H. and Cheng,G. (1998). An intact zinc ring finger is required for tumor necrosis factor receptor-associated factor-mediated nuclear factor-kappaB activation but is dispensable for c-Jun N-terminal kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 24775-24780.
- Davis,R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell.* 103, 239-252.
- Deak,J.C., Cross,J.V., Lewis,M., Qian,Y., Parrott,L.A., Distelhorst,C.W., and Templeton,D.J. (1998). Fas-induced proteolytic activation and intracellular redistribution of the stress-signaling kinase MEKK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 5595-5600.
- Dempsey,P.W., Doyle,S.E., He,J.Q., and Cheng,G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 193-209.
- Deng,L., Wang,C., Spencer,E., Yang,L., Braun,A., You,J., Slaughter,C., Pickart,C., and Chen,Z.J. (2000). Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103, 351-361.
- Deng,Y., Ren,X., Yang,L., Lin,Y., and Wu,X. (2003). A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* 115, 61-70.

Derijard,B., Raingeaud,J., Barrett,T., Wu,I.H., Han,J., Ulevitch,R.J., and Davis,R.J. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267, 682-685.

DiDonato,J.A., Hayakawa,M., Rothwarf,D.M., Zandi,E., and Karin,M. (1997). A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 388, 548-554.

Fotin-Mleczek,M., Henkler,F., Hausser,A., Glauner,H., Samel,D., Granness,A., Scheurich,P., Mauri,D., and Wajant,H. (2004). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1 regulates CD40-induced TRAF2-mediated NF- κ B 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., and 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.

Freemont,P.S. (2000). RING for destruction? *Curr. Biol.* 10, R84-R87.

Ghosh,S. and Karin,M. (2002). Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 109 *Suppl.*, S81-S96.

Giorgio,M., Migliaccio,E., Orsini,F., Paolucci,D., Moroni,M., Contursi,C., Pelliccia,G., Luzi,L., Minucci,S., Marcaccio,M., Pinton,P., Rizzuto,R., Bernardi,P., Paolucci,F., and Pelicci,P.G. (2005). Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 122, 221-233.

Grech,A., Quinn,R., Srinivasan,D., Badoux,X., and Brink,R. (2000). Complete structural characterisation of the mammalian and *Drosophila* TRAF genes: implications for TRAF evolution and the role of RING finger splice variants. *Mol. Immunol.* 37, 721-734.

Grell,M., Becke,F.M., Wajant,H., Mannel,D.N., and Scheurich,P. (1998). TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur. J. Immunol.* 28, 257-263.

Grell,M., Douni,E., Wajant,H., Lohden,M., Clauss,M., Maxeiner,B., Georgopoulos,S., Lesslauer,W., Kollias,G., Pfizenmaier,K., and . (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83, 793-802.

Grell,M., Zimmermann,G., Gottfried,E., Chen,C.M., Grunwald,U., Huang,D.C., Wu Lee,Y.H., Durkop,H., Engelmann,H., Scheurich,P., Wajant,H., and Strasser,A. (1999). Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J.* 18, 3034-3043.

Guo,Y.L., Kang,B., and Williamson,J.R. (1998). Inhibition of the expression of mitogen-activated protein phosphatase-1 potentiates apoptosis induced by tumor necrosis factor- α in rat mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 273, 10362-10366.

Habelhah,H., Takahashi,S., Cho,S.G., Kadoya,T., Watanabe,T., and Ronai,Z. (2004). Ubiquitination and translocation of TRAF2 is required for activation of JNK but not of p38 or NF-kappaB. *EMBO J.* 23, 322-332.

Ham,Y.M., Choi,J.S., Chun,K.H., Joo,S.H., and Lee,S.K. (2003). The c-Jun N-terminal kinase 1 activity is differentially regulated by specific mechanisms during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 50330-50337.

Harper,N., Hughes,M., MacFarlane,M., and Cohen,G.M. (2003). Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 25534-25541.

Hengartner,M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

Henkler,F., Baumann,B., Fotin-Mleczek,M., Weingartner,M., Schwenzler,R., Peters,N., Graness,A., Wirth,T., Scheurich,P., Schmid,J.A., and 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.

Hibi,M., Lin,A., Smeal,T., Minden,A., and Karin,M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 7, 2135-2148.

Holler,N., Zaru,R., Micheau,O., Thome,M., Attinger,A., Valitutti,S., Bodmer,J.L., Schneider,P., Seed,B., and Tschopp,J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* 1, 489-495.

Hsu,H., Huang,J., Shu,H.B., Baichwal,V., and Goeddel,D.V. (1996a). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity.* 4, 387-396.

Hsu,H., Shu,H.B., Pan,M.G., and Goeddel,D.V. (1996b). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299-308.

Hsu,H., Xiong,J., and Goeddel,D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495-504.

Irmeler,M., Steiner,V., Ruegg,C., Wajant,H., and Tschopp,J. (2000). Caspase-induced inactivation of the anti-apoptotic TRAF1 during Fas ligand-mediated apoptosis. *FEBS Lett.* 468, 129-133.

Kamata,H., Honda,S., Maeda,S., Chang,L., Hirata,H., and Karin,M. (2005). Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 120, 649-661.

Karin,M. and Lin,A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* 3, 221-227.

- Kelliher, M.A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B.Z., and Leder, P. (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity*. *8*, 297-303.
- Kidd, V.J., Lahti, J.M., and Teitz, T. (2000). Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* *11*, 191-201.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* *14*, 5579-5588.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzell, E., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* *275*, 1132-1136.
- Kreuz, S., Siegmund, D., Rumpf, J.J., Samel, D., Leverkus, M., Janssen, O., Hacker, G., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Scheurich, P., and 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., and Wajant, H. (2001). NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol. Cell Biol.* *21*, 3964-3973.
- Lamb, J.A., Ventura, J.J., Hess, P., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2003). JunD mediates survival signaling by the JNK signal transduction pathway. *Mol. Cell* *11*, 1479-1489.
- Legler, D.F., Micheau, O., Doucey, M.A., Tschopp, J., and Bron, C. (2003). Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Immunity*. *18*, 655-664.
- Leitges, M., Sanz, L., Martin, P., Duran, A., Braun, U., Garcia, J.F., Camacho, F., Diaz-Meco, M.T., Rennert, P.D., and Moscat, J. (2001). Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. *Mol Cell* *8*, 771-780.
- Li, H., Kobayashi, M., Blonska, M., You, Y., and Lin, X. (2006). Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation. *J Biol. Chem.* *281*, 13636-13643.
- Li, X., Yang, Y., and Ashwell, J.D. (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* *416*, 345-347.
- Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F.X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G.L., and Karin, M. (1995). Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* *268*, 286-290.
- Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., and Kyriakis, J.M. (2000). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol Cell Biol* *20*, 2198-2208.

Liu,H., Su,Y.C., Becker,E., Treisman,J., and Skolnik,E.Y. (1999). A Drosophila TNF-receptor-associated factor (TRAF) binds the ste20 kinase Misshapen and activates Jun kinase. *Curr. Biol.* 9, 101-104.

Loetscher,H., Stueber,D., Banner,D., Mackay,F., and Lesslauer,W. (1993). Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. *J. Biol. Chem.* 268, 26350-26357.

Lu,G., Beuerman,R.W., Zhao,S., Sun,G., Nguyen,D.H., Ma,S., and Kline,D.G. (1997). Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 induce activation of MAP kinase and SAP kinase in human neuroma fibroblasts. *Neurochem. Int.* 30, 401-410.

Luo,J.L., Kamata,H., and Karin,M. (2005). IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin. Invest.* 115, 2625-2632.

Malinin,N.L., Boldin,M.P., Kovalenko,A.V., and Wallach,D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385, 540-544.

Mannel,D.N. and Echtenacher,B. (2000). TNF in the inflammatory response. *Chem. Immunol.* 74, 141-161.

Mercurio,F., Zhu,H., Murray,B.W., Shevchenko,A., Bennett,B.L., Li,J., Young,D.B., Barbosa,M., Mann,M., Manning,A., and Rao,A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278, 860-866.

Micheau,O. and Tschopp,J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181-190.

Naismith,J.H. and Sprang,S.R. (1998). Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem. Sci.* 23, 74-79.

Nakajima,A., Komazawa-Sakon,S., Takekawa,M., Sasazuki,T., Yeh,W.C., Yagita,H., Okumura,K., and Nakano,H. (2006). An antiapoptotic protein, c-FLIPL, directly binds to MKK7 and inhibits the JNK pathway. *EMBO J* 25, 5549-5559.

Nakano,H. (2004). Signaling crosstalk between NF-kappaB and JNK. *Trends Immunol.* 25, 402-405.

Park,S.M., Yoon,J.B., and Lee,T.H. (2004). Receptor interacting protein is ubiquitinated by cellular inhibitor of apoptosis proteins (c-IAP1 and c-IAP2) in vitro. *FEBS Lett.* 566, 151-156.

Pham,C.G., Bubici,C., Zazzeroni,F., Papa,S., Jones,J., Alvarez,K., Jayawardena,S., De Smaele,E., Cong,R., Beaumont,C., Torti,F.M., Torti,S.V., and Franzoso,G. (2004). Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell* 119, 529-542.

Regnier,C.H., Tomasetto,C., Moog-Lutz,C., Chenard,M.P., Wendling,C., Basset,P., and Rio,M.C. (1995). Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J. Biol. Chem.* 270, 25715-25721.

- Ricci, J.E., Munoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G.A., Yadava, N., Scheffler, I.E., Ellisman, M.H., and Green, D.R. (2004). Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 117, 773-786.
- Rothe, M., Pan, M.G., Henzel, W.J., Ayres, T.M., and Goeddel, D.V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83, 1243-1252.
- Sakon, S., Xue, X., Takekawa, M., Sasazuki, T., Okazaki, T., Kojima, Y., Piao, J.H., Yagita, H., Okumura, K., Doi, T., and Nakano, H. (2003). NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J.* 22, 3898-3909.
- Sanchez, I., Hughes, R.T., Mayer, B.J., Yee, K., Woodgett, J.R., Avruch, J., Kyriakis, J.M., and Zon, L.I. (1994). Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* 372, 794-798.
- Sanchez, I., Xu, C.J., Juo, P., Kakizaka, A., Blenis, J., and Yuan, J. (1999). Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* 22, 623-633.
- Saurin, A.J., Borden, K.L., Boddy, M.N., and Freemont, P.S. (1996). Does this have a familiar RING? *Trends Biochem. Sci.* 21, 208-214.
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwender, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D., and Schutze, S. (2004). Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity*. 21, 415-428.
- Schwenzer, R., Siemienski, K., Liptay, S., Schubert, G., Peters, N., Scheurich, P., Schmid, R.M., and Wajant, H. (1999). The human tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 1 gene (TRAF1) is up-regulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 19368-19374.
- Simons, K. and van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27, 6197-6202.
- Song, H.Y., Regnier, C.H., Kirschning, C.J., Goeddel, D.V., and Rothe, M. (1997). Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 9792-9796.
- Speiser, D.E., Lee, S.Y., Wong, B., Arron, J., Santana, A., Kong, Y.Y., Ohashi, P.S., and Choi, Y. (1997). A regulatory role for TRAF1 in antigen-induced apoptosis of T cells. *J. Exp. Med.* 185, 1777-1783.
- Speiser, D.E., Sebzda, E., Ohteki, T., Bachmann, M.F., Pfeffer, K., Mak, T.W., and Ohashi, P.S. (1996). Tumor necrosis factor receptor p55 mediates deletion of peripheral cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Eur. J. Immunol.* 26, 3055-3060.

- Takeuchi, M., Rothe, M., and Goeddel, D.V. (1996). Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J. Biol. Chem.* *271*, 19935-19942.
- Taylor, P.C., Williams, R.O., and Maini, R.N. (2000). Anti-TNF alpha therapy in rheumatoid arthritis--current and future directions. *Curr. Dir. Autoimmun.* *2*, 83-102.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* *281*, 1312-1316.
- Ting, A.T., Pimentel-Muinos, F.X., and Seed, B. (1996). RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J.* *15*, 6189-6196.
- Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., and Ichijo, H. (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.* *2*, 222-228.
- Tournier, C., Dong, C., Turner, T.K., Jones, S.N., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2001). MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev.* *15*, 1419-1426.
- Tsitsikov, E.N., Laouini, D., Dunn, I.F., Sannikova, T.Y., Davidson, L., Alt, F.W., and Geha, R.S. (2001). TRAF1 is a negative regulator of TNF signaling. enhanced TNF signaling in TRAF1-deficient mice. *Immunity.* *15*, 647-657.
- Varfolomeev, E.E. and Ashkenazi, A. (2004). Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* *20;116*, 491-497.
- Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K.B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P., and Wallach, D. (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity.* *9*, 267-276.
- Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D., and Miyamoto, S. (1995). Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* *9*, 2723-2735.
- Wajant, H., Henkler, F., and 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., Muhlenbeck, F., and Scheurich, P. (1998). Identification of a TRAF (TNF receptor-associated factor) gene in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Evol.* *47*, 656-662.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death. Differ.* *10*, 45-65.
- Wajant, H. and Scheurich, P. (2001). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *33*, 19-32.

- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., and 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.
- Weingartner, M., Siegmund, D., Schlecht, U., Fotin-Mleczek, M., Scheurich, P., and Wajant, H. (2002). Endogenous membrane tumor necrosis factor (TNF) is a potent amplifier of TNF receptor 1-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 34853-34859.
- Weiss, T., Grell, M., Hessabi, B., Bourteele, S., Muller, G., Scheurich, P., and Wajant, H. (1997). Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80: requirement of the TNF receptor-associated factor-2 binding site. *J. Immunol.* 158, 2398-2404.
- Wicovsky, A., Muller, N., Daryab, N., Marienfeld, R., Kneitz, C., Kavuri, S., Leverkus, M., Baumann, B., and Wajant, H. (2006). Sustained JNK activation in response to TNF is mediated by caspases in a cell type-specific manner. *J Biol. Chem.* 282, 2174-2183
- Wong, G.H., Elwell, J.H., Oberley, L.W., and Goeddel, D.V. (1989). Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 58, 923-931.
- Wu, C.J., Conze, D.B., Li, X., Ying, S.X., Hanover, J.A., and Ashwell, J.D. (2005). TNF-alpha induced c-IAP1/TRAF2 complex translocation to a Ubc6-containing compartment and TRAF2 ubiquitination. *EMBO J.* 24, 1886-1898.
- Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., and Dunlop, D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142, 67-77.
- Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J., and Israel, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the IkkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93, 1231-1240.
- Yeh, W.C., Pompa, J.L., McCurrach, M.E., Shu, H.B., Elia, A.J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El Deiry, W.S., Lowe, S.W., Goeddel, D.V., and Mak, T.W. (1998). FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279, 1954-1958.
- 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., and 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.
- Zapata, J.M., Matsuzawa, S., Godzik, A., Leo, E., Wasserman, S.A., and Reed, J.C. (2000). The Drosophila tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 (DTRAF1) interacts with Pelle and regulates NFkappaB activity. *J. Biol. Chem.* 275, 12102-12107.
- Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N.H., and Winoto, A. (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392, 296-300.

Zhao, Y., Conze, D.B., Hanover, J.A., and Ashwell, J.D. (2007). Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) signaling induces selective c-IAP1-dependent ASK1 ubiquitination and terminates MAP kinase signaling. *Journal of Biological Chemistry* M609146200.

Zheng, L., Fisher, G., Miller, R.E., Peschon, J., Lynch, D.H., and Lenardo, M.J. (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377, 348-351.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ASK-1	apoptosis-signal-regulating kinase-1
APS	Ammoniumpersulfat
BHA	butylated hydroxyansiole
bzw.	beziehungsweise
cFLIP	cellular FLIP
°C	Grad Celcius
Caspase	cysteinyl-aspartate-specific proteinases
cm ²	Quadratzenimeter
DD	death domain
DED	death effector domain
CHX	Cycloheximid
DcR1	decoy receptor 1 (=TRAILR3, TRID)
DcR2	decoy receptor 2 (=TRAILR4)
DISC	death-inducing-signaling-complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR3	death receptor 3 (=Apo3, TRAMP, WSL-1, LARD)
DR4	death receptor 4 (=TRAILR1)
DR5	death receptor 4 (=TRAILR2, TRICK2, KILLER)
DR6	death receptor 6
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetra-Essigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FasL	Fas-Ligand
FCS	fötales Kälber-Serum
FADD	Fas-associating protein with a death domain (=MORT)

FLICE	FADD-like ICE (=MACH, Caspase-8)
FLIP	FLICE-inhibitory protein
FLIP-L	FLIP-long
GFP	green fluorescent protein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HVEM	Herpesvirus entry mediator (=ATR, TR2)
HEPES	2-[4-(2Hydroxyethyl)-1-piperazino]-Ethansulfonsäure
IAP	inhibitor of apoptosis
IL	Interleukin
IKK α , β	I κ B Kinase α , β (=IKK1, IKK2)
IKK γ	I κ B Kinase γ (=NEMO, IKK3)
I κ B	inhibitor of NF κ B
JNK	c-Jun N-terminal Kinase (=SAPK, stress-activated protein kinase)
kDa	Kilo-Dalton
kb	Kilo-Basenpaare
LT	Lymphotoxin
LT β R	Lymphotoxin- β Rezeptor
LARD	lymphocyte-associated receptor of death (=DR3, Apo3, TRAMP, WSL-1)
LIGHT	homologous to lymphotoxins, inducible expression, binds to HVEM, a receptor on T-lymphocytes
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
mTNF/sTNF	membranständiges / lösliches TNF
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAP2K	mitogen-activated protein kinase kinase
MAP3K	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MEF	embryonale Mausfibroblasten
MEKK-1	MAP/ERK kinase kinase-1
MKK-7	MAPKinase-Kinase-7
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NIK	NF κ B-inducing kinase
NEMO	NF κ B essential modulator (=IKK γ)

NFκB	nuclear factor kappaB
OPG	osteoprotegerin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	poly-(ADP)-ribose polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PLAD	pre-ligand assembly domain
RANK	receptor activator of NFκB
RANK-L	RANK-ligand (=TRANCE)
RHD	Rel homolgy domain
RIP	receptor interacting protein
Rpm	revolultions per minute
ROS	reactive oxygen species
SDS	Natriumdodecylsulfat
TACE	TNF alpha converting enzyme
TBS	TRIS-gepufferte Saline
TANK	TRAF family member associated NFκB activator
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	TNFRezeptor, TNFRezeptoren
TRAF	TNF receptor associated factor
TRADD	TNFR1 associated death omain
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand (=Apo2L)
TRAILR1	TRAIL receptor 1 (=DR4)
TRAILR2	TRAIL receptor 2 (=DR5, TRICK2, KILLER)
TRAILR3	TRAIL receptor 3 (=DcR1, TRID)
TRAILR4	TRAIL receptor 4 (=DcR2)
TRANCE	TNF-related activation-induced cytokine (=RANK-L)
TRID	TRAIL receptor without an intracellular domain ^ (=TRAILR3, DcR1)
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TWEAK	TNF related, weak ability to induce apoptosis
u.a.	unter anderem
μl	μliter
z.B.	zum Beispiel
Z-VAD-fmk	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-Keton

9.2 Publikationen

Henkler,F., Behrle,E., Dennehy,K.M., Wicovsky,A., Peters,N., Warnke,C., Pfizenmaier,K., and Wajant,H. (2005). The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability. *J Cell Biol.* 168, 1087-1098.

Siegmund,D., Wicovsky,A., Schmitz,I., Schulze-Osthoff,K., Kreuz,S., Leverkus,M., Dittrich-Breiholz,O., Kracht,M., and 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.

Wicovsky,A., Siegmund,D., and Wajant,H. (2005). Interferons induce proteolytic degradation of TRAILR4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337, 184-190.

Wicovsky,A., Muller,N., Daryab,N., Marienfeld,R., Kneitz,C., Kavuri,S., Leverkus,M., Baumann,B., and Wajant,H. (2007). Sustained JNK activation in response to tumor necrosis factor is mediated by caspases in a cell type-specific manner. *J. Biol. Chem.* 282, 2174-2183.

Wicovsky,A.,Henkler,F., and Wajant,H. TNF receptor associated factor 1 (TRAF1) decouples the crosstalk between TNFR1 and TNFR2. *J. Biol. Chem* in revision

9.3 Lebenslauf

Name	Andreas Armin Wicovsky
Geburtsdatum	20.04.1978
Geburtsort	Albstadt-Ebingen
Adresse	Hauptstrasse 70, 97218 Gerbrunn
Familienstand	ledig

Schulbildung

09.1984-07.1988	Grundschule Lichtenfels
09.1988-06.1997	Meranier-Gymnasium-Lichtenfels

Zivildienst

07.1997-08.1998	Klinikum Lichtenfels
-----------------	----------------------

Studium

10.1998-09.2003	Studium der Diplombiologie an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg (Schwerpunkte: Genetik und Neurobiologie, Biochemie und Virologie und Immunbiologie)
10.2002-08.2003	Diplomarbeit am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg unter Leitung von Prof. Dr. Schimpl mit dem Titel „Die Rolle der Caspasen beim Antigenrezeptor-vermittelten Proliferationsstopp der WEHI 231 Zellen“
Seit 09.2003	Promotion unter Betreuung von Prof. Dr. Wajant an der Medizinischen Poliklinik II der Universität Würzburg in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin mit dem Titel „Die Rolle von TRAF1 und JNK bei der TNF-vermittelten Apoptose“