

**Aus dem Institut für Molekulare Innere Medizin  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Harald Wajant**

**Mechanismen TNF-induzierter Genexpression**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Clemens Warnke  
aus Würzburg**

**Würzburg, Juni 2007**

## **Referentenblatt**

**Referent:** Prof. Dr. rer. nat. Harald Wajant

**Koreferent:** Prof. Dr. med. Peter Rieckmann

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**03.08.2007**

**Der Promovend ist Arzt.**

1. Einleitung	1
1.1 TNF und seine Rezeptoren	1
1.2 NF $\kappa$ B-Aktivierung über TNFR1	2
1.3 Apoptoseinduktion über TNFR1	3
1.4 Regulationsmechanismen TNFR1-vermittelter Apoptoseinduktion	6
1.5 Lösliches TNF als Spaltprodukt von membranständigem TNF	6
1.6 Der apoptotische Crosstalk von TNFR1 und TNFR2	8
1.7 Rezeptorselektive und membranständige TNF-Varianten	10
1.8 Zielsetzung und Fragestellungen der vorliegenden Arbeit	10
2. Materialien	11
2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien	11
2.2 Antikörper und Antiseren	11
2.3 Zelllinien	12
2.4 Expressionsplasmide	12
2.5 Lösungen und Puffer	13
3. Experimentalmethoden	14
3.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen	14
3.2 Transiente Transfektion mittels Elektroporation	14
3.3 Transiente Transfektion mittels Lipofektamine	14
3.4 Ermittlung der TNFR1-vermittelten Zytotoxizität im Kristallviolett-Zytotoxizitäts-Assay	15
3.4.1 Aussaat und Stimulation	15
3.4.2 Färbung	15
3.5 Durchflusszytometrie	15
3.5.1 Überprüfung der Transfektionseffizienz	16
3.5.2 FACS-Färbung zur selektiven Bindung löslicher Liganden an Hela-Zellen	16
3.5.3 FACS-Färbung zur selektiven Bindung an TNFR1-Fc und TNFR2-Fc	16
3.6 Messung der IL8-Induktion im ELISA	16
3.6.1 Transfektion und Kokultur	16
3.6.2 Detektion	17
3.7 Messung der sTNF-Produktion im TNF-ELISA	17
3.7.1 Transfektion und Kokultur	17

3.7.2 Detektion	18
3.8 GST-Fishing von Rezeptorkomplexen nach $\Delta 1$ -12TNF-Stimulation	18
3.8.1 Kokultur und Herstellung der Gesamtzellysate für GST-Fishing	18
3.8.2 GST-Fishing der Signalkomplexe	18
3.9 Western-Blot	19
3.9.1 SDS-PAGE	19
3.9.2 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membran	19
3.9.3 Immunofärbung von Westernblots	19
3.9.4 Peroxidasenachweis mittels ECL	20
4. Ergebnisse	21
4.1 Charakterisierung löslicher Flag-TNF-Muteine	21
4.1.1 Charakterisierung der Rezeptorspezifität löslicher Flag-TNF-Muteine	21
4.1.2 Charakterisierung der Funktionalität löslicher Flag-TNF-Muteine	23
4.2 Charakterisierung membrangebundener $\Delta 1$ -12TNF-Muteine	25
4.2.1 Die $\Delta 1$ -12-Mutation schützt vor mTNF-Spaltung	25
4.2.2 Die membranständigen $\Delta 1$ -12TNF-Muteine interagieren selektiv mit TNFR1 und TNFR2	28
4.2.3 $\Delta 1$ -12TNF induziert wie sTNF IL8	29
4.2.4 Die Kinetik der $\Delta 1$ -12TNF- und der sTNF-induzierten IL8-Induktion unterscheiden sich nicht	34
4.3 Untersuchung $\Delta 1$ -12TNF-induzierter Rezeptorsignalkomplexe	35
4.3.1 GST-Flag-YFP- $\Delta 1$ -12TNF-Muteine lassen sich effizient durch GST-Fishing und Flag-IP isolieren	35
4.3.2 Aus den mit GST-Flag-YFP- $\Delta 1$ -12TNF-Muteinen stimulierten Zielzellen lassen sich rezeptorassoziierte Proteine koimmunopräzipitieren	35
4.3.3 Die TNFR1-TRADD-Assoziation zeigt im membrangebundenen Rezeptorsignalkomplex eine charakteristische Kinetik	37
5. Diskussion	39
5.1 Charakterisierung löslicher Flag-TNF-Muteine	39
5.2 Charakterisierung membrangebundener $\Delta 1$ -12TNF-Muteine	40
5.3 Vergleich sTNF- und $\Delta 1$ -12TNF-induzierter IL8-Induktion	41

5.4 Isolierung membrangebundener TNFR-Signalkomplexe	43
5.5 Die Rolle von TRADD im membrangebundenen TNFR1-Signalkomplex	45
5.6 Die TNFR1-vermittelte Apoptoseinduktion	46
6. Zusammenfassung	48
7. Abkürzungen	50
8. Literaturverzeichnis	52

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 TNF und seine Rezeptoren

Der Tumor Nekrose Faktor (TNF) ist ein pleiotropes Zytokin und seine Erforschung von hoher Relevanz sowohl für die biologische Grundlagenforschung wie auch für die Medizin. Gebildet wird TNF in zahlreichen Geweben, vorrangig von Makrophagen, aber auch von Lymphozyten, Mastzellen, Endothelzellen und Fibroblasten.<sup>1</sup> Bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) führen zur massiven Freisetzung von TNF. Bei der Entstehung des septischen Schocks kommt TNF eine entscheidende Rolle zu.<sup>2</sup> Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen ist TNF ein zentraler Mediator der pathologischen Effekte. So verwundert es nicht, dass TNF-neutralisierende Pharmaka wie *Etanercept* und *Infliximab* in die Therapie Eingang gefunden haben, insbesondere zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis und des Morbus Crohn.<sup>3, 4, 5</sup>

Der Name TNF rührt von der Eigenschaft her, in einigen Tiermodellen Nekrose von Tumoren auszulösen.<sup>6</sup> Der Einsatz von rekombinant hergestelltem TNF in der Tumorthherapie beim Menschen wird jedoch durch die hohe systemische Toxizität von TNF begrenzt.<sup>7</sup> Die unerwünschten Wirkungen von TNF reichen von grippeähnlichen Symptomen bis hin zu lebensbedrohlichen Schockzuständen.<sup>2</sup>

Neben entzündungsfördernden und destruierenden Signalwegen werden auch zahlreiche Wachstums- und Regenerationsvorgänge von TNF beeinflusst.<sup>1</sup> Zelluläre Eigenschaften, Rezeptorausstattung, Zeitpunkt und Dauer der TNF-Stimulation entscheiden darüber, ob destruierende oder proliferative Signalwege dominieren. Dies hilft auch zu verstehen, weshalb TNF-neutralisierende Pharmaka zwar bei der Behandlung der experimentellen Autoimmunenzephalitis<sup>8</sup>, einem Modell für entzündliche ZNS-Erkrankungen, erfolgreich eingesetzt werden konnten, nicht jedoch zur Therapie der Multiplen Sklerose.<sup>9</sup>

Vermehrte Kenntnisse über dieses Zytokin, welches am Entzündungsprozess, an der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Immunantwort, der Nekrose und der Apoptose (programmierter Zelltod) beteiligt ist, können daher neue Wege zum Verständnis zahlreicher Erkrankungen ebenso wie neue therapeutische Optionen eröffnen.<sup>10, 11</sup>

Will man die komplexe, oft zelltypspezifische Wirkung von TNF in vivo verstehen, gilt es, die gegenseitige Regulation und Beeinflussung der verschiedenen TNF-induzierten Signalwege näher zu ergründen. TNF übt seine biologische Funktion über die Bindung an zwei Mitglieder der TNFR-Superfamilie aus, TNFR1 und TNFR2. Die Mitglieder der TNFR-Superfamilie besitzen keine enzymatische Aktivität. Eingeteilt werden sie in Rezeptoren mit und ohne zytoplasmatische Todesdomäne (DD).<sup>12</sup> Rezeptoren mit DD sind in der Lage, mit anderen zytoplasmatischen DD-Proteinen zu interagieren und letztlich Apoptose über die Aktivierung von Caspasen zu induzieren. TNFR1 besitzt eine solche DD, TNFR2 hingegen nicht. TNFR1 wird in nahezu allen Geweben konstitutiv exprimiert. Die Expression von TNFR2 variiert dagegen in verschiedenen Geweben stark und findet sich typischer Weise in Zellen des Immunsystems. Beide Rezeptoren induzieren die Aktivierung von JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38-MAPK (mitogen-activated protein kinases) und NFκB (nuclear factor kappa B).<sup>1, 13</sup>

## **1.2 NFκB-Aktivierung über TNFR1**

Bei der dominierenden proinflammatorischen Rolle von TNF ist es nicht verwunderlich, dass die dafür essentiell wichtige NFκB-Aktivierung besonders gut charakterisiert ist. Dies gilt insbesondere für TNFR1. Der TNFR1 liegt vor Ligandenbindung in Form von präassoziierten Komplexen vor, die nicht signalisieren.<sup>14</sup> Die Ligandenbindung führt zur Reorganisation dieser präformierten Rezeptorkomplexe in Komplexe höherer Ordnung. Dabei kommt es zur Translokation von TNFR1 in *lipid rafts*. Bei *lipid rafts* handelt es sich um low-density-lipoprotein-, glykosphingolipid- und cholesterolreiche Membranmikrodomänen. Hier findet die Assoziation von TNFR1 mit den nachgeschalteten Proteinen, welche die intrazelluläre Signalkaskade starten, statt.<sup>15</sup> Als unentbehrlich für eine effiziente NFκB-Aktivierung gelten die TNFR1-assoziierten Proteine TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor 2) und RIP (Receptor-Interacting Kinase). Während in RIP-defizienten Zellen die TNF-induzierte NFκB-Aktivierung vollständig unterbleibt, ist sie in TRAF2-defizienten Zellen nur herabgesetzt.<sup>16, 17, 18, 19</sup> Allerdings wird dies durch eine teilweise Redundanz von TRAF2 mit TRAF5 erklärt, da in TRAF2/5 doppeldefizienten Zellen die NFκB-Aktivierung vollständig verloren geht.<sup>20</sup>

Rezeptorgebundenen TRADD (TNFR-Associated DD Protein) galt bisher als Plattform, welche die Bindung von TRAF2 und RIP an TNFR1 vermittelt.<sup>21, 22</sup> Experimente mit TRADD-defizienten Zellen zum genetischen Nachweis der Abhängigkeit der NFκB-Aktivierung von der TRADD-Rekrutierung sind jedoch nicht publiziert. Kürzlich wurde nun gezeigt, dass TRADD im Unterschied zur RIP und TRAF2 erst nach Rezeptorinternalisierung in TNFR1-Endozytosevesikeln, sogenannten TNF-Rezeptosomen, an TNFR1 bindet.<sup>23</sup> Da die Rezeptorinternalisierung keine Voraussetzung für die NFκB-Aktivierung ist, erfolgt die NFκB-Aktivierung entgegen bisheriger Vorstellungen möglicherweise ohne die Rekrutierung von TRADD.

NFκB liegt als Heterodimer im Zytoplasma vor. Seine Kernlokalisationssequenz wird jedoch durch die Bindung von I-κBα (Inhibitor of κBα) maskiert. Daher erklärt man die NFκB-Aktivierung mit der Rekrutierung eines Kinasekomplexes in den TNFR1-Signalkomplex, der anschließend die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von I-κBα bewirkt. Auf diese Weise wird die Kernlokalisationssequenz des NFκB-Heterodimers demaskiert und der Translokation in den Zellkern steht nichts mehr im Wege. Folglich wird der NFκB-aktivierende Kinasekomplex auch als I-κB-Kinase- (IKK-) Komplex bezeichnet. Er besteht aus IKK1 (IKKα), IKK2 (IKKβ), Nemo (NFκB Essential Modulator, IKKγ) sowie dem Hitzeschockprotein Hsp90 und dem Hsp90 assoziierten Protein CDC37. Mittels Immunopräzipitation (IP) war es möglich, den TNFR1-IKK Signalkomplex an der Zellmembran nach TNF-Stimulation zu isolieren.<sup>24</sup> Während man die Rekrutierung des IKK-Komplexes in den TNFR1-Signalkomplex v.a. TRAF2 zuschreibt, nimmt man an, dass RIP den IKK-Komplex aktiviert. Auf welche Weise dies geschieht, ist bisher unklar. Offensichtlich erfolgt die Aktivierung des IKK-Komplexes unabhängig von der Kinaseaktivität von RIP.<sup>25, 26</sup>

### **1.3 Apoptoseinduktion über TNFR1**

Für die Todesrezeptoren Fas, TRAILR1 und TRAILR2 konnte ein apoptoseinduzierender membrangebundener Signalkomplex, DISC (Death-Inducing Signaling Complex) genannt, nachgewiesen werden.<sup>27</sup> Ein solcher DISC besteht aus dem entsprechenden Rezeptor, über dessen DD rekrutiertem FADD (Fas-Associated DD Protein), sowie über FADD sekundär rekrutierter Caspase-8. Die Komponenten des DISC organisieren sich zu supramolekularen Clustern, in denen mehrere Caspase-8-



Proteine in enge räumliche Nähe zueinander kommen („induced proximity“).<sup>28</sup> So wird deren autoproteolytische Prozessierung und damit Aktivierung möglich. Der extrinsische Weg der Apoptose mit der Aktivierung einer Initiatorcaspase ist beschränkt, der programmierten Zelltod eingeleitet.<sup>29</sup>

Entsprechende Knock-out Modelle zeigen, dass auch für die TNFR1-vermittelte Apoptoseinduktion FADD und Caspase-8 unverzichtbar sind.<sup>30</sup> Versuche zur Immunopräzipitation (IP) des TNFR1-DISC kamen jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen. So scheiterten mit den üblichen IP-Protokollen viele Versuche, FADD und Caspase-8 direkt an TNFR1 gebunden nachzuweisen.<sup>24, 30</sup> Dagegen gelang in der IP gegen Caspase-8 im Zytoplasma TNF-stimulierter Zellen die Koimmunopräzipitation von FADD, TRADD, TRAF2 und RIP.<sup>24</sup> Nur der TNFR1 selbst fehlte. Daraus wurde das Modell zweier sequentiell arbeitender Signalkomplexe entwickelt. Demnach bildet sich zunächst ein membranassoziierter TNFR1-Komplex I, der TNFR1, TRADD, TRAF2 und RIP umfasst, dem FADD und Caspase-8 jedoch nicht angehören. Dieser Komplex I induziert zunächst die Aktivierung von NFκB. Erst im Zytoplasma bildet sich nach Dissoziation rezeptorassoziierter Komplexkomponenten ein zweiter Signalkomplex aus (Komplex II), dem Caspase-8 und FADD, nicht dagegen der TNFR1 angehören.

Die Dissoziation rezeptorassoziierter Signalkomponenten nach TNF-Stimulation konnte in IP-Versuchen gezeigt werden.<sup>24</sup> Insbesondere die Dissoziation von TRADD wird in dem Modell zweier sequentiell arbeitender Signalkomplexe als entscheidend für die Bildung des zweiten zytoplasmatischen Komplexes mit FADD und Caspase-8 angesehen, da Interaktionen zwischen FADD und TRADD in der Literatur beschrieben wurden.<sup>31, 32</sup> Letzteres trifft zwar auch für RIP zu, Apoptose zeigt sich jedoch auch in RIP defizienten Zellen.<sup>33, 34</sup> Die TRADD-Dissoziation wird möglicherweise durch die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von TNFR1 eingeleitet, der nach Stimulation von TNFR1 mit TNF beobachtet wurde.<sup>24</sup>

Auch Erkenntnisse über die Bedeutung von *lipid rafts* im TNFR1-Signaling sind mit dem Modell zweier sequentieller Signalkomplexe vereinbar. *Lipid rafts* spielen für die suffiziente Ausbildung eines NFκB-aktivierenden TNFR1-Signalkomplex auf TNF-Stimulation hin eine entscheidende Rolle. Die Zerstörung der *lipid rafts* unterbindet die NFκB-Aktivierung und verstärkt zugleich die TNFR1-vermittelte Apoptoseinduktion.<sup>15</sup>

Dies könnte man dem Modell zweier sequentiell arbeitender Signalkomplexe entsprechend damit erklären, dass die Zerstörung der *lipid rafts* die Ausbildung des NFκB-aktivierenden Komplex I verhindert und dadurch TRADD direkt für die Interaktion mit FADD und Caspase-8 zur Verfügung steht.

Kürzlich konnten jedoch TNF-R1, FADD und Caspase-8 in einer IP gegen TNF koimmunopräzipitiert werden.<sup>23</sup> Entgegen bisheriger Erkenntnisse gelang damit die Isolierung eines TNF-DISC. Die Erklärung dafür wurde vor allem in der schnellen und transienten Bildung des DISC gesucht. Vormarkierung von TNFR1 gefolgt von schneller Temperaturerhöhung von 4 °C auf 37 °C zur Synchronisation der Rezeptorinternalisierung wurde als mögliche methodische Bedingung zur Detektion des DISC diskutiert. Auch wurde im Vergleich zu bisherigen IP-Versuchen ein anderes Protokoll zur Zelllyse verwendet.

Die Synchronisation der Rezeptorinternalisierung soll deshalb entscheidend sein, da angenommen wird, dass sich der DISC nicht direkt an der Membran, sondern erst nach Rezeptorinternalisierung in Endozytosevesikeln bildet. Dafür spricht, dass auch in magnetisch markierten und aufgereinigten TNFR1-Endozytose-Vesikeln (TNF-Rezeptosomen) der DISC-Nachweis gelang. In Zellen, die nicht-internalisierbare Mutanten von TNFR1 (TNFR1-ΔTRID) exprimieren, konnte in entsprechenden Versuchen die DISC-Bildung nicht nachgewiesen werden. Somit scheint die Rezeptorinternalisierung Voraussetzung für die DISC-Bildung und damit auch für die TNFR1-induzierte Apoptose zu sein.

Interessanterweise ließen sich aus TNFR1-ΔTRID-exprimierenden Zellen nach TNF-Stimulation RIP und TRAF2 isolieren, neben FADD und Caspase-8 fehlte jedoch auch der Nachweis von TRADD.<sup>23</sup> Wie bereits oben besprochen, wurde damit erstmals die Bedeutung von TRADD für die NFκB-Aktivierung bestritten und ein Modell der Kompartimentalisation des TNFR1-Signaling vorgeschlagen. Demnach aktiviert ein membranassoziierter Komplex aus TNFR1, RIP und TRAF2 NFκB. Für die Apoptoseinduktion ist dagegen die Rezeptorinternalisierung Voraussetzung. Nach Rezeptorinternalisierung binden TRADD, FADD und Caspase-8 in Endozytosevesikeln an TNFR1. Etwa 10 min nach TNF-Stimulation kommt es zur maximalen TNFR1-Rezeptosomenbildung, nach ca. 30 min verschmelzen diese Endosomen mit Trans-Golgi-Vesikeln, die nach etwa 60 min schließlich lysosomal abgebaut werden.

Die Ergebnisse, die zum Modell der Kompartimentalisation führten, stehen klar im Gegensatz zu bisherigen Vorstellungen vom TNF-Signaling. Erstmals konnte ein TNF-DISC nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Rolle von TRADD für die NFκB-Aktivierung bestritten. Die methodischen Unterschiede, die eine Erfassung der erst endosomal lokalisierten TRADD-, FADD- und Caspase-8-Rekrutierung erlauben, sollen die unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Allerdings stellt sich hier die Frage, weshalb bisher in der IP gegen TNF regelmäßig die Koimmunopräzipitation von TRADD gelang, die von FADD und Caspase-8 dagegen nicht.

#### **1.4 Regulationsmechanismen TNFR1-vermittelter Apoptoseinduktion**

Der programmierte Zelltod ist einem komplexen Regulationssystem u.a. über die NFκB-abhängige Genexpression unterworfen. Antiapoptotische NFκB-Zielproteine sind beispielsweise cIAP1 und das nahe verwandte cIAP2.<sup>35, 36</sup> Beide sind als Mitglieder der IAP-Familie (Inhibitor of Apoptosis) in der Lage, Effektorcaspasen wie Caspase-3 und Caspase-7 zu binden und zu inhibieren.<sup>37, 38</sup> cIAP1 und cIAP2 werden TRAF2-abhängig in den TNFR1-Komplex rekrutiert.<sup>39</sup>

Auch cFLIP (cellular FLICE (= Caspase-8) Inhibitory Protein) wird durch NFκB induziert.<sup>40, 41</sup> cFLIP kann FADD binden und wird wie Caspase-8 in den DISC bzw. in den Komplex II rekrutiert, wo es die Aktivierung von Caspase-8 verhindern kann.<sup>42, 43</sup>

Beide oben beschriebenen Modelle der TNFR1-vermittelten Apoptose postulieren zunächst die Bildung eines membrangebundenen NFκB-aktivierenden Komplexes. NFκB-abhängige antiapoptotische Proteine wie cIAP1, cIAP2 und cFlip werden daher hochreguliert, noch bevor die Induktion der Apoptose beginnt. Dies erklärt, weshalb TNF zunächst proinflammatorisch wirkt und erst in zweiter Linie ein Apoptose-induzierendes Zytokin ist. Die meisten Zelllinien sind entsprechend auch vor TNF-induzierter Apoptose geschützt. Erst, wenn unspezifisch die Proteinsynthese (Cycloheximid (CHX)) oder spezifisch die NFκB-Aktivierung blockiert wird, kommt es zu TNF-induzierter Apoptose.<sup>24, 30</sup>

#### **1.5 Lösliches TNF als Spaltprodukt von membranständigem TNF**

TNF kommt in zwei verschiedenen bioaktiven Formen vor, von denen die eine als membranständiges TNF (mTNF), die andere als lösliches TNF (sTNF) bezeichnet wird.

TNF wird zunächst als TypII-Transmembranprotein (mTNF) in Form eines stabilen Homotrimers gebildet. Durch spezifische Spaltung von mTNF durch die Metalloprotease TNF $\alpha$  Converting Enzyme (TACE) entsteht das lösliche homotrimere Zytokin sTNF.<sup>1</sup> Sowohl sTNF wie auch mTNF sind in der Lage, TNFR1 zu binden und zu aktivieren. Die bisher besprochenen Daten für TNFR1 wurden ausschließlich für sTNF ermittelt, nicht jedoch für mTNF. Insbesondere fehlen bisher Versuche zur Isolierung von Rezeptorsignalkomplexen an TNFR1 nach Stimulation mit mTNF. Solche Versuche erscheinen deshalb hoch interessant, weil strittige Fragen der TNFR1-Signaltransduktion an die Internalisierung von TNFR1 geknüpft sind. Sowohl die TRADD-Rekrutierung als auch die Apoptoseinduktion sollen dem Modell der Kompartimentalisation des TNF-Signaling zur Folge von der TNFR1-Internalisierung abhängig sein. Da die Internalisierung eines Rezeptors nach parakriner Bindung eines membranständigen Liganden wenig plausibel erscheint, stellt sich die Frage, ob TRADD nach mTNF-Stimulation an TNFR1 rekrutiert wird und auf welche Weise mTNF Apoptose induziert.

Außerdem können membranständige Liganden der TNF-Familie zusätzlich zur Rezeptorstimulation auch selbst als Rezeptoren fungieren.<sup>44</sup> Dieser als *Reverse Signaling* bezeichnete Mechanismus wurde für mehrere membrangebundene Liganden der TNF-Familie (CD 30L, CD40L, FasL und CD137L) gezeigt.<sup>45, 46, 47, 48</sup> Insbesondere für mTNF wurden jedoch zahlreiche funktionelle Daten bei Zell-Zell-Interaktionen im Immunsystem erhoben. mTNF induziert offensichtlich nicht nur Apoptose, sondern erhält zugleich ein negatives Feedback, welches zur Unterdrückung zusätzlicher löslicher apoptotischer Faktoren führt. Dieser Mechanismus könnte bei der Kontrolle von Entzündungsvorgängen von Relevanz sein. Zugleich müssen auch Vorstellungen über TNF-inaktivierende Pharmaka wie *Infliximab* und *Etanercept* neu überdacht werden. Diese neutralisieren nicht nur TNF, sondern induzieren auch Genexpression. Dies wird auch mit einer unter der Verwendung von *Infliximab* beobachteten generellen Anergy gegenüber unspezifischen Entzündungsstimuli und sogar der Zelltodinduktion unter bestimmten pathologischen Voraussetzungen in Verbindung gebracht.<sup>44</sup> Komplikationen unter dem Einsatz TNF-neutralisierender Pharmaka sowie die unterschiedlichen Wirkungen von *Etanercept* und *Infliximab* könnten mit *Reverse Signaling* erklärt werden.

Auch ist die Rolle von TNFR2 möglicherweise unterschätzt worden. Zwar binden sowohl sTNF als auch mTNF an diesen Rezeptor, er wird jedoch nur von mTNF vollständig aktiviert.<sup>49</sup> Die bisherige Fokussierung auf die Erforschung von sTNF erklärt deshalb, warum vergleichsweise wenig über TNFR2 bekannt ist. TNFR2 ist ein klassischer Vertreter der TRAF-interagierenden Rezeptoren innerhalb der TNFR-Superfamilie. Er ist in der Lage, TRAF2 direkt zu binden, und über TRAF2 auch die antiapoptotischen Proteine aus der IAP-Familie. Über TRAF2 kommt es zur NFκB-, JNK- und p38-MAPK-Aktivierung. Zur TNFR2-Aktivierung führende Zell-Zell-Interaktionen sind bisher wenig untersucht und ein spezifischer Antagonismus an TNFR2 könnte von klinischer Bedeutung sein.<sup>50, 51</sup> Auch die Rolle von TNFR2 im *Reverse Signaling* muss erst noch definiert werden.

## **1.6 Der apoptotische Crosstalk von TNFR1 und TNFR2**

Ogleich TNFR2 keine DD besitzt, kann er an der TNF-induzierten Apoptose beteiligt sein. So wurde für einige Zelllinien gezeigt, dass die selektive Stimulation von TNFR2 mit Hilfe von agonistischen Antikörpern ausreicht, Apoptose zu induzieren.<sup>52</sup> Dabei ist TNFR2 jedoch nicht in der Lage, direkt die apoptotische Caspasekaskade zu aktivieren. Vielmehr kommt es zur Induktion von endogenem TNF, welches dann Apoptose über TNFR1 induziert. Dabei agiert das neu synthetisierte TNF wohl vorwiegend in seiner membrangebundenen Form.<sup>53</sup>

Wie oben erläutert, schützt die Rekrutierung von TRAF2 und cIAP's vor TNF-induzierter Apoptose. Dies sind Proteine, die auch im TNFR2-Signalkomplex gefunden wurden.<sup>54</sup> Zusätzlich zur Bildung von endogenem mTNF konnte gezeigt werden, dass TNFR2 durch Abzug von TRAF2 (TRAF2-Depletion) aus dem Zytoplasma die TNFR1-vermittelte Apoptose verstärkt.<sup>55</sup> TNFR2 kompetitiert dabei zum einen mit TNFR1 um TRAF2 und TRAF2-assoziierte IAP's, zum anderen beschleunigt TNFR2 den cIAP1-vermittelten proteasomalen Abbau von TRAF2. Damit wird die Konkurrenz der beiden Rezeptoren um verbliebene TRAF2-Proteine zusätzlich verstärkt.

Berücksichtigt man, dass es sich bei dem neu gebildeten TNF um mTNF handelt, wird ersichtlich, dass beide beschriebenen Mechanismen bei der TNFR2-vermittelten Apoptose zusammenwirken und sich gegenseitig verstärken können. Wird nämlich TNFR2 stimuliert, wird TNFR1 durch TRAF2-Depletion für Apoptose sensitiviert und

gleichzeitig die Bildung eines Liganden für beide Rezeptoren induziert. mTNF stimuliert also selbst wieder den TNFR2, verschärft zusätzlich die Konkurrenz um TRAF2 und induziert gleichzeitig den Zelltod über den nun sensitivierten TNFR1.

Für die Bildung des endogenen mTNF ist die NFκB-Aktivierung über TNFR2 entscheidend. Da NFκB aber auch über TNFR1 aktiviert wird, ist die Apoptoseverstärkung durch mTNF-Induktion ein Mechanismus beider TNF-Rezeptoren. Auch bei der selektiven Stimulation von TNFR1 wird mTNF induziert. Anders als TNFR2 benötigt der TNFR1 zur Apoptoseinduktion nicht unbedingt die Bildung von endogenem mTNF, allerdings verstärkt dieses die TNFR1-induzierte Apoptose deutlich. Da dies auch bei sTNF-Konzentrationen festzustellen ist, die zur Absättigung aller TNFR1-Rezeptoren ausreichen, spielt hier wohl auch die durch mTNF bedingte Stimulation von TNFR2 und damit wiederum die TRAF2-Depletion eine entscheidende Rolle.<sup>56</sup>

Initial kann NFκB also über die Induktion von mTNF auch proapoptotisch wirken. Schließlich inhibieren aber, wie oben erläutert, NFκB-abhängige antiapoptotische Proteine die Apoptose. Dass es dennoch zur Apoptose kommen kann, erklärt sich dadurch, dass aktivierte Caspasen im Rahmen der Apoptoseinduktion zahlreiche Proteine des NFκB-Wegs prozessieren können. Dabei kommt es auch zur Bildung von Proteinfragmenten mit dominant-negativen Eigenschaften.<sup>1</sup> Auf diese Weise kann die einmal in Gang gekommene Caspasekaskade die antiapoptische Signaltransduktion über NFκB inhibieren.

Nicht nur TNFR1 und TNFR2 können durch Induktion von mTNF und durch TRAF2-Depletion die TNFR1-vermittelte Apoptose verstärken. Auch für andere Liganden von nicht DD-Rezeptoren aus der TNF-Familie konnte die Induktion von mTNF oder die TRAF2-Depletion gezeigt werden. Während TWEAK (Weak Inducer of Apoptosis) durch Bildung von endogenem mTNF indirekt über TNFR1 Apoptose induziert, verstärken CD30- und CD40-Ligand durch TRAF2-Depletion die TNFR1-vermittelte Zytotoxizität.<sup>53,57</sup>

Somit entscheidet der Crosstalk mit Mitgliedern von nicht DD-Rezeptoren der TNFR-Familie mit darüber, ob die über TNFR1-vermittelte Signalweiterleitung schließlich zum Zelltod führt oder nicht. In vivo, insbesondere bei geringen Konzentrationen von TNF, könnte sowohl die Bildung von mTNF wie auch die damit einhergehende

Stimulation von TNFR2 mit anschließender Depletion von TRAF2 von großer Bedeutung sein.

## **1.7 Rezeptorselektive und membranständige TNF-Varianten**

Verständlich ist, dass zur Untersuchung des apoptotischen Crosstalks zwischen TNFR1 und TNFR2 rezeptorspezifische Mutanten von TNF von großem Nutzen sind. Mit Hilfe von Mutationsanalysen ist es gelungen, rezeptorselektive Mutanten von TNF, sogenannte Muteine, zu generieren. Durch den Austausch von Arginin (Arg, R) an Position 32 durch Tryptophan (Trp, W) und Serin (Ser, S) an Position 86 durch Threonin (Thr, T) erhält man eine sTNF-Doppelmutante (R32W-S86T), die TNFR1 mit einer dem sTNF vergleichbaren Affinität bindet und aktiviert, für die jedoch eine TNFR2-Bindung nicht mehr messbar ist.

Tauscht man dagegen Aspartat (Asp, D) an Position 143 gegen Asparagin (Asn, N) aus und zugleich Alanin (Ala, A) an Position 145 gegen Arg (D143N-A145R), resultiert ein vollständiger Verlust der Bindung an TNFR1, die Affinität für TNFR2 sinkt dagegen nur um den Faktor fünf bis zehn<sup>58</sup>. Wie oben erwähnt, ist sTNF an TNFR2 nur wenig bioaktiv. Folglich können auch lösliche TNFR2-selektive Muteine den TNFR2 nicht adäquat aktivieren und wurden deshalb bisher experimentell nicht genutzt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die ersten zwölf Aminosäuren des murinen löslichen TNF für die Rezeptoraktivierung entbehrlich sind, dass ihr Verlust jedoch zu einer fehlenden Spaltbarkeit von mTNF zu sTNF führt<sup>59</sup>. Daher sollte es möglich sein, mit Hilfe von nichtspaltbaren  $\Delta$ 1-12TNF-Varianten von mTNF die Wirkung von mTNF zu untersuchen, ohne Gefahr zu laufen, dass gebildetes sTNF die Validität der Experimente in Frage stellt.

## **1.8 Zielsetzung und Fragestellungen der vorliegenden Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, membrangebundene TNF-induzierte Rezeptorsignalkomplexe an TNFR1 und TNFR2 zu untersuchen. Deshalb galt es zunächst, membranständige rezeptorselektive  $\Delta$ 1-12TNF-Varianten hinsichtlich Rezeptorbindung und Rezeptorspezifität zu untersuchen und zu charakterisieren. Im Anschluss daran sollte eine Methode etabliert werden, die es erlaubt, membrangebundene TNF-induzierte Rezeptorsignalkomplexe an TNFR1 und TNFR2 zu isolieren.

## 2. MATERIALIEN

### 2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
APS	Sigma, Deisenhofen
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Roth, Karlsruhe
ECL	Amersham, Braunschweig
FCS	PAA Lab-GMBH, Linz, Österreich
M2-Affinity-Gel	Sigma, Deisenhofen
Glutathion-Sepharose 4b	Amersham, Braunschweig
Lipofektamine	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin	PAA Lab- GMBH, Linz, Österreich
PVDF-Membran	Amersham, Braunschweig
Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim
RPMI 1640	PAA Lab GMBH, Linz, Österreich
sTNF	Knoll AG, Ludwigshafen
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA Lab-GMBH, Linz, Österreich
TEMED	Sigma, Deisenhofen
TNFR1-Fc	Apotech, Genf, Schweiz
TNFR2-Fc	Apotech, Genf, Schweiz

### 2.2 Antikörper und Antiseren

Anti-Caspase-8, Maus monoklonal (IgG2a)	Prof. Schulze-Osthoff, Universität Düsseldorf
Anti-FADD, Maus monoklonal	BD, Heidelberg
Anti-Fc-PE, Ziege polyklonal	Alexis, Grünberg
Anti-GST, Kaninchen polyklonal	BD, Heidelberg
Anti-Maus HRP, Kaninchen polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-Maus-PE, Maus monoklonal	Sigma, Deisenhofen



Anti-Kaninchen HRP, Ziege polyklonal

Dako-Cytomation, Glostrup,  
Dänemark

Anti-TNFR1, Maus monoklonal

Santa Cruz, Heidelberg

Anti-TNFR2, Maus monoklonal

Santa Cruz, Heidelberg

Anti-TRADD, Maus monoklonal

BD, Heidelberg

Anti-TRAF2, Kaninchen polyklonal

Santa Cruz, Heidelberg

## 2.3 Zelllinien

CHO

ATCC, Rockwill, MD, USA

CHO- $\Delta$ 1-12TNF

stabil mit TNF $\Delta$ 1-12pEYFP

transfizierte CHO

CHO- $\Delta$ 1-12TNF32W/86T

stabil mit TNF $\Delta$ 1-12

pEYFP32W/86T transfizierte CHO

CHO- $\Delta$ 1-12TNF143N/145R

stabil mit TNF $\Delta$ 1-12pEYFP

143N/145R transfizierte CHO

293

ATCC, Rockwill, MD, USA

Hela

ATCC, Rockwill, MD, USA

Hela80

stabil TNFR2 exprimierend

HT1080

ATCC, Rockwill, MD, USA

KB

Keratinocyten, Dr. M. Kracht, Med.

Hochschule Hannover

NCTC

ATCC, Rockwill, MD, USA

U937

ATCC, Rockwill, MD, USA

## 2.4 Expressionsplasmide

pEYFP

pEFBos-mTNF

pEYFP-mTNF

pEFBos-TNF $\Delta$ 1-12

pEYFP-TNF $\Delta$ 1-12

pEYFP-TNF $\Delta$ 1-12 32W/86T

pEYFP-TNF $\Delta$ 1-12 143N/145R

pCR3-GST-Flag-YFP-TNF $\Delta$ 1-12  
 pCR3-GST-Flag-YFP-TNF $\Delta$ 1-12 32W86T  
 pCR3-GST-Flag-YFP-TNF $\Delta$ 1-12 143N/145R  
 pEGFP-hTNFR1  
 pEYFP-hTRADD  
 pEGFP-hTRAF2

## 2.5 Lösungen und Puffer

Blotpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, pH 8,3
Coating Buffer	100 mM Carbonat, pH 9,5
Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,05 M Tris, 0,38 M Glycin, 0,004 M SDS, pH 8,3
PBA	1 x PBS, 0,025 % BSA
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	20 mM Na-Phosphat; 0,7 % NaCl, pH 7,2
PBS-T	1 x PBS, 0,05 % Tween-20
PBS-F	1 x PBS, 10% FCS (v/v)
Puffer zur Zellyse	10 mM KCl, 10 mM HEPES, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 7,9
Probenpuffer (SDS-PAGE, 2fach)	0,02 M Tris, 0,0002 M EDTA, 0,07 M SDS, 0,04 M DTT, 2,2 M Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, pH 8
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

### **3. EXPERIMENTALMETHODEN**

#### **3.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen**

Sämtliche verwendete Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS unter Standardbedingungen (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) kultiviert. Für die Kultur der 293-Zellen nach Elektroporation wurde Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Adhärente Zellen wurden durch Inkubation bei 37 °C mit Trypsin (0,025 %) und EDTA (10 mM) für 5 min (10 min für Hela-Zellen) abgelöst. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer.

#### **3.2 Transiente Transfektion mittels Elektroporation**

30- 50 x 10<sup>6</sup> 293-Zellen wurden zusammen mit der entsprechenden Plasmid-DNA in 4 mm Elektroporationsküvetten (PeqLab, Erlangen) mit einem Elektroporator (Easyjet plus Equibio, PeqLab, Erlangen) elektroporiert (250 V, 1800 F). Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet und erneut elektroporiert. Nach jeder Elektroporation erfolgte die Aussaat der Zellen in je zwei 15 cm-Gewebekulturplatten (zusätzlich in 6-Well-Zellkulturplatte zur Kontrolle der Transfektionseffizienz im FACS) pro Elektroporationsgruppe. Bei der Transfektion des TNFΔ1-12pEYFP-Plasmids wurden 20 µg DNA je Elektroporation (100 % positiv im FACS), bei der Transfektion der GST-Flag-YFP-Δ1-12TNF-Mutein-Plasmide 50 µg DNA je Elektroporation (80 % positiv im FACS) eingesetzt. Am Tag nach der zweiten Elektroporation wurden die Zellen für Experimente geerntet.

#### **3.3 Transiente Transfektion mittels Lipofektamine**

Zur Transfektion von KB- und NCTC-Zellen für funktionelle Essays wurde Lipofektamine verwendet. Die Transfektion erfolgt hier durch Liposomen-vermittelten Gentransfer. Die zu transfizierende DNA wird von polykationischen Lipiden komplexiert und durch Verschmelzung mit der Zellmembran oder über Endozytose in die eukaryontische Zelle aufgenommen. Durchgeführt wurden diese Transfektionen im 96-Well, 24-Well und 6-Well-Format je nach benötigter Zellzahl den Angaben des

Herstellers entsprechend. Für Kokulturversuche wurden die Zellen am zweiten Tag nach Transfektion geerntet.

### **3.4 Ermittlung der TNFR1-vermittelten Zytotoxizität im Kristallviolett-Zytotoxizitäts-Assay**

#### **3.4.1 Aussaat und Stimulation**

$20 \times 10^3$  HeLa80-Zellen wurden ein Tag vor Stimulation in eine 96-Well-Platte ausgesät. Es erfolgte eine Vorstimulation an TNFR2 (2  $\mu\text{g/ml}$  Flag-TNF143N/145R in 50  $\mu\text{l}$  Medium/Well) über 6 h, welches entweder mit mAk M2 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) quervernetzt, oder zusammen mit dem mAk 80M2 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) eingesetzt wurde. Darauf wurde in Gegenwart von 5  $\mu\text{g/ml}$  CHX mit sTNF oder Flag-TNF32W/86T in Fünferschritten titriert. Zuvor wurde das Medium in allen Gruppen gewechselt, das Endvolumen betrug in jeder Gruppe 120  $\mu\text{l}$  Medium/Well. Aufgrund des Medienwechsels wurde in der vorstimulierten Gruppe Flag-TNF143N/145R und der jeweils verwendete mAk erneut, in der kostimulierten Gruppe erstmalig zugesetzt. Die Stimulation an TNFR1 erfolgte über Nacht für eine Dauer von 12- 16 h.

#### **3.4.2 Färbung**

Der Überstand der stimulierten Zellen wurde verworfen und die Zellen 15 min bei RT mit 100  $\mu\text{l}$  Kristallviolettlösung (0,5 % Kristallviolett, 20 % Methanol) inkubiert. Die Färbelösung wurde mit Wasser abgespült und die Platte an der Luft getrocknet. Die getrockneten Platten wurden im ELISA-Reader (Anthos Lucy 2) bei 570 nm analysiert.

### **3.5 Durchflusszytometrie**

Fluoreszierende Zellen können mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht werden. Die Fluoreszenz kann hierbei entweder von einer vorher durchgeführten Färbung herrühren oder durch die Expression eines Fluoreszenzproteins, das durch Transfektion in die Zelle eingeführt wurde, erreicht werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch einen Laserstrahl im „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS)-Gerät (BD-Calibur, BD, Heidelberg) angeregt und emittieren anschließend Licht einer charakteristischen Wellenlänge, welches der Wellenlänge entsprechend entweder auf FL1-H (YFP, GFP)

oder FL2-H (PE) detektiert wird. Ausgewertet wurden die FACS-Daten mit der Cell Quest-Software für Apple-Macintosh.

### **3.5.1 Überprüfung der Transfektionseffizienz**

GFP- oder YFP-exprimierende Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml in PBS aufgenommen und mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf FL1-H analysiert.

### **3.5.2 FACS-Färbung zur selektiven Bindung löslicher Liganden an HeLa-Zellen**

HeLa- bzw. HeLa80-Zellen ( $1 \times 10^5$ ) wurden in eine Lösung mit M2 (1  $\mu$ g/ml)-quervernetztem Flag-TNF, Flag-TNF32W/86T oder Flag-TNF143N/145R (je 2  $\mu$ g/ml in 100  $\mu$ l Medium) aufgenommen. Die Zellen wurden für 1 h bei 4 °C in der 96-Well-Rundbodenplatte mit dem Überstand inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBA wurden die Zellen mit anti-Maus-PE für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte der Nachweis in der Durchflusszytometrie.

### **3.5.3 FACS-Färbung zur selektiven Bindung an TNFR1-Fc und TNFR2-Fc**

Zellen wurden wie oben beschrieben entweder mittels Lipofektamine oder mittels Elektroporation mit entsprechenden mTNF-Varianten transfiziert. Anschließend wurden sie mit FACS-Puffer gewaschen und zu je  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro Gruppe in 96-Well-Rundbodenplatten ausgesät. TNFR1-Fc bzw. TNFR2-Fc wurde in einer Konzentration von 4  $\mu$ g/ml in einem Volumen von 50  $\mu$ l für 30 min bei 4 °C eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen wurde anti-Fc-PE (1  $\mu$ g/ml) in 50  $\mu$ l FACS-Puffer eingesetzt. Der Bindungsnachweis erfolgte nach dreimaligem Waschen in der FACS-Analyse.

## **3.6 Messung der IL8-Induktion im ELISA**

### **3.6.1 Transfektion und Kokultur**

In Monokulturexperimenten (Abb. 7) wurden  $2 \times 10^4$  Zellen/Well im 96-Well-Format mittels Lipofektamine transfiziert. Am zweiten Tag nach Transfektion erfolgte nach Medienwechsel und sechsständiger Stimulation die Untersuchung des Überstands im IL8-ELISA.

In Kokulturexperimenten (Abb. 8- 10) wurden  $3 \times 10^4$  Zielzellen sowie  $2 \times 10^4$  transfizierte Effektorzellen in 96-Well-Flachbodenplatten ausgesät. 6 h nach Beginn der

Kokultur wurde der Überstand zur Messung im IL8-ELISA abgenommen. In dem Versuch zur vergleichenden Kinetik der IL8-Induktion durch sTNF und  $\Delta$ 1-12TNF (Abb. 11) wurde die Kokultur mit nur 3 % FCS im Medium durchgeführt. Der erste Messwert wurde nach 3 h abgenommen (Zellen adhärent) und dann fünfmal täglich alle 2 h. Das Experiment wurde im 6-Well-Format durchgeführt. Pro Entnahmezeitpunkt wurden 40  $\mu$ l Überstand zur Analyse im IL8-ELISA entnommen, ohne dieses Volumen durch neues Medium zu ersetzen.

### **3.6.2 Detektion**

Ein Tag vor Durchführung des IL8-ELISA wurde die benötigte Anzahl von ELISA-Platten mit 50  $\mu$ l/Well einer IL8-Antikörperlösung ( $\alpha$ -IL8 1:250 in Coating-Puffer) versehen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit 200  $\mu$ l PBS-T/Well wurden die Platten 1 h mit 200  $\mu$ l PBS-F/Well geblockt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Proben und drei Standardkonzentrationen IL8 (1,5 ng, 1 ng, 0,5 ng) sowie Medium + 10 % FCS allein für 2 h aufgetragen. Nach fünfmaligem Waschen wurden die Platten für 1 h mit 50  $\mu$ l/Well einer Lösung aus biotinyliertem IL8-Antikörper und Streptavidin-HRP (jeweils 1:250 in PBS-F) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut siebenmal gewaschen und 100  $\mu$ l/Well Substrat (1 mg/ml ABTS in ABTS-Puffer) dazugegeben. Die Messung erfolgte nach kurzer Inkubationszeit vor Eintritt der Sättigung der eintretenden Farbreaktion im ELISA-Reader (Anthos Lucy 2) bei 405 nm. Sämtliche Antikörper sowie Streptavidin-HRP und rekombinantes IL8 wurden dem OptEIA humanIL8-ELISA-Kit (Pharmingen, San Diego, USA) entnommen.

## **3.7 Messung der sTNF-Produktion im TNF-ELISA**

### **3.7.1 Transfektion und Kokultur**

$10 \times 10^4$  NCTC-Zellen wurden im 24-Well-Format mittels Lipofektamine mit pEYFP bzw. verschiedenen mTNF-Expressionsplasmiden transient transfiziert. Am 2.Tag nach Transfektion wurde der Überstand gewechselt und 6 h später abgenommen. Während ein Teil des Überstands nur bei  $13 \times 10^3$  U/min zentrifugiert wurde, wurde ein anderer zusätzlich bei  $100 \times 10^3$  U/min ultrazentrifugiert.

### **3.7.2 Detektion**

Für den TNF-ELISA benötigte Antikörper sowie Streptavidin-HRP und rekombinantes humanes TNF wurden dem OptEIA humanTNF-ELISA-Kit (Pharmingen, San Diego, USA) entnommen. Das Protokoll zur Durchführung des TNF-ELISA entspricht ansonsten dem des IL8-ELISA.

## **3.8 GST-Fishing von Rezeptorkomplexen nach $\Delta$ 1-12TNF-Stimulation**

### **3.8.1 Kokultur und Herstellung der Gesamtzelllysate für GST-Fishing**

Die Rezeptorkomplexe nach  $\Delta$ 1-12TNF-Stimulation wurden mittels GST-Fishing isoliert. Die mit verschiedenen GST $\Delta$ 1-12TNF-Muteinen transfizierten 293-Zellen ( $20\text{-}40 \times 10^6$ ) wurden für definierte Zeiträume (siehe entsprechende Abbildungen) mit der zu stimulierenden Zielzelle ( $40 \times 10^6$  für adhärenzte (Hela80), etwa  $120 \times 10^6$  für Suspensionszellen (U937) bei hoher Zelldichte ( $30\text{-}60 \times 10^6/\text{ml}$ ) in vorgewärmten Medium kokultiviert. Die ersten 2 min der Kokultur erfolgte im  $37^\circ\text{C}$ -Wasserbad im Falcon. Anschließend wurden die Zellen in 3 cm-Gewebekulturschalen überführt und im Inkubator unter Standardbedingungen weiterkultiviert. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet mit Lysispuffer (Puffer für Zelllyse, 1 % NP40, Proteaseinhibitor) in 1,8 ml für 25 min lysiert. Das Lysat wurde bei  $13 \times 10^3$  U/min für 10 min zentrifugiert und anschließend der Überstand für das GST-Fishing verwendet. Für die Zeitpunkte 0 min erfolgte eine getrennte Lyse der Effektor- (transfizierte 293-Zellen) und der Zielzellen in je 0,9 ml Lysispuffer und ein Mischen der Zelllysate nach Abzentrifugation.

### **3.8.2 GST-Fishing der Signalkomplexe**

Der Überstand für GST-Fishing wurde mit 250  $\mu\text{l}$  Glutathion-Sepharose bei  $4^\circ\text{C}$  über Nacht gerollt. Die Beads wurden durch Kurzzentrifugation (10 sek,  $1 \times 10^4$  U/min) zurückgewonnen und anschließend zweimal mit Waschpuffer (Puffer für Zelllyse mit 0,2 % NP40), zweimal mit PBS gewaschen. Während der Waschschrte wurde die Suspension je dreimal aufgeschüttelt. Nach der letzten Kurzzentrifugation wurden die Beads 5 min bei  $94^\circ\text{C}$  mit Probepuffer aufgekocht und anschließend im Westernblot analysiert. Alle Schritte erfolgten auf Eis, zentrifugiert wurde bei  $4^\circ\text{C}$ .

## **3.9 Western-Blot**

### **3.9.1 SDS-PAGE**

Die Proteinproben wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Zur Herstellung des Trenngels wurde eine Trenngellösung verwendet (10, 12 oder 13,5 % Polyacrylamid in 374 mM Tris, 3,75 mM SDS pH 8,8), deren Polymerisation durch die Zugabe von APS und TEMED (Endkonzentration je 0,1 %) gestartet wurde. Nach der Polymerisation wurde das Trenngel mit Sammelgel (6 % Polyacrylamid in 123 mM Tris, 3,75 mM SDS pH 6,8, APS 0,1 % (v/v), TEMED 0,1 % (v/v)) überschichtet, der Kamm vor Auspolymerisation eingesetzt. Die Proben wurden mit Probepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Nach Kammentfernung wurden sie auf das Gel aufgetragen.

### **3.9.2 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membran**

Der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte in einer horizontalen Blotkammer (PqLab). Die Membran wurde nach Equilibrieren in 100 % Methanol in Blotpuffer getränkt und gemeinsam mit dem Gel wie folgt in die Blotkammer gelegt: Anode/ Whatman-Papier/ PVDF-Membran/ Gel/ Whatman-Papier/ Kathode. Das Blotten erfolgte je nach Proteingröße 1,5 bis 2 h bei Raumtemperatur und einer Stromstärke von 1,5 mA je cm<sup>2</sup> Gelfläche.

### **3.9.3 Immunofärbung von Westernblots**

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt: Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran zunächst entweder über Nacht bei 4 °C oder für 1,5- 2 h bei RT in Blockpuffer (5 % Magermilchpulver (w/v) in Wasser) geschwenkt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper in PBS-T erfolgte nach dreimaligem Waschen in PBS-T über Nacht bei 4°C oder 1,5-2 h bei RT. Nach erneutem Waschen der Membran wurde die Membran mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper in PBS-T für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut für 2 h in regelmäßig gewechseltem PBS-T gewaschen und die Nachweisreaktion unter Verwendung des ECL-Systems (Amersham) durchgeführt.



#### **3.9.4 Peroxidasenachweis mittels ECL**

Gebundene Antikörper-Peroxidase-Konjugate wurden in der Dunkelkammer mit dem ECL-System nachgewiesen. Bei der von der Peroxidase katalysierten Reaktion wird Licht erzeugt, welches einen Röntgenfilm belichtet. Die mitgelieferten Lösungen wurden zu gleichen Teilen gemischt und die Membran für 1 min mit dem Gemisch inkubiert. Anschließend erfolgten verschieden lange Belichtungen (1- 30 min) eines Röntgenfilms in einer lichtdichten Kassette.

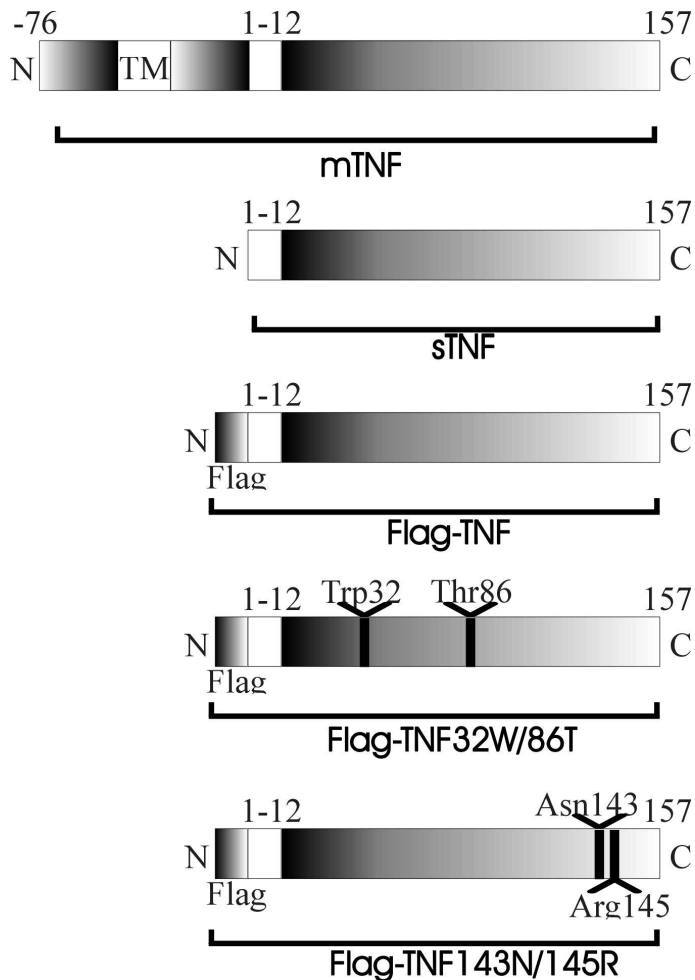
## **4. ERGEBNISSE**

### **4.1 Charakterisierung löslicher Flag-TNF-Muteine**

#### **4.1.1 Charakterisierung der Rezeptorspezifität löslicher Flag-TNF-Muteine**

Die Wirkung von sTNF ist weit besser erforscht als die von mTNF. Dennoch sind bisher keine TNFR2-spezifischen bioaktiven Mutanten von sTNF näher charakterisiert worden. Diese sind jedoch von großer experimenteller Relevanz, will man den Crosstalk der TNF-Rezeptoren, insbesondere die Sensitivierung für Apoptose durch TNFR2-Stimulation, untersuchen. Dies war bisher nur mit Hilfe agonistischer Ak gegen TNFR2 möglich.

Zwar hat man selektiv TNFR2-bindende Mutanten von sTNF generiert, diese können jedoch wie sTNF selbst den TNFR2 nicht adäquat aktivieren<sup>58</sup>. Daher wurden für die vorliegende Arbeit Flag-getaggte Varianten der bekannten löslichen TNFR-spezifischen TNF-Mutanten kloniert, die im Folgenden als Flag-TNF-Muteine bezeichnet werden. Mit Hilfe des Flag-spezifischen mAk M2 lassen sich diese quervernetzen. Es wurde erhofft, dass quervernetztes Flag-TNF sowie dessen TNFR2-spezifisches Mutein ähnlich wie mTNF an TNFR2 bioaktiv ist. Diese Hoffnung stützt sich auf analoge Erkenntnisse über löslichen FasL, welcher nach Quervernetzung ähnlich wie membrangebundener FasL am Rezeptor bioaktiv ist<sup>60</sup>. Abb. 1 zeigt eine schematische Darstellung dieser Flag-TNF-Muteine, die in dieser Arbeit näher charakterisiert wurden.



**Abb.1: Schematische Darstellung der löslichen Flag-TNF-Muteine**

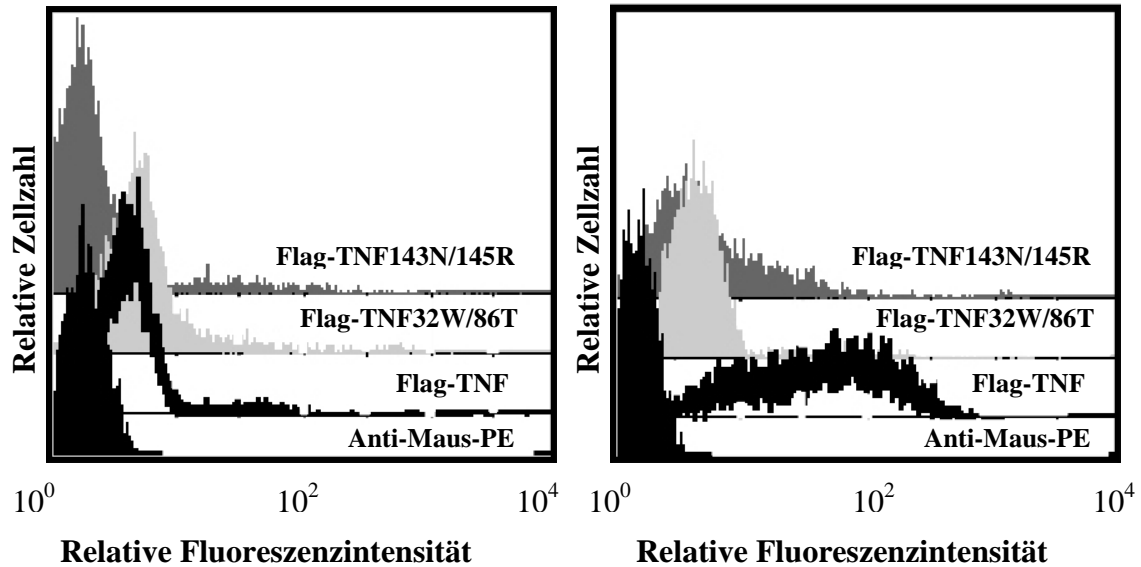
Während der membrangebundene Vorläufer von sTNF (mTNF) 233 Aminosäuren (As) besitzt, handelt es sich bei sTNF um ein Protein von 157 As. Entscheidend für die Spaltung von mTNF zu sTNF sind die weiß gekennzeichneten As 1-12 des löslichen TNF. Der Flag-Tag ist ein Peptid aus acht As, welcher die Quervernetzung mittels M2 ermöglicht. Die schwarzen Balken markieren die Mutationen, die zur Selektivität für TNFR1 bzw. TNFR2 führen. Im Falle von Flag-TNF32W/86T wurde Arg32 durch Trp sowie Ser86 durch Thr ausgetauscht, im Falle von Flag-TNF143N/145R dagegen Asp143 durch Asn sowie Ala145 durch Arg ersetzt. TM bezeichnet die Transmembrandomäne von mTNF.

Zunächst wurde die rezeptorselektive Bindung der Flag-TNF-Muteine geprüft. Abb. 2 zeigt die differentielle Bindung der Flag-TNF-Muteine an TNFR1 und TNFR2 auf Hela- und Hela80-Zellen. Während Hela-Zellen ausschließlich den TNFR1 exprimieren, exprimieren Hela80-Zellen zusätzlich den TNFR2. Flag-TNF bindet stärker an Hela80 als an parentale Hela, die nur TNFR1 exprimieren. Dies entspricht den Erwartungen, da Flag-TNF an beide Rezeptoren binden kann. Eine unterschiedliche Bindung an Hela- und Hela80-Zellen wurde für das TNFR1-selektive Flag-TNF-Mutein nicht beobachtet. Es besitzt seinen Mutationen entsprechend nur eine hohe Affinität für TNFR1, da dieser

in beiden Zellen gleichermaßen exprimiert wird. Im Gegensatz dazu bindet das TNFR2-selektive Flag-TNF-Mutein nur an TNFR2-exprimierende Zellen. Die erwartete TNFR2-Selektivität der Flag-TNF-Muteine bestätigte sich somit.

**A) HeLa**

**B) HeLa80**

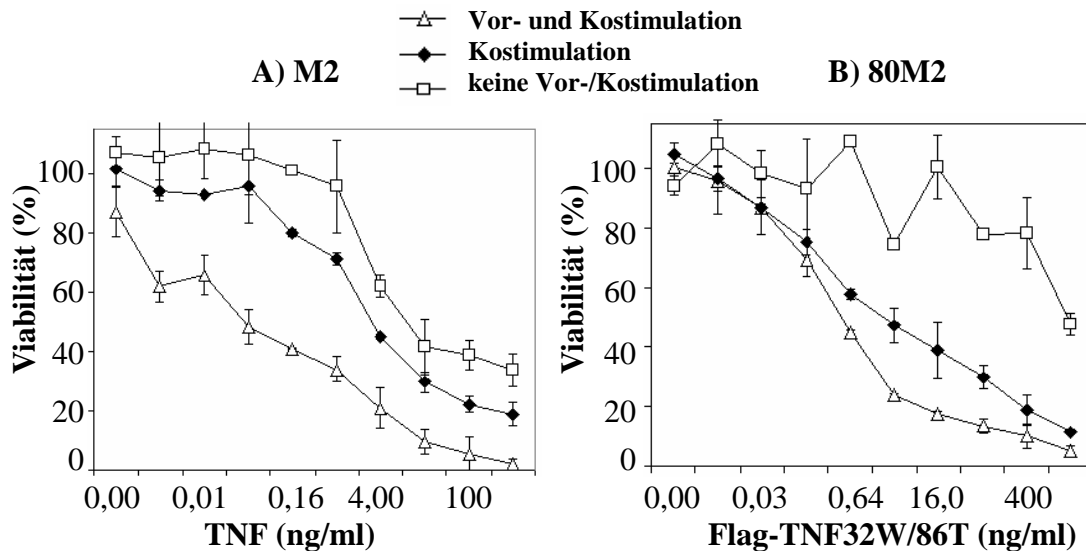


**Abb.2 Differentielle Bindung von Flag-getaggten TNF-Mutanten an TNFR1 und TNFR2 auf HeLa- und HeLa 80-Zellen**

HeLa (A) bzw. HeLa80 (B)- Zellen wurden mit quervernetztem Flag-TNF (Schwarz-durchsichtiges Histogramm), Flag-TNF32W/86T (hellgraues Histogramm) oder Flag-TNF143N/145R (dunkelgraues Histogramm) sowie anschließend mit anti-Maus-PE inkubiert. Als Kontrolle dienten HeLa- bzw. HeLa80-Zellen, die nur mit anti-Maus-PE (schwarzes Histogramm) inkubiert wurden. HeLa-Zellen exprimieren nur TNFR1, HeLa80-Zellen zusätzlich TNFR2.

**4.1.2 Charakterisierung der Funktionalität löslicher Flag-TNF-Muteine**

Über die Funktionalität der löslichen Flag-TNF-Muteine am Rezeptor machen die FACS-Daten keine Aussage. Es wurden daher Zytotoxizitätsassays durchgeführt, um insbesondere den Nutzen einer M2-vermittelten Quervernetzung zur Aktivierung des TNFR2-spezifischen Flag-TNF-Muteins an TNFR2 zu prüfen. Dabei wurde die Erkenntnis ausgenutzt, dass Vor- bzw. Kostimulation des TNFR2, z.B. mit agonistischen Ak, die TNFR1-vermittelte Zytotoxizität verstärkt.<sup>39, 53</sup> Eine ähnliche Verstärkung des sTNF-induzierten Zelltods wurde auch für eine Vor- bzw. Kostimulation an TNFR2 mittels quervernetztem Flag-TNF143N/145R für den Fall erwartet, dass das quervernetzte lösliche TNFR2-spezifische Mutein den Rezeptor aktivieren kann.



**Abb. 3 Stimulation des TNFR2 verstärkt die TNFR1-vermittelte Zytotoxizität**

Die Kurve der weißen Quadrate zeigt in Gegenwart von CHX die Zytotoxizität von sTNF in 3A) bzw. Flag-TNF32W/86T in 3B). In der Kurve der schwarzen Rauten wurde zuvor TNFR2 kostimuliert, in der Kurve der weißen Dreiecke zuvor TNFR2 vor- und kostimuliert. Die Vorstimulation erfolgte mit Flag-TNF143N/145R, welches in 3A) mittels M2 quervernetzt, in 3B) zusammen mit dem mAk 80M2 eingesetzt wurde. Das Zellüberleben wurde nach 12- 16 h mittels Kristallviolett färbung ermittelt.

In der Tat verstärken TNFR2-Ko- und Vorstimulation durch quervernetztes Flag-TNF143N/145R (Abb. 3A), nicht jedoch Flag-TNF143N/145R bzw. M2 allein (Daten nicht gezeigt), die TNFR1-vermittelte Zytotoxizität.

Neben der Aktivierung von Flag-TNF143N/145R durch M2-vermittelte Quervernetzung besteht die Möglichkeit, die Bioaktivität des Muteins am Rezeptor durch den Einsatz des mAk 80M2 zu steigern. Für diesen mAk gegen TNFR2 konnte gezeigt werden, dass er selbst keine intrinsische Aktivität am Rezeptor besitzt, jedoch auf bisher unverstandenem Weg in der Lage ist, die Aktivität von sTNF an TNFR2 zu erhöhen.<sup>61,49</sup>

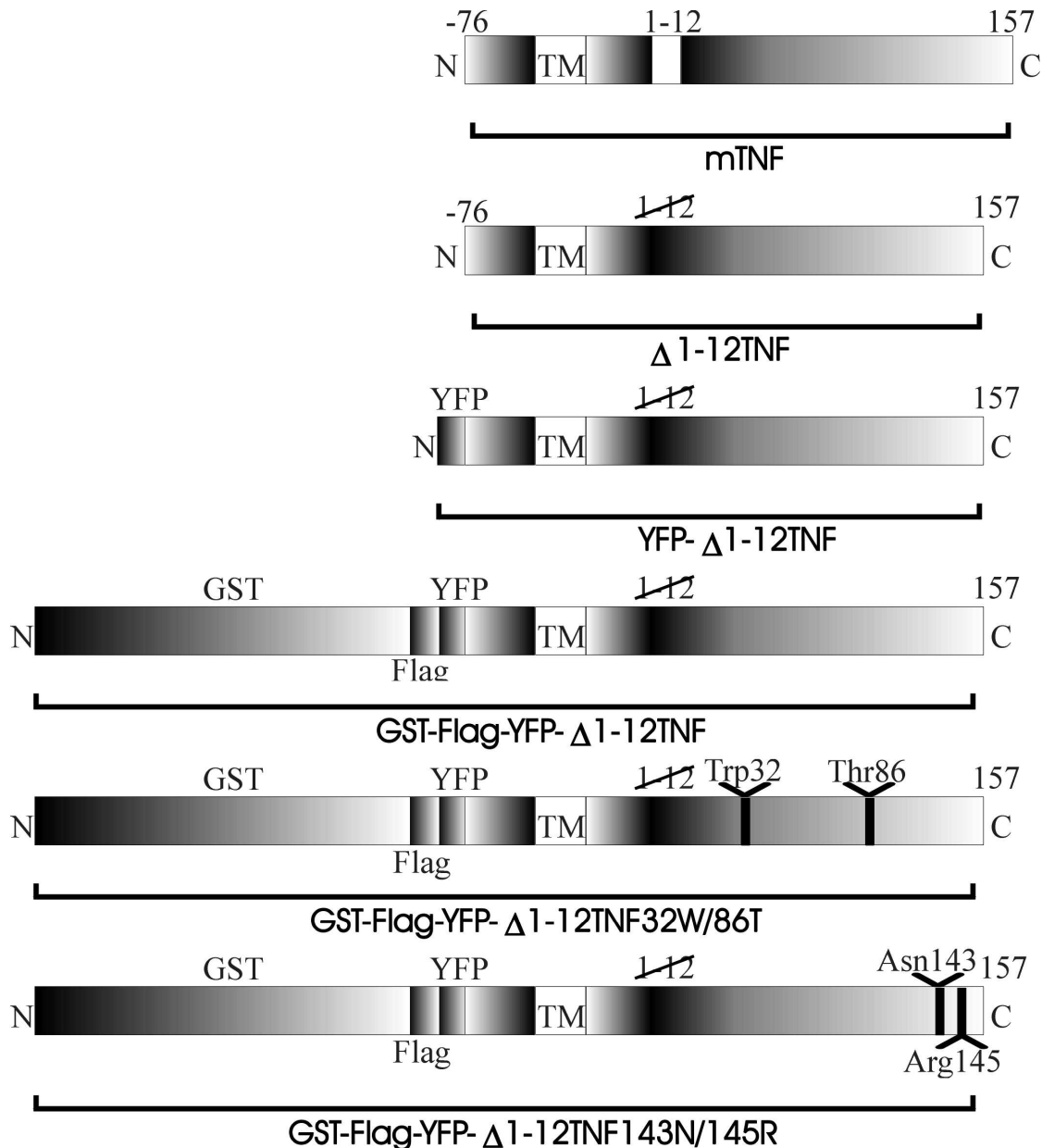
So verwundert es nicht, dass TNFR2 Vor- bzw. Kostimulation mittels Flag-TNF143N/145R in Gegenwart des mAk 80M2 ebenfalls den TNFR1-vermittelten Zelltod verstärkt (Abb. 3B). In diesem Versuch wurde zur Induktion des Zelltods über TNFR1 anstelle von sTNF das TNFR1-spezifische Mutein Flag-TNF32W/86T verwendet. Damit konnte eine zusätzliche Kostimulation durch sTNF an TNFR2 in Gegenwart des mAk 80M2 ausgeschlossen werden. Der mAk 80M2 allein verstärkt nicht die TNFR1-vermittelte Zytotoxizität (Daten nicht gezeigt). Eine zusätzlich M2-vermittelte Quervernetzung des Flag-TNF143N/145R in Gegenwart des mAk 80M2 (Kombination der Effekte in 3A) und 3B) brachte keine Vorteile (Daten nicht gezeigt).

Damit steht mit dem durch Quervernetzung oder dem Einsatz des mAk 80M2 aktivierten Flag-TNF143N/145R ein effektives Mittel zur Verfügung, den TNFR2 selektiv zu stimulieren und so den Crosstalk der TNF-Rezeptoren näher zu beleuchten. Neben der Funktionalität von Flag-TNF143N/145R konnte zugleich auch die Funktionalität des Flag-TNF32W/86T gezeigt werden. Flag-TNF32W/86T induziert erwartungsgemäß den Zelltod über TNFR1.

## **4.2 Charakterisierung membrangebundener $\Delta$ 1-12TNF-Muteine**

### **4.2.1 Die $\Delta$ 1-12-Mutation schützt vor mTNF-Spaltung**

Will man mTNF-induzierte TNFR-Signalkomplexe untersuchen, bedarf es mTNF-Varianten, die nicht zu löslichem TNF prozessiert werden, also solcher, denen die ersten 12 Aminosäuren des löslichen TNF fehlen ( $\Delta$ 1-12TNF).<sup>59</sup> Nur so kann man Störeffekte durch die Bildung sTNF-induzierter Rezeptorkomplexe ausschließen. Um eine effektive Isolierung der rezeptorassoziierten Signalkomplexe möglich zu machen, wurde eine nichtspaltbare  $\Delta$ 1-12TNF-Variante mit einem Glutathion-S-Transferase (GST)- und einem Flag-Tag verwendet. Damit sollte die Isolierung mTNF-induzierter Rezeptorkomplexe mittels Glutathion-Sepharose oder des M2-Affinity-Gels möglich werden. Weiterhin gilt es zur getrennten Untersuchung der TNF-Rezeptoren, die Kenntnisse über Mutationen zur Rezeptorselektivität experimentell zu nutzen. Genetische Fusion mit YFP erlaubt zusätzlich die einfache Kontrolle der Transfektionseffizienz der GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF-Muteine in der Durchflusszytometrie bei Expression in eukaryontischen Zellen. Abb. 4 zeigt schematisch mTNF-Varianten, welche die geforderten Eigenschaften besitzen und im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert wurden.

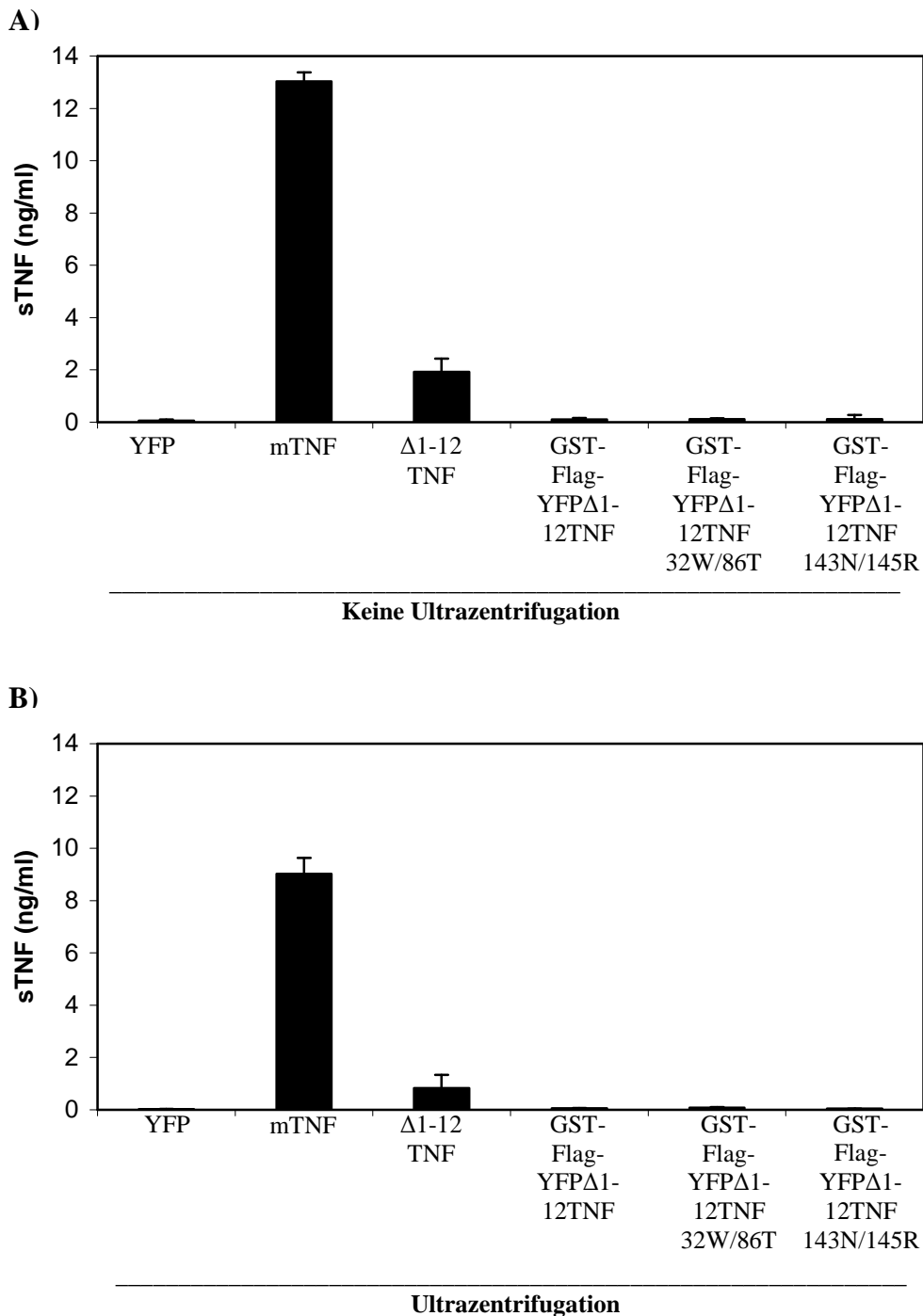


**Abb.4 Schematische Darstellung der membrangebunden TNF-Liganden**

Entscheidend für die Spaltung von mTNF zu sTNF sind die weiß gekennzeichneten As 1-12 des löslichen TNF. Daher sollten Δ1-12TNF-Muteine, welchen die As 1-12 fehlen, vor der Spaltung zu sTNF geschützt sein. YFP ist eine gelbgrün fluoreszierende Sequenz, die sich im FACS einfach nachweisen lässt. Flag- und GST-Tag dienen der Isolierung membrangebundener mTNF-induzierter Signalkomplexe aus einem Gesamtzelllysat. GST ist ein 26 kD großes Protein, dessen Isolierung mittels Glutathion-Sepharose möglich ist.

Zunächst galt es, die Inhibition der Spaltung der Δ1-12TNF-Varianten zu sTNF zu kontrollieren. Dazu wurden Zellen mit den entsprechenden Δ1-12TNF-Varianten transfiziert. Der Zellüberstand dieser Zellen wurde anschließend ultrazentrifugiert, um ihn vollständig von Membranbestandteilen und damit von mTNF zu befreien. Darauf erfolgte die Untersuchung des Überstands auf sTNF. Der direkte Vergleich der YFP-

TNF-Varianten, die sich nur in der  $\Delta 1-12$ -Mutation unterscheiden, zeigt, dass YFP- $\Delta 1-12$ TNF vor der Spaltung zu sTNF geschützt ist (Abb.5).



**Abb. 5: Die  $\Delta 1-12$ -Mutation schützt vor  $\Delta 1-12$ TNF-Spaltung**

NCTC-Zellen wurden mit YFP bzw. den oben genannten mTNF-Varianten transfiziert. Am 2.Tag nach Transfektion wurde der Überstand gewechselt und 6 h später zur Untersuchung auf sTNF abgenommen. Die eine Hälfte (Abb. 5A) des Überstands wurde direkt, die andere (Abb. 5B) erst nach Ultrazentrifugation auf sTNF im TNF-ELISA untersucht.

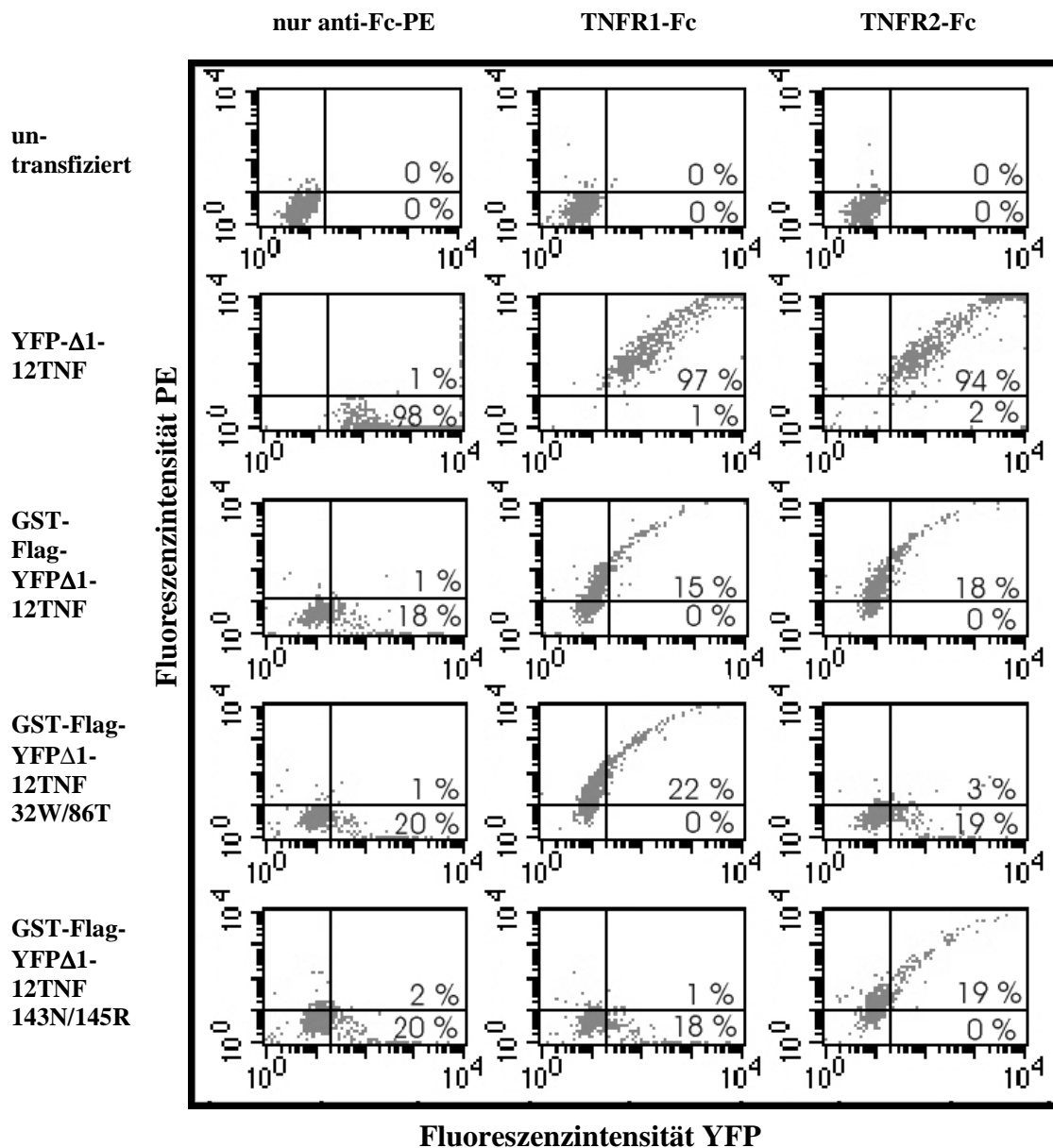


Somit eignen sich  $\Delta 1$ -12TNF-Konstrukte zur Untersuchung von mTNF-Effekten, ohne dass gebildetes sTNF die Validität der Experimente in Frage stellen könnte. Für GST-Flag-YFP- $\Delta 1$ -12TNF war gleichfalls kein sTNF im Überstand nachweisbar.

#### **4.2.2 Die membranständigen $\Delta 1$ -12TNF-Muteine interagieren selektiv mit TNFR1 und TNFR2**

Die Rezeptorselektivität der verschiedenen membranständigen  $\Delta 1$ -12TNF-Muteine wurde anhand ihrer Interaktion mit TNFR1-Fc und TNFR2-Fc bestimmt. Abb. 6 zeigt, dass YFP- $\Delta 1$ -12TNF- und GST-Flag-YFP- $\Delta 1$ -12TNF-exprimierende Zellen erwartungsgemäß sowohl löslichen TNFR1-Fc als auch TNFR2-Fc binden. Während GST-Flag-YFP- $\Delta 1$ -12TNF<sup>32W/86T</sup>-exprimierende Zellen nur mit TNFR1-Fc interagieren, binden GST-Flag-YFP- $\Delta 1$ -12TNF<sup>143N/145R</sup>-exprimierende Zellen nur TNFR2-Fc. Somit gelang eindeutig der Nachweis der Rezeptorselektivität der verschiedenen mTNF-Muteine bei Expression in eukaryontischen Zellen.

Nahezu alle YFP-positiven, transfizierten Zellen (diese sind auf den oberen und unteren rechten Quadrant in Abb. 6 verteilt) binden zugleich ihrer jeweiligen Selektivität entsprechend an TNF-Rezeptoren (befinden sich im oberer rechter Quadrant in Abb. 6). Die Transfektionseffizienz für GST-Flag-YFP- $\Delta 1$ -12TNF-Varianten war jedoch deutlich schlechter (Anteil der Zellen im oberen und unteren rechten Quadranten etwa 20 %) als für YFP- $\Delta 1$ -12TNF (Anteil der Zellen im oberen und unteren rechten Quadranten etwa 90 %).



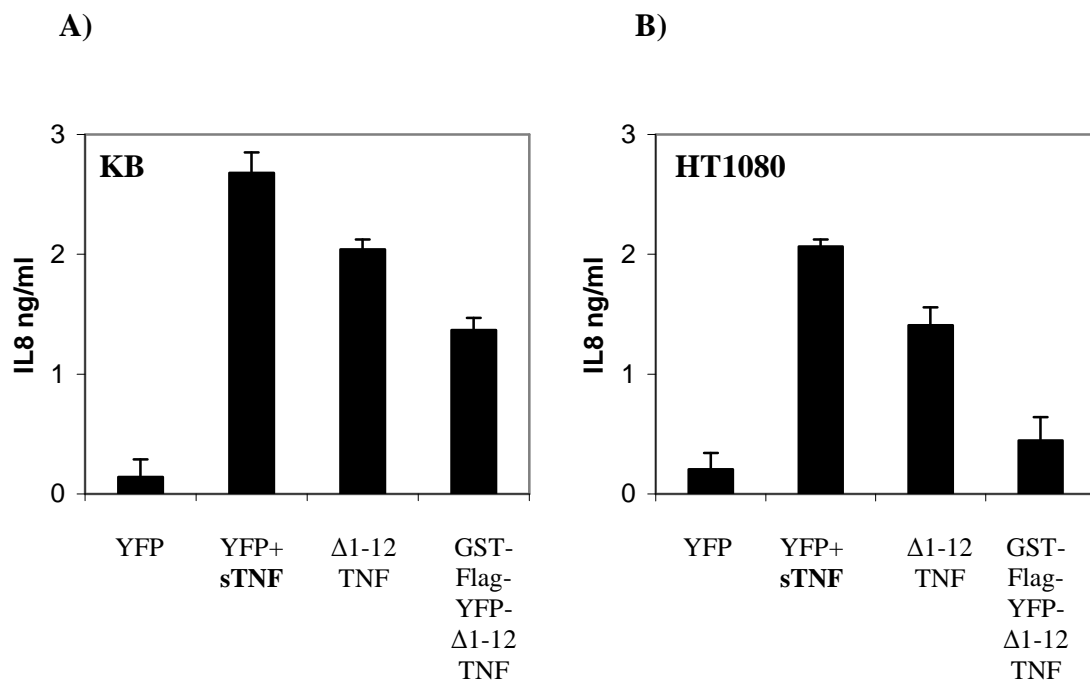
**Abb.6: Rezeptorselektivität der  $\Delta$ 1-12TNFVarianten im FACS**

293-Zellen wurden mit den oben benannten  $\Delta$ 1-12TNF-Varianten transfiziert. Als Kontrolle dienen untransfizierte Zellen. Nach 2 Tagen wurden die Zellen geerntet. Während ein Teil der Zellen nur mit anti-Fc-PE inkubiert wurde, wurde ein anderer mit TNFR1-Fc bzw. TNFR2-Fc und erst danach mit anti-Fc-PE inkubiert. Der Bindungsnachweis erfolgte in der Durchflusszytometrie auf FL2-H.

#### 4.2.3 $\Delta$ 1-12TNF induziert wie sTNF IL8

Rezeptorbindung ist nicht notwendigerweise gleichzusetzen mit Aktivität am Rezeptor. Daher wurde die Funktionalität der  $\Delta$ 1-12TNF-Varianten durch Messung ihrer IL8-Induktion geprüft. Die Regulation der IL8-Expression findet sowohl auf Ebenen der Modulation der mRNA-Stabilität als auch auf transkriptioneller Ebene statt.<sup>62</sup> Neben

des JNK-Signalwegs und des p38-MAPK-Signalwegs spielt v.a. NFκB eine zentrale Rolle bei der Regulation der IL8-Expression. IL8 ist damit ein geeignetes Zielgen zur Untersuchung TNF-induzierter Genexpression, insbesondere zur Untersuchung TNF-induzierter NFκB-Aktivierung. Die Bestimmung der IL8-Induktion nach FasL- und sTNF-Stimulation korreliert gut mit der FasL- und sTNF-induzierten NFκB-Aktivierung.<sup>63</sup> Somit sollte auch die Bestimmung der IL8-Induktion nach Δ1-12TNF-Stimulation Rückschlüsse auf die NFκB-Aktivierung durch Δ1-12TNF-Varianten und somit auf deren Aktivität am Rezeptor erlauben.

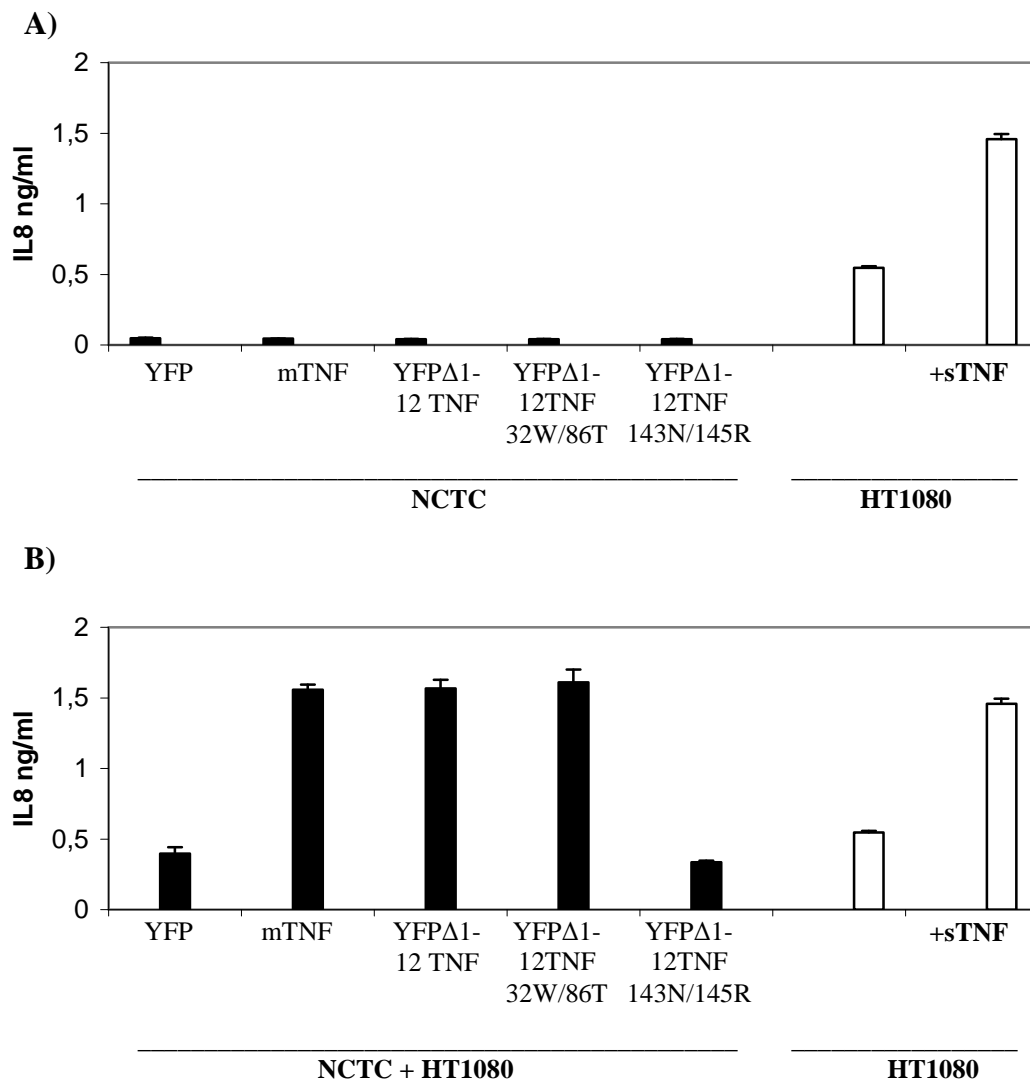


**Abb. 7: IL8 Induktion durch Δ1-12TNF in KB-Zellen**

KB-(A) oder HT1080-(B) Zellen wurden der Beschriftung entsprechend transfiziert. Am 2.Tag nach Transfektion wurde das Medium gewechselt. sTNF (20 ng/ml) wurde dort, wo angezeigt, zur Stimulation eingesetzt. Nach 6 h wurde das Medium abgenommen und im ELISA auf IL8 untersucht.

Wie erwartet induzierte nichtspaltbares Δ1-12TNF wie sTNF IL8 in KB- und HT1080-Zellen (Abb. 7). Eine vergleichende quantitative Beurteilung der Δ1-12TNF- und der sTNF-vermittelten IL8-Induktion war hier nicht möglich, da eine Konzentration des membranständigen Δ1-12TNF nicht angegeben werden konnte. Die geringere IL8-Induktion durch GST-Flag-YFP-Δ1-12TNF im Vergleich zu Δ1-12TNF kann auf die schlechtere Expression desselben in der transfizierten Zelle zurückgeführt werden (siehe Abb. 6).

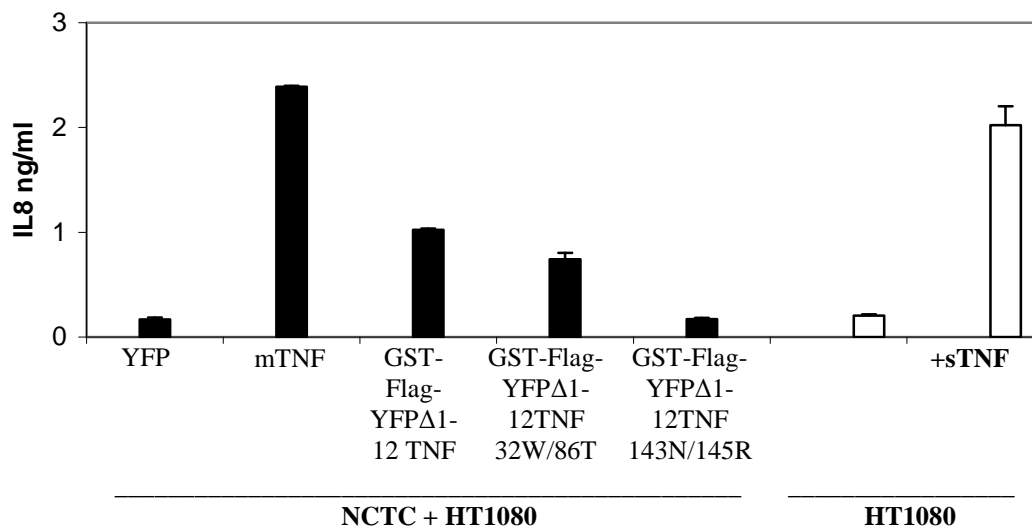
Eine autokrine IL8-Induktion durch nichtspaltbares TNF ließ sich in Abb. 7 nicht von einer parakrinen unterscheiden. Verwendet man dagegen eine nicht-humane Zelllinie zur Transfektion mit der entsprechenden  $\Delta$ 1-12TNF-Variante (Effektorzelle) und stimuliert mit dieser in Kokultur eine humane Zelllinie (Zielzelle), so sollte eine ausschließlich parakrine Aktivierung humaner TNF-Rezeptoren gesichert sein. Der Beginn der Kokultur von Effektor- und Zielzelllinie kann dann als Beginn der Stimulation der humanen Zielzelllinie definiert werden. Abb. 9 zeigt die IL8-Induktion durch die rezeptorselektiven YFP- $\Delta$ 1-12TNF-Varianten nach diesem Modell.



**Abb. 8: IL 8-Induktion in HT1080-Zellen durch  $\Delta$ 1-12TNF-Muteine**

Murine NCTC-Zellen wurden der Beschriftung entsprechend transfiziert. Am 2.Tag nach Transfektion wurde sie geerntet. Ein Teil der Zellen wurde, wie in A) dargestellt, allein weiterkultiviert, der andere Teil (B) mit HT1080-Zellen kokultiviert. Weitere Gruppen bildeten HT1080-Zellen allein, von denen eine Untergruppe mit sTNF (10 ng/ml) stimuliert wurde. Diese HT1080-Gruppen sind sowohl in A) als auch in B) dargestellt. 6 h nach Beginn der Kokultur bzw. Stimulation mit sTNF wurde das Medium abgenommen und im ELISA auf humanes IL8 untersucht.

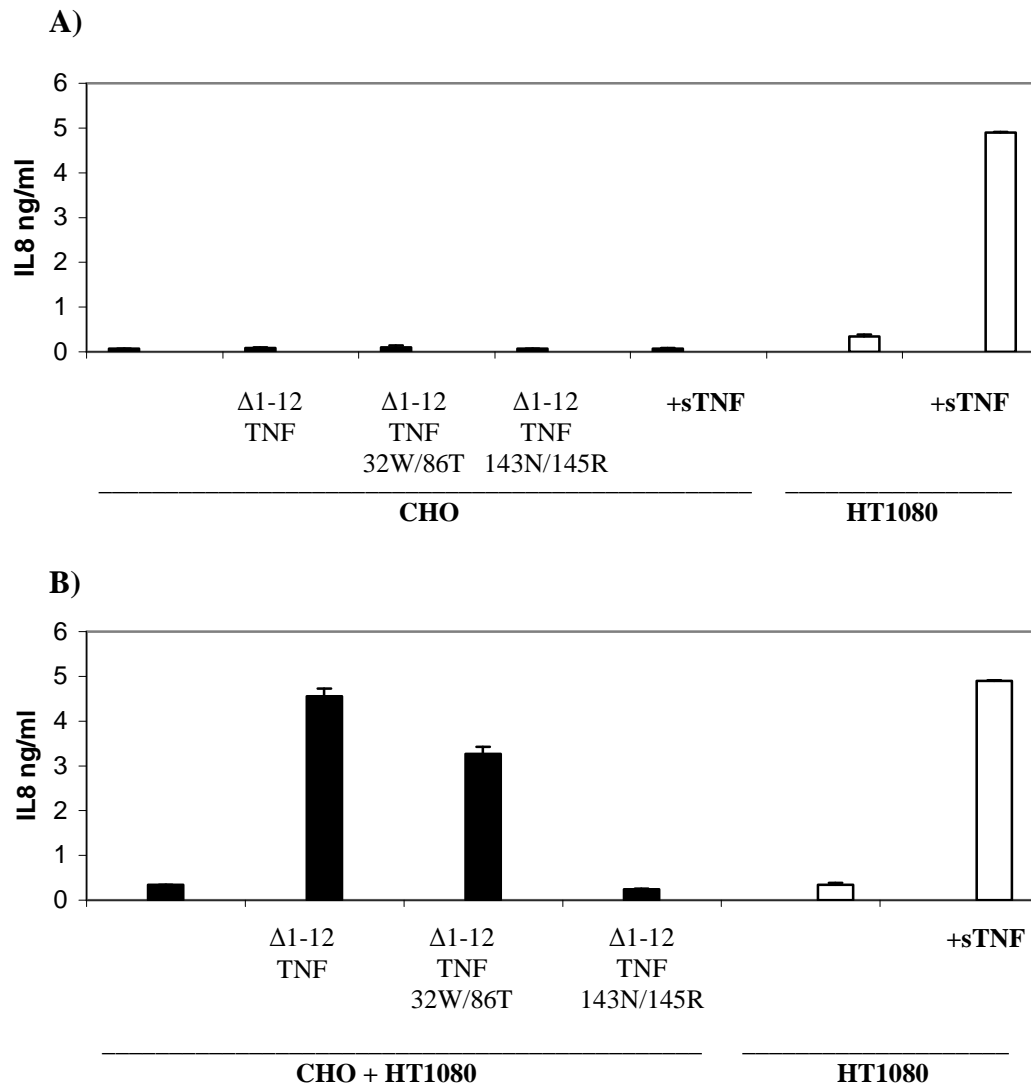
Wie erwartet wurde keine IL8-Induktion durch autokrine Stimulation der transfizierten NCTC (Maus)- Zellen gemessen (Abb. 8A). Es wurde ausschließlich das durch parakrine Stimulation induzierte IL8 der humanen HT1080-Zellen detektiert (Abb. 8B). Sowohl YFP- $\Delta$ 1-12TNF als auch das entsprechende TNFR1-selektive Mutein induzierten IL8 in einer mit sTNF vergleichbaren Größenordnung. Da HT1080-Zellen keinen TNFR2 exprimieren, konnte über die Funktionalität des TNFR2-spezifischen Muteins hier keine Aussage gemacht werden. Auch in KB-Zellen (Daten nicht gezeigt) und für die GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF-Muteine ließen sich diese Ergebnisse reproduzieren (Abb. 9).



**Abb. 9: IL 8-Induktion in HT1080-Zellen durch GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF-Muteine**

Der Versuchsaufbau entspricht dem in Abb.8, auf eine der Abb. 8A entsprechende Darstellung wurde verzichtet, da es auch hier ausschließlich zur parakrinen induzierten IL8-Produktion kam.

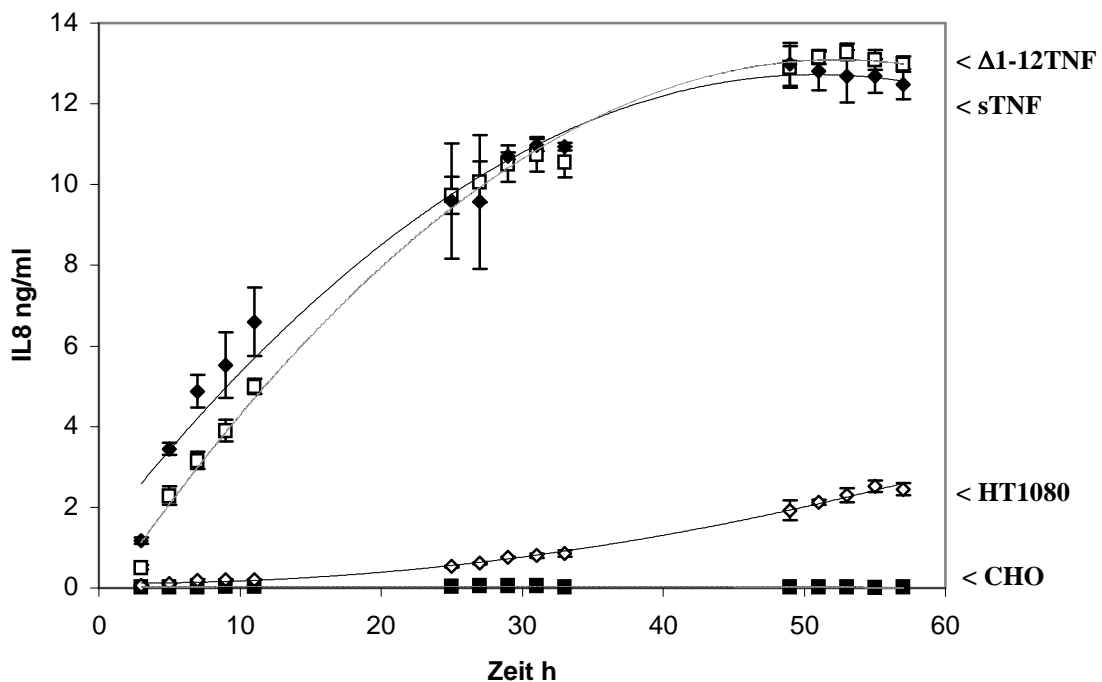
Im Vergleich zu parentalem mTNF wurde durch GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF weniger IL8 induziert. Dies kann wiederum auf die geringeren Expressionsrate in der Effektorzelle zurückgeführt werden (siehe Abb. 6). Wie die murinen NCTC-Zellen eigneten sich auch die stabil  $\Delta$ 1-12TNF-exprimierenden CHO (Hamster)-Zellen als Effektorzellen, da auch sie erwartungsgemäß keine Produktion von humanem IL8 zeigten (Abb. 10).



**Abb. 10: IL 8-Induktion in HT1080-Zellen durch  $\Delta$ 1-12TNF exprimierende CHO-Zellen**  
 CHO-Zellen sowie deren Transfektanten, die stabil verschiedene  $\Delta$ 1-12TNF-Varianten exprimieren, wurden als Effektorzellen eingesetzt. Die Methode entspricht der in Abb. 8.

#### 4.2.4 Die Kinetik der $\Delta$ 1-12TNF- und der sTNF-induzierten IL8-Induktion unterscheiden sich nicht

Um die Kinetik der  $\Delta$ 1-12TNF- und der sTNF-induzierten IL8-Induktion zu untersuchen, wurde die kumulative IL8-Induktion über drei Tage (Abb. 11) untersucht.



**Abb. 11: Vergleichende Untersuchung der Kinetik der  $\Delta$ 1-12TNF- und sTNF-induzierten IL8-Produktion**

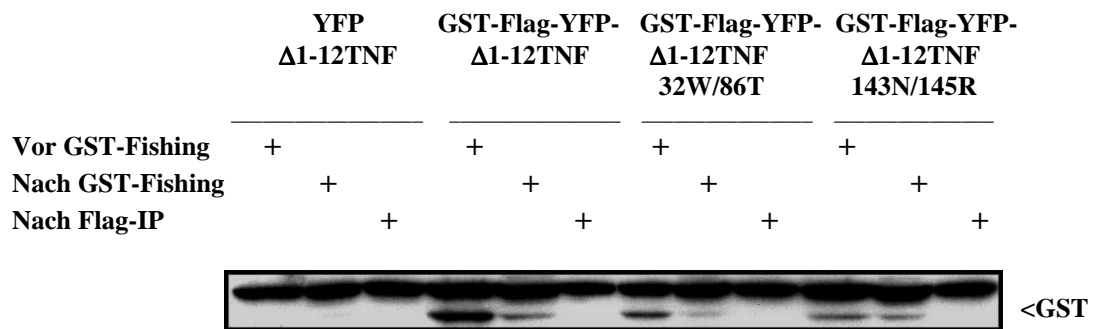
CHO- $\Delta$ 1-12TNF-Zellen in Kokultur mit HT1080-Zellen (Beschriftung:  $\Delta$ 1-12TNF) wurden mit CHO-Zellen in Kokultur mit HT1080-Zellen unter sTNF-Stimulation (10 ng/ml, Beschriftung: sTNF) verglichen. Kontrollgruppen bildeten CHO und CHO- $\Delta$ 1-12TNF allein (beide unter der mit CHO-markierten Kurve zusammengefasst) sowie CHO in Kokultur mit HT1080 (Beschriftung: HT1080). Alle 2 h wurde fünfmal am Tag über drei Tage Medium abgenommen.

In diesem Experiment zeigte sich, dass sich die Kinetik der durch sTNF- und  $\Delta$ 1-12TNF-induzierten IL8-Produktion über drei Tage nicht unterscheidet. Außerdem war sowohl für sTNF als auch für  $\Delta$ 1-12TNF am dritten Tag die IL8-Produktion gesättigt, der Kurvenverlauf zeigte keinen Anstieg mehr. Dabei fiel auf, dass auch die absolute Konzentration des gemessenen IL8 am dritten Tag in Sättigung ähnlich hoch war. Damit besteht offensichtlich auch kein quantitativer Unterschied zwischen der  $\Delta$ 1-12TNF- und der sTNF-induzierten IL8-Produktion.

### 4.3 Untersuchung $\Delta$ 1-12TNF-induzierter Rezeptorsignalkomplexe

#### 4.3.1 GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF-Muteine lassen sich effizient durch GST-Fishing und Flag-IP isolieren

Um die TNFR-Signalkomplexe auf  $\Delta$ 1-12TNF-Stimulation untersuchen zu können, müssen diese aus einem Gesamtzelllysat von Effektor- (exprimiert  $\Delta$ 1-12TNF) und Zielzelle (exprimiert TNFR1 und TNFR2) isoliert werden. Sowohl das GST-Fishing als auch die Flag-IP ermöglichten die Isolierung der GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF-Muteine (Abb. 12). Bereits nach alleinigem GST-Fishing nahm die Konzentration der GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF-Muteine im Gesamtzelllysat der Kokulturen stark ab. Nach sequentieller Durchführung von GST-Fishing und Flag-IP war das jeweilige GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF-Mutein im Gesamtzelllysat nicht mehr nachweisbar.



**Abb. 12: IP mit hoher Effizienz**

293 Zellen wurden der Beschriftung entsprechend transfiziert und am zweiten Tag nach Transfektion für 20 min mit U937-Zellen kokultiviert. Gesamtzelllysat vor GST-Fishing, nach GST-Fishing und nach Flag-IP wurden in WB auf GST untersucht.

#### 4.3.2 Aus den mit GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF-Muteinen stimulierten Zielzellen lassen sich rezeptorassoziierte Proteine koimmunopräzipitieren<sup>I</sup>

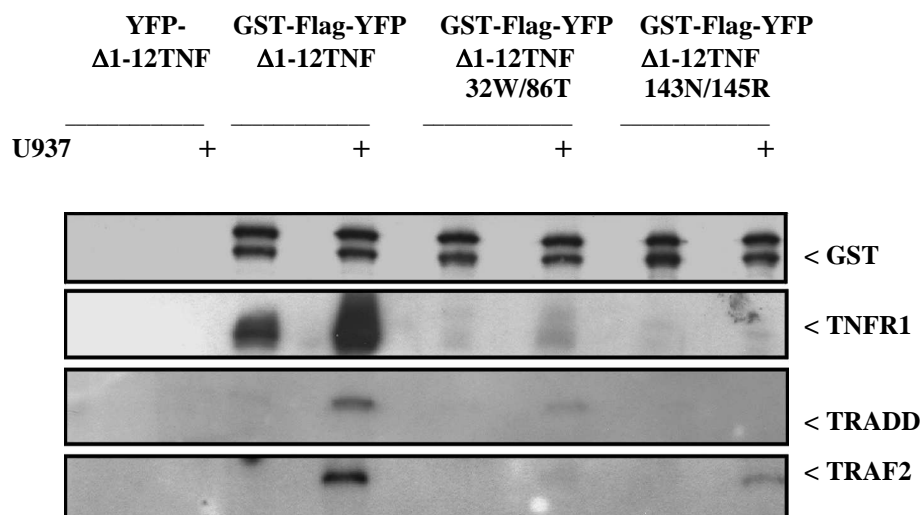
Mit Hilfe des GST-Fishings ließen sich mit GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF TNFR1, TRADD und TRAF2 koimmunopräzipitieren (Abb. 13 und Abb. 14). Die verwendeten

<sup>I</sup> In Analogie zur Immunopräzipitation wird im Folgenden im Zusammenhang mit der im GST-Fishing erfolgten Isolierung von Rezeptorsignalkomponenten nach GST-TNF-Stimulation auch von Koimmunopräzipitation gesprochen



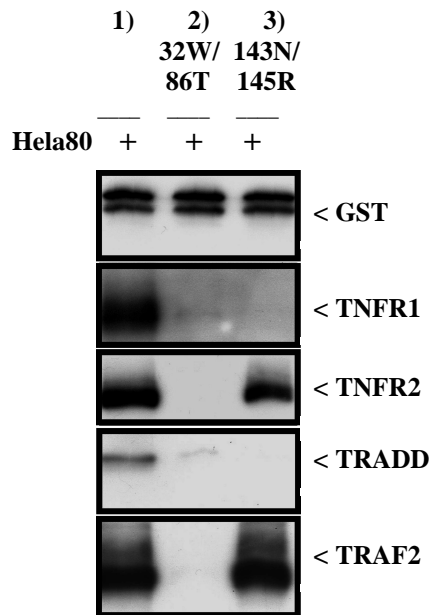
Effektorzellen (293-Zellen) besitzen selbst in geringem Maße TNFR1 (FACS-Daten nicht gezeigt), so dass es auch ohne Kokultur mit der Zielzelle zu einer gewissen Koimmunopräzipitation von TNFR1 kam (Abb. 13). TRADD und TRAF2 wurden dagegen ausschließlich aus der Zielzelle koimmunopräzipitiert. Damit wurden überwiegend Rezeptorsignalkomplexe nach parakriner Stimulation mit mTNF isoliert. Die verwendeten Zielzellen (U937 in Abb. 13, Hela80 in Abb. 14) besitzen sowohl TNFR1 als auch TNFR2, so dass es sich bei den mit GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF koimmunopräzipitierten Proteinen um die summierten Komponenten eines TNFR1- und TNFR2-Signalkomplex handelt.

In der FACS-Analyse wurde die selektive Bindung der GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF-Muteine an TNFR1-Fc und TNFR2-Fc gezeigt (siehe Abb. 6). Mit Hilfe des GST-Fishings ließen sich nun aus den mit den entsprechenden GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF-Muteinen stimulierten Zielzellen die membrangebundenen Rezeptorsignalkomplexe an TNFR1 und TNFR2 getrennt isolieren (Abb. 13 und Abb. 14). Mit GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF32W/86T gelang die selektive Isolierung des membrangebundenen TNFR1-Signalkomplexes. TNFR1, TRADD und TRAF2 wurden koimmunopräzipitiert. Allerdings zeigte sich eine deutlich geringere Effizienz im Vergleich zu parentalem GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF.



**Abb. 13: Muteinspezifische Immunopräzipitation**

293 Zellen wurden der Beschriftung entsprechend transfiziert und dort, wo mit + angezeigt, 20 min mit U937 kokultiviert. Nach Isolierung der GST-Fusionsproteine mittels Glutathion-Sepharose wurden die Proben im WB unter Verwendung von Ak gegen GST, TNFR1, TRADD und TRAF2 analysiert.



**Abb. 14: Muteinspezifische Immunopräzipitation**

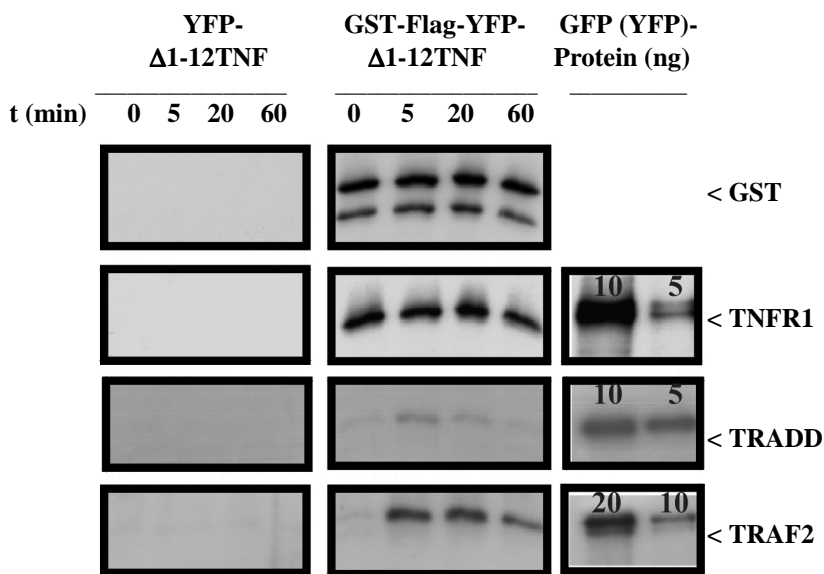
293 Zellen wurden mit GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF (1) bzw. den davon abgeleiteten TNFR1- (2) bzw. TNFR2 (3)-spezifischen Muteinen transfiziert und mit HeLa80 für 10 min kokultiviert. Nach Isolierung der GST-Fusinosproteine mittels Glutathion-Sepharose wurden die Proben im WB unter Verwendung von Ak gegen GST, TNFR1, TNFR2, TRADD und TRAF2 analysiert.

Nach Stimulation mit GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF143N/145R ließ sich der membrangebundene Rezeptorsignalkomplex an TNFR2 selektiv isolieren. Sowohl der TNFR2 (Abb. 14) als auch TRAF2 (Abb. 13 und Abb. 14) wurden koimmunopräzipitiert. Die Signale für TNFR2 und TRAF2 waren nur wenig schwächer als bei Stimulation mit parentalem GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF. TRADD war wie erwartet nicht an TNFR2 nachweisbar. Damit war die selektive Isolierung von Rezeptorsignalkomplexen an TNFR1 und TNFR2 nach Stimulation mit membrangebundenen TNF-Muteinen gelungen. Zugleich konnte gezeigt werden, dass TRADD genauso wie TRAF2 im TNFR1-Signalkomplex nachgewiesen werden kann, nicht jedoch FADD und Caspase-8 (Daten nicht gezeigt).

**4.3.3 Die TNFR1-TRADD-Assoziation zeigt im membrangebundenen Rezeptorsignalkomplex eine charakteristische Kinetik**

Der direkte Nachweis von TRADD im membrangebundenen Rezeptorsignalkomplex wurde im Modell der Kompartimentalisation der TNF-Signaltransduktion zumindest für sTNF in Frage gestellt.<sup>23</sup> Um die TNFR1-TRADD-Assoziation an der Membran näher

zu beleuchten, wurde daher der zeitliche Verlauf von mit mTNF koimmunopräzipitiertem TNFR1 und TRADD in U937-Zellen untersucht (Abb. 15). Die Menge an mit GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF koimmunopräzipitiertem TNFR1, TRADD und TRAF2 zum jeweiligen Zeitpunkt konnte mit Hilfe eines GFP- bzw. YFP-Standards definierter Konzentration abgeschätzt werden. Aus  $20 \times 10^6$  U937-Zellen wurden nahezu konstant etwa 8 ng TNFR1 immunopräzipitiert. Erst nach einer Stunde zeigte sich eine leichte Abnahme des Signals für TNFR1.



**Abb. 15: Zeitreihe**

293-Zellen wurden der Beschriftung entsprechend transfiziert und mit U937 für den angegebenen Zeitraum kokultiviert. Der Zeitpunkt 0 min steht für die getrennte Lyse von U937- und 293-Zellen mit anschließendem Mischen der Lysate. Nach GST-Fishing wurden die GST-Beads im WB auf GST, TNFR1, TRADD und TRAF2 untersucht. Zur Quantifizierung der koimmunopräzipitierten Proteine wurden TNFR1-GFP, TRADD-YFP und TRAF2-GFP definierter Konzentration aufgetragen.

Im Gegensatz dazu wurde TRADD mit etwa 3 ng /  $20 \times 10^6$  U937 maximal zum Zeitpunkt 5 min mit mTNF koimmunopräzipitiert. Bereits nach 20 min zeigte sich eine deutliche Abnahme des TRADD-Signals. Während also das Signal für TNFR1 nahezu konstant blieb, wurde bereits nach 20 min deutlich weniger TRADD koimmunopräzipitiert. Daraus kann gefolgert werden, dass die Assoziation von TRADD an TNFR1 mit der Zeit abnimmt. Auch TRAF2 wurde mit mTNF erneut aus U937 koimmunopräzipitiert. TRAF2 kann dabei aber sowohl aus dem membrangebundenen TNFR1- als auch TNFR2-Signalkomplex stammen. Aus  $20 \times 10^6$  U937-Zellen wurden an den beiden TNF-Rezeptoren gemeinsam etwa 15ng TRAF2 koimmunopräzipitiert.

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Charakterisierung löslicher Flag-TNF-Muteine

Punktmutationen in sTNF, welche zur TNFR1- bzw. TNFR2-selektiven Bindung des Zytokins führen, sind bereits seit längerem bekannt.<sup>58</sup> Dennoch wurde bisher zur Untersuchung des TNFR-Crosstalks, insbesondere der Modulation der TNFR1-Signaltransduktion durch TNFR2-Stimulation, ausschließlich auf agonistische Antikörper zurückgegriffen, um TNFR2 selektiv zu stimulieren. Dies liegt vor allem darin begründet, dass mTNF der Hauptaktivator von TNFR2 ist und damit TNFR2-selektives sTNF den TNFR2 nicht adäquat aktivieren kann.<sup>49</sup> Erkenntnisse für löslichen Flag-getaggten FasL, der nach M2-vermittelter Quervernetzung ähnlich wie mFasL Fas aktiviert,<sup>60</sup> wurden analog auf sTNF übertragen und führten zur Klonierung von rezeptorselektiven Flag-TNF-Muteinen. In dieser Arbeit wurden diese Flag-TNF-Muteine hinsichtlich ihrer rezeptorselektiven Bindung an die von Hela-Zellen exprimierten TNF-Rezeptoren geprüft. Es konnte erwartungsgemäß gezeigt werden, dass Flag-TNF32W/86T selektiv an den TNFR1, Flag-TNF143N/145R selektiv an den TNFR2 und das parentale Flag-TNF an beide TNF-Rezeptoren bindet (Abb. 2). Von Interesse war nun, ob das TNFR2-selektive Flag-Mutein quervernetzt auch wirklich den TNFR2 aktiviert. Dieser Nachweis gelang in Zytotoxizitätsassays. Durch Experimente zur Modulation der TNFR1-Signaltransduktion durch TNFR2-Stimulation mittels agonistischer, gegen TNFR2 gerichtete Antikörper ist bekannt, dass TNFR2-Vor- bzw. Kostimulation die TNFR1-vermittelte Zytotoxizität verstärkt.<sup>39, 53</sup> Das durch M2-vermittelte Quervernetzung aktivierte Flag-TNF143N/145R war ebenfalls in der Lage, die TNFR1-vermittelte Zytotoxizität zu verstärken (Abb. 3A). Auch mit Hilfe eines Antikörpers, welcher in der Lage ist, die sTNF-Wirkung auf TNFR2 zu erhöhen,<sup>61, 49</sup> konnte die Flag-TNF143N/145R-induzierte Verstärkung TNFR1-vermittelter Zytotoxizität nachgewiesen werden (Abb. 3B). Damit steht mit Flag-TNF143N/145R nun ein direkt von sTNF abgeleiteter Ligand als Alternative zu agonistischen Ak gegen TNFR2 zur Verfügung, mit dem die Untersuchung der Modulation TNFR1-vermittelter Signaltransduktion durch selektive TNFR2-Stimulation möglich ist.

## 5.2 Charakterisierung membrangebundener $\Delta 1$ -12TNF-Muteine

Proinflammatorischen Signalwege (NF $\kappa$ B) und auch die apoptotische Signaltransduktion nach Stimulation mit sTNF sind Gegenstand intensiver Forschung.<sup>23, 24, 30</sup> Vergleichsweise geringe Berücksichtigung fand bisher die Untersuchung dieser Signalvorgänge für mTNF, dem membrangebundenen Vorläufer von sTNF. Deshalb war es ein Hauptanliegen dieser Arbeit, verschiedene mTNF-Varianten näher zu charakterisieren, die in späteren Experimenten insbesondere die Isolierung und Untersuchung von Rezeptorkomplexen nach Stimulation mit mTNF ermöglichen sollen. Bei den charakterisierten mTNF-Varianten handelt es sich um GST-Flag-YFP- $\Delta 1$ -12TNF und dessen rezeptorselektive Muteine (Abb. 4). Für murines  $\Delta 1$ -12TNF ist bekannt, dass es am murinen TNFR1 bioaktiv ist. Anders als mTNF ohne  $\Delta 1$ -12-Mutation wird es jedoch nicht durch die spezifische Protease TACE zum löslichen Zytokin sTNF prozessiert.<sup>59</sup> In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich dieses Erkenntnis auf humanes YFP- $\Delta 1$ -12TNF und auch auf die davon abgeleiteten GST-Flag-YFP- $\Delta 1$ -12TNF-Muteine erweitern lässt (Abb.5). Nach Expression von YFP- $\Delta 1$ -12TNF in eukaryontischen Zellen ließ sich deutlich weniger sTNF im Zellüberstand nachweisen als bei Transfektion von parentalem YFP-mTNF. Beide mTNF-Varianten wurden zu je 90 % in der transfizierten Zelllinie exprimiert (Daten nicht gezeigt). Für GST-Flag-YFP- $\Delta 1$ -12TNF-Varianten ließ sich bei zugleich geringerer Expression (40 %) überhaupt kein sTNF nachweisen. Damit ist für diese mTNF-Varianten eine wichtige Voraussetzung zur validen Untersuchung von mTNF-Effekten in Abgrenzung zu sTNF-Effekten erfüllt. Transfiziert man  $\Delta 1$ -12TNF oder GST-Flag-YFP- $\Delta 1$ -12TNF in eukaryontische Zellen, besteht im Unterschied zur Transfektion von parentalem mTNF nicht die Gefahr, dass es zu sTNF prozessiert wird. Damit kann membrangebundenes TNF unabhängig von sTNF untersucht werden.

Auch die rezeptorselektive Bindung der genannten GST-Flag-YFP- $\Delta 1$ -12TNF-Muteine wurde geprüft. Es konnte gezeigt werden, dass parentales GST-Flag-YFP- $\Delta 1$ -12TNF sowohl TNFR1-Fc als auch TNFR2-Fc bindet. Im Gegensatz dazu bindet GST-Flag-YFP- $\Delta 1$ -12TNF32W/86T nur TNFR1-Fc, GST-Flag-YFP- $\Delta 1$ -12TNF143N/145R nur TNFR2-Fc (Abb.6). Dabei fiel eine hohe Selektivität der GST-Flag-YFP- $\Delta 1$ -12TNF-Muteine auf, zugleich aber auch ein gegenüber YFP-TNF verminderte Expressionsrate

(20 % anstatt von 90 %). Daraus wurde für Transfektionen mit GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF-Varianten der Schluss gezogen, die Menge an für die GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF-Mutante kodierender DNA zu erhöhen und bereits einmal transfizierte Zellen ein zweites Mal zu elektroporieren. Damit konnte die Expressionsrate für diese TNF-Varianten auf bis zu 80 % gesteigert werden (Daten nicht gezeigt).

### **5.3 Vergleich sTNF- und $\Delta$ 1-12TNF-induzierter IL8-Induktion**

In der komplexen Regulation der IL8-Expression spielen insbesondere der JNK-, p38-MAPK- und der NF $\kappa$ B-Signalweg eine zentrale Rolle. IL8 eignet sich deshalb als Zielgen zur Untersuchung TNF-induzierter Genexpression.<sup>62</sup> Aus diesem Grund wurden  $\Delta$ 1-12TNF und sTNF vergleichend auf IL8-Induktion untersucht, um so die  $\Delta$ 1-12TNF-induzierte Genexpression beurteilen zu können. Für KB- und HT1080-Zellen, die mit den diversen mTNF-Expressionsplasmiden transfiziert waren, konnte gezeigt werden, dass nichtspaltbares  $\Delta$ 1-12TNF wie sTNF in der Lage ist, IL8 zu induzieren (Abb.7). Die  $\Delta$ 1-12-Mutation scheint in humanem TNF keinen Einfluss auf die Funktionalität des membranständigen Liganden am Rezeptor zu haben. Eine herabgesetzte Affinität gegenüber dem Wildtyp, wie für murines  $\Delta$ 1-12TNF beschrieben,<sup>59</sup> kann daher - falls vorhanden - für humanes  $\Delta$ 1-12TNF nicht von grundsätzlicher funktioneller Bedeutung sein.

In diesen Experimenten konnte jedoch nicht zwischen einer autokrinen und parakrinen IL8-Induktion unterschieden werden. Auch ein Zeitpunkt, an dem die Stimulation an TNFR1 beginnt, konnte nicht definiert werden. Deshalb wurden zusätzlich Kokulturrexperimente durchgeführt, in denen eine nicht humane Zelllinie (NCTC oder CHO), die selbst kein humanes IL 8 freisetzen kann, zur Transfektion mit den verschiedenen mTNF-Varianten verwendet wurde. Der Beginn der Kokultur der transfizierten Zellen mit humanen KB- oder HT1080-Zellen (Abb. 8- 10) konnte dann als Startzeitpunkt einer parakrinen, mTNF-induzierten IL8-Produktion über TNFR1 definiert werden. In diesen Experimenten konnte die IL8-Induktion über TNFR1 für mTNF,  $\Delta$ 1-12TNF, YFP- $\Delta$ 1-12TNF und für GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF gezeigt werden. Für GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF fiel eine geringere IL8-Induktion im Vergleich zu mTNF auf. GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF wurde jedoch, wie oben erwähnt, in den transfizierten Zellen schlechter exprimiert, so dass aus diesen funktionellen Daten nicht

auf eine geringere Rezeptoraktivierung geschlossen werden kann. Auch das TNFR1-selektive Mutein von GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF war in der Lage, IL8 zu induzieren. Der direkte Vergleich von GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF mit seiner TNFR1-spezifischen Variante deutet allerdings bei gleicher Expression auf eine geringere Rezeptoraktivität des Muteins hin. Dazu passen auch die weiter unten besprochenen Ergebnisse der GST-Fishing-Experimente (Abb. 13 und Abb. 14).

Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede einer sTNF- und einer mTNF-induzierten Genexpression aufdecken zu können, wurden auch die Kinetik der  $\Delta$ 1-12TNF- und sTNF-provozierten IL8-Induktion miteinander verglichen (Abb. 11). Dabei konnten keine Unterschiede in der IL8-Produktionsrate über drei Tage festgestellt werden. Daher kann aus den durchgeführten Experimenten geschlossen werden, dass mTNF genauso effektiv wie sTNF über TNFR1 proinflammatorische Signale vermittelt. Nicht nur die kinetischen, auch die quantitativen Eigenschaften scheinen ähnlich zu sein. Inwieweit jedoch die Konzentration von eingesetztem sTNF für das Ergebnis eine Rolle spielt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Möglicherweise werden Unterschiede zwischen mTNF und sTNF erst sichtbar, wenn sTNF in niedrigerer (< 10 ng/ml) Konzentration eingesetzt wird. Während nämlich mTNF konstant exprimiert werden sollte, könnte sTNF bei geringerer Konzentration mit der Zeit verbraucht und seine IL8-Induktion entsprechend abnehmen. Offen bleibt auch die Frage, ob die Mechanismen der TNFR1-Aktivierung identisch sind. Für sTNF wurde gezeigt, dass es auf Ligandenbindung zur verstärkten Rekrutierung von TNFR1 und rezeptorassoziierten Proteine des NF $\kappa$ B-aktivierenden membrangebundenen Signalkomplex in *lipid rafts* kommt. Interferenz mit *lipid rafts* unterbindet die NF $\kappa$ B-Aktivierung, TNFR1-vermittelte Apoptose wird verstärkt.<sup>15</sup> Gleiches sollte nun auch für mTNF untersucht werden.

In den Versuchen zur Untersuchung der IL8-Induktion wurden in der vorliegenden Arbeit Zellen verwendet, die keinen TNFR2 exprimieren. Daher konnte stets selektiv die TNFR1-vermittelte IL8-Induktion untersucht werden. JNK-, p38-MAPK- und NF $\kappa$ B-Aktivierung sind jedoch auch für TNFR2 bekannt.<sup>1</sup> Deshalb könnten funktionelle Versuche zur IL8-Induktion über TNFR2 unter Verwendung der TNFR2-selektiven nichtspaltbaren mTNF-Varianten in Kokultur mit TNFR2-exprimierenden Zellen gleichfalls von Interesse sein. Zum einen könnte damit die quantitative Bedeutung der

proinflammatorischen Signaltransduktion über TNFR2 in Zellen mit beiden Rezeptoren bei mTNF-Stimulation abgeschätzt werden. Zum anderen könnte untersucht werden, ob sich der Crosstalk bei gleichzeitiger Aktivierung beider TNF-Rezeptoren qualitativ oder quantitativ auf die NF $\kappa$ B-Aktivierung auswirkt.

#### **5.4 Isolierung membrangebundener TNFR-Signalkomplexe**

Die GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF-Muteine können aufgrund der oben diskutierten Charakterisierung als nichtspaltbare membrangebundene TNF-Muteine bezeichnet werden. Ihre Funktionalität an TNFR1 konnte mittels der IL8-Bestimmungen bewiesen werden. Während parentales GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF an TNFR1 und TNFR2 bindet, sind GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF32W/86T und GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF143N/145R TNFR1- bzw. TNFR2-selektiv. Die Expression dieser neuen TNF-Varianten konnte anhand des YFP-Nachweis leicht im FACS geprüft werden.

Mit Hilfe dieser mTNF-Muteine war es möglich, mittels GST-Fishing die gebildeten TNFR-Signalkomplexe aus dem Gesamtzelllysat mTNF-transfizierter 293-Zellen und stimulierter U937-Zellen zu isolieren (Abb. 12). Aus GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF-stimulierten U937- und Hela80-Zellen gelang die Koimmunopräzipitation von TNFR1, TNFR2, TRADD und TRAF2 (Abb. 13 und Abb. 14). So war bewiesen, dass eine Isolierung der summierten Signalkomplexe an TNFR1 und TNFR2 möglich geworden war. TNFR1 wurde zwar in geringen Mengen auch aus 293-Zellen isoliert (Abb. 13), der Hauptanteil insbesondere der rezeptorassoziierten Proteine TRADD und TRAF2 kam jedoch aus der Zielzelle. Damit kann dieses Kokulturrexperiment als ein Experiment zur Isolierung von Rezeptorsignalkomplexen nach vorwiegend parakriner Stimulation einer Zielzelllinie bezeichnet werden. Um eine rein parakrine Stimulation zu gewährleisten, müssten analog zu den funktionellen Experimenten zur IL8-Induktion Effektorzellen ohne Expression humaner TNF-Rezeptoren eingesetzt werden.

Unter Einsatz der rezeptorselektiven Varianten von GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF konnten aus den Zelllinien, die sowohl TNFR1 als auch TNFR2 exprimieren, die beiden Rezeptorsignalkomplexe getrennt isoliert werden. Mit GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF32W/86T gelang die Koimmunopräzipitation von TNFR1, TRADD und TRAF2 (Abb. 13 und Abb. 14). Die Selektivität für TNFR1 ist allerdings mit einer verringerten Effizienz bei der Isolierung von TNFR1 verbunden. Da die Expression des Muteins in



293-Zellen der des parentalen GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF entsprach (siehe GST in Abb. 13 und Abb. 14 sowie FACS-Daten Abb. 6), muss auf eine herabgesetzte Affinität des TNFR1-selektiven Muteins geschlossen werden. Auch die vergleichsweise geringe Menge an koimmunopräzipitiertem TRADD sowie die funktionellen Daten zur IL8-Induktion sprechen für diese Vermutung.

Mit GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF143N/145R war es dagegen möglich, vergleichsweise große Mengen an TNFR2 zu isolieren. Wie erwartet wurde TRADD nicht an TNFR2 rekrutiert, TRAF2 dagegen schon. Die TRAF2-Rekrutierung spricht zugleich dafür, dass GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF143N/145R eine TNFR2-vermittelte Aktivierung intrazellulärer Signalwege auslöst.

Interessant war bei der selektiven Isolierung des Signalkomplexes an TNFR1 insbesondere der eindeutige Nachweis von TRADD und TRAF2 an TNFR1, während FADD und Caspase-8 nicht koimmunopräzipitiert werden konnten. Die funktionellen Daten im TNF-ELISA zeigten (siehe Abb. 5), dass  $\Delta$ 1-12TNF nicht zu sTNF gespalten wird. Weiterhin ist aus der schematischen Darstellung der GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF-Muteine (Abb. 4) ersichtlich, dass nur membrangebundenes TNF im GST-Fishing isoliert werden kann. Kommt es nämlich trotz  $\Delta$ 1-12-Mutation zur mTNF-Spaltung, werden mit der GST-Sequenz lediglich die intrazelluläre Domäne und die Transmembrandomäne von mTNF isoliert. Setzt man voraus, dass ein unprozessierter Rezeptor nach parakriner Stimulation durch einen membranständig exprimierten Liganden nicht internalisiert werden kann, so binden TRADD und TRAF2 an den TNFR1, ohne dass Rezeptorinternalisierung Voraussetzung sein könnte.

Bisher galt TRADD entsprechend auch als Plattform, die eine Rekrutierung von TRAF2 und RIP vermittelt und daher essentiell für die TNFR1-vermittelte NF $\kappa$ B-Aktivierung ist.<sup>21, 22</sup> Allerdings fehlten dafür entsprechende Beweise, die insbesondere mit TRADD-defizienten Zellen erbracht werden könnten. In Experimenten mit Mutanten von TNFR1, die sich durch eine fehlende Internalisierung auszeichnen, konnte kürzlich keine TRADD-, wohl aber eine TRAF2- und RIP-Rekrutierung an TNFR1 gezeigt werden.<sup>23</sup> Die Bindung von TRADD an TNFR1 im membrangebundenen TNFR1-Komplex nach sTNF-Stimulation wurde damit bezweifelt. Stattdessen wurde eine TRADD-Rekrutierung erst nach Rezeptorinternalisierung postuliert. Da NF $\kappa$ B unabhängig von der Rezeptorendozytose aktiviert wird, wurde so erstmals auch die

Bedeutung von TRADD für die NF $\kappa$ B-Aktivierung in Frage gestellt. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zur Isolierung membrangebundener TNFR1-Signalkomplexe hätte man entsprechend keine TRADD-Rekrutierung erwartet, da sich hier ein nicht internalisierbarer Ligand-Rezeptorkomplex ausbildet. Wie erläutert, wurde TRADD jedoch genauso wie TRAF2 an TNFR1 koimmunopräzipitiert. Daher muss zumindest für mTNF eine von der Rezeptorinternalisierung unabhängige TRADD-Rekrutierung möglich sein.

## **5.5 Die Rolle von TRADD im membrangebundenen TNFR1-Signalkomplex**

Um dieses Ergebnis zu bekräftigen, wurde die Kinetik der TRADD-Bindung an TNFR1 näher untersucht (Abb. 15). Zunächst soll das Signal für TNFR1 diskutiert werden. Zu allen Zeitpunkten zeigte sich ein weitgehend konstantes Signal für TNFR1, erst nach 1 h ließ sich eine leichte Abnahme feststellen. Der Nachweis von TNFR1 zum Zeitpunkt 0 min kann zum Teil durch die autokrine Stimulation transfizierter 293-Zellen (siehe Abb. 13) erklärt werden. Zusätzlich ist auch die Bindung von GST-Flag-YFP- $\Delta$ 1-12TNF an TNF-Rezeptoren nach Zellyse im gemischten Gesamtzelllysat von Effektor- und Zielzelle denkbar. Für sTNF ist eine TNFR1-Bindung auch noch nach Zellyse in IP-Versuchen belegt.<sup>24</sup> Die leichte Abnahme von koimmunopräzipitiertem TNFR1 nach 1 h könnte auf einen Abbau von TNF-Rezeptoren zur Auflösung membrangebundener Rezeptorsignalkomplexe hindeuten. Diese Annahme wird durch die für sTNF beobachtete TNF-induzierte Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von TNFR1 gestützt.<sup>24</sup> Durch die parakrine Stimulation mittels eines in der Zellmembran exprimierten Liganden kann eine Rezeptorinternalisierung des unprozessierten Rezeptors als Ursache der Abnahme ausgeschlossen werden.

Im Unterschied zu dem nahezu konstanten Signal für TNFR1 wird das Signal für koimmunopräzipitiertes TRADD bereits nach 20 min erkennbar schwächer. Dies deckt sich mit Versuchen nach Stimulation mit sTNF. Da sTNF-induzierte Ubiquitinierung und proteasomaler Abbau von TRADD nicht beobachtet wurden, deutet die im Vergleich zu TNFR1 früher einsetzende TRADD-Abnahme auf eine Dissoziation von TRADD von TNFR1 hin.<sup>24</sup> Somit bindet TRADD wohl nach mTNF-Stimulation im

membrangebundenen TNFR1-Signalkomplex und dissoziiert nach etwa 20 min vom Rezeptor.

## 5.6 Die TNFR1-vermittelte Apoptoseinduktion

Zur Apoptoseinduktion über TNFR1 gibt es gegenwärtig zwei unterschiedliche Modelle, das Modell der Kompartimentalisation und das Modell zweier sequentiell arbeitender Signalkomplexe.<sup>23, 24</sup> Beide Modelle basieren auf Daten, die ausschließlich für sTNF erhoben wurden und sollten daher auf ihre Gültigkeit für mTNF geprüft werden. Einigkeit besteht in beiden Modellen darüber, dass sich nach sTNF-Bindung an TNFR1 zunächst ein NFκB-aktivierender, d.h. antiapoptotischer, membranassoziierter Rezeptorsignalkomplex ausbildet. Damit unterscheidet sich der TNFR1-induzierte programmierte Zelltod entscheidend von dem Fas-, TRAILR1- und TRAILR2-vermittelten. Die Apoptoseinduktion durch die zuletzt genannten Rezeptoren ist durch die direkte membranassoziierte DISC-Bildung gekennzeichnet. FADD und Caspase-8 werden direkt an den Rezeptor rekrutiert.<sup>27, 28, 29</sup> Der membranassoziierte Komplex ist für diese Rezeptoren damit zunächst ein proapoptotischer und erst in zweiter Linie ein proinflammatorischer. Deshalb muss die Apoptose zur Untersuchung proinflammatorischer Signalwege für FasL und TRAIL zumeist inhibiert werden.<sup>63</sup>

Auch die Erkenntnis, dass die Apoptoseinduktion in sTNF-stimulierten Zellen durch Zerstörung der *lipid rafts* verstärkt, in FasL-stimulierten dagegen inhibiert wird, passt zu den mechanistischen Unterschieden der Signaltransduktion über die Rezeptoren dieser beiden Zytokine.<sup>64</sup> Geht man davon aus, dass in beiden Fällen durch Interferenz mit *rafts lipid* die Bildung des membrangebundenen Rezeptorsignalkomplexes verhindert wird, kann sich in FasL-stimulierten Zellen der membrangebundene DISC nicht mehr bilden. Die Apoptose wird daher inhibiert. In sTNF-stimulierten Zellen kann sich dagegen der membrangebundene NFκB-aktivierende Rezeptorsignalkomplex nicht mehr bilden. Die NFκB-Aktivierung nimmt also ab und - durch Wegfall der antiapoptotischen Genexpression über NFκB - die Apoptoseinduktion zu.

Trotz fehlender direkter membranassoziierter Bindung an TNFR1 sind FADD und Caspase-8 notwendig für die TNFR1-vermittelte Apoptoseinduktion. Dennoch ergaben sich Schwierigkeiten bei dem Versuch des direkten Nachweises dieser Proteine an TNFR1. Das hat zur Vorstellung geführt, dass sich ein DISC an TNFR1 erst nach

Endozytose des Rezeptors bildet (Modell der Kompartimentalisation).<sup>23</sup> In noch radikalerer Konsequenz wurde das Modell zweier sequentiell arbeitender Signalkomplexe postuliert.<sup>24</sup> Demnach bildet sich überhaupt kein DISC im engeren Sinne aus. Vielmehr induziert ein zweiter Signalkomplex die Apoptose, der sich erst im Zytoplasma ausbildet. In diesem ist TNFR1 selbst nicht mehr nachweisbar. Höchstens eine TRADD-vermittelte, schwache transiente und deshalb nicht nachweisbare Bindung von FADD und Caspase-8 an TNFR1 wird in diesem Modell für möglich gehalten. Die bisherige Untersuchung der Signalkomplexe nach mTNF-Stimulation in dieser Arbeit hat gezeigt, dass nach mTNF-Stimulation TRADD im membrangebundenen Signalkomplex nachzuweisen war, nicht jedoch FADD und Caspase-8. Somit kann auch nach mTNF-Stimulation eine direkte membrangebundene DISC-Bildung an TNFR1 bereits ausgeschlossen werden. Aussagen über eine TRADD-vermittelte, transiente DISC-Bildung unter proapoptischen Bedingungen erlauben die in dieser Arbeit erhobenen Daten jedoch nicht. Ein DISC ist möglicherweise nur unter bestimmten methodischen Gegebenheiten nachzuweisen. Darüber könnten Experimente unter proapoptischen Bedingungen und unter Optimierung des GST-Fishing-Protokolls Klarheit bringen. Untersuchungen nach CHX-Sensitivierung für Apoptose<sup>30</sup> genauso wie nach Vorstimulation an TNFR2 mit dem im Rahmen dieser Arbeit getesteten Flag-TNF143N/145R könnten hier hilfreich sein. Da man davon ausgehen kann, dass der unprozessierte TNFR1 auf mTNF-Stimulation hin nicht internalisiert werden kann, erscheint nach der bisherigen Datenlage das Modell der Kompartimentalisation für mTNF wenig einleuchtend. Gegen dieses Modell spricht insbesondere auch der Nachweis von TRADD an TNFR1, der bei fehlender Internalisierung dem Modell entsprechend nicht möglich sein sollte. Die Untersuchung der TRADD-Kinetik deutet zudem auf eine Dissoziation von TRADD vom Rezeptor mit der Zeit hin. Ein Modell, ähnlich dem zweier sequentieller Signalkomplexe, in dem TRADD die Bindung zu FADD und Caspase-8 durch Dissoziation vom membrangebundenen Signalkomplex vermittelt, könnte für mTNF daher eher Geltung haben.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

TNF wird zunächst als TypII-Transmembranprotein (mTNF) gebildet und erst anschließend durch spezifische Spaltung durch die Metalloprotease TACE zum löslichen Zytokin sTNF prozessiert. Da mTNF der alleinige Hauptaktivator des TNFR2 ist und sich bisherige Untersuchungen zum TNF-Signaling weitgehend auf sTNF konzentrierten, ist vergleichsweise wenig über TNFR2-vermittelte Signaltransduktion bekannt.

An TNFR1 sind dagegen beide TNF-Varianten bioaktiv. Trotz intensiver Untersuchung des TNFR1-Signaling sind jedoch auch hier viele Fragen noch unbeantwortet. Derzeit existieren deshalb zum TNFR1-Signaling zwei verschiedene Modellvorstellungen nebeneinander.

Im ersten Modell, dem Modell der Kompartimentalisation, bindet TRADD erst nach Rezeptorinternalisierung an TNFR1, genauso wie FADD und Caspase-8. Die Rezeptorinternalisierung nach Ligandenbindung gilt hier daher als Voraussetzung für die TRADD-Rekrutierung und für die Apoptoseinduktion.

Im zweiten Modell, dem Modell zweier sequentiell arbeitender Signalkomplexe, bindet TRADD dagegen bereits im membrangebundenen Signalkomplex an TNFR1. Anschließend dissoziiert TRADD vom Rezeptor, um im Zytoplasma einen zweiten, apoptoseinduzierenden Komplex mit FADD und Caspase-8 zu formen.

Um mehr über TNFR2 zu erfahren und um das TNFR1-Signaling besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit die Signaltransduktion und die Geninduktion über TNFR1 und TNFR2 nach Stimulation mit mTNF untersucht. Ziel war es letztlich, eine Methode zu etablieren, die es erlaubt, membrangebundene TNFR1- und TNFR2-Signalkomplexe getrennt zu isolieren.

Dazu wurden zunächst nicht zu sTNF spaltbare TNFR1- bzw. TNFR2-spezifische mTNF-Varianten mit GST-Tag hinsichtlich Rezeptorbindung und Rezeptoraktivierung näher charakterisiert. Die selektive Bindung dieser mTNF-Varianten an TNFR1 bzw. TNFR2 konnte gezeigt werden. Auch der Nachweis ihrer Funktionalität in Versuchen zur IL8-Induktion war möglich. Mit Hilfe der TNFR1-spezifischen mTNF-Variante gelang im GST-Fishing die Koimmunopräzipitation von TNFR1, TRADD und TRAF2 und damit die Isolierung des membrangebundenen Signalkomplexes des TNFR1. Mit

Hilfe einer TNFR2-spezifischen Variante konnten dagegen TNFR2 und TRAF2 koimmunopräzipitiert werden, TRADD dagegen nicht. Somit ließen sich mit den rezeptorspezifischen Varianten von mTNF die Rezeptorsignalkomplexe des TNFR1 und TNFR2 getrennt isolieren. Interessant war dabei insbesondere die TRADD-Rekrutierung an TNFR1 im membrangebundenen TNFR1-Signalkomplex. Da die Internalisierung von TNFR1 nach mTNF-Stimulation schwer vorstellbar ist, bindet TRADD offensichtlich an TNFR1, ohne dass eine Rezeptorinternalisierung Voraussetzung wäre. Damit erscheint das Modell der Kompartimentalisation zumindest für mTNF wenig plausibel. Dagegen sind die bisher für mTNF erhobenen Daten mit einer TRADD-Dissoziation vom Rezeptor vereinbar, weshalb ein Modell zweier sequentiell arbeitender Signalkomplexe durchaus auch für mTNF Gültigkeit besitzen könnte.

## 7. ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-3-ethylenbenzthiaolinsulfonsäure
Ak	Antikörper
Ala	Alanin
APS	Ammonium-Persulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
°C	Grad Celcius
Caspase	Cysteiny Aspartat-spezifische Protease
cFLIP	cellular Flip
CHX	Cycloheximid
DD	Death Domain
DISC	Death-inducing Signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetra-Essigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fetal Calf Serum
FADD	Fas-Associated DD Protein
FLICE	FADD-Like ICE
FLIP	FLICE-Inhibitory Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2Hydroxyethyl)-1-piperazino]-Ethansulfonsäure
IAP	Inhibitor of apoptosis

ICE	Interleukin-1beta-Converting Enzyme
IKK	I $\kappa$ B Kinase Komplex
I $\kappa$ B	Inhibitor of NF $\kappa$ B
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
min	Minute
nm	Nanometer
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor kappaB
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PLAD	Pre-Ligand Association Domain
RIP	Receptor-Interacting Protein
RNA	Ribonucleic Acid
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunden
Ser	Serin
TACE	TNF $\alpha$ Converting Enzyme
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Thr	Threonin
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	TNF-Rezeptor
TRAF	TNF-Receptor Associated Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRAILR	TRAIL-Rezeptor
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
Trp	Tryptophan
U/min	Umdrehungen/Minute



## 8. LITERATURVERZEICHNIS

---

- <sup>1</sup> Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Rev Cell Death and Differentiation* 10, 45-65
- <sup>2</sup> Mannel DN, Echtenacher B (2000). TNF in the inflammatory response. *Chem. Immunol.* 74, 141-161
- <sup>3</sup> Taylor PC (2001). Anti-tumor necrosis factor therapies. *Curr. Opin. Rheumatol.* 13, 164-169
- <sup>4</sup> Taylor PC, Peters AM, Paleolog E et al. (2000). Reduction of chemokine levels and lymphocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 38-47
- <sup>5</sup> Blam ME, Stein RB and Lichtenstein GR (2001). Integrating anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease: current and future perspectives. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 1977-1997
- <sup>6</sup> Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3666-3670
- <sup>7</sup> Eggermont AM, ten Hagen TL (2001). Isolated limb perfusion for extremity soft-tissue sarcomas, in-transit metastases, and other unresectable tumors: credits, debits, and future perspectives. *Curr. Oncol. Rep.* 3, 359-367
- <sup>8</sup> Baker D, Butler D, Scallon BJ, O'Neill JK, Turk JL, Feldmann M (1994). Control of established experimental allergic encephalomyelitis by inhibition of tumor necrosis factor (TNF) activity within the central nervous system using monoclonal antibodies and TNF receptor-immunoglobulin fusion proteins. *Eur J Immunol.* 24, 2040-2048
- <sup>9</sup> Arnason BGW, Jacobs G, Hanlon M et al. (1999). TNF neutralization in MS – Results of a randomized, placebo controlled multicenter study. *Neurology* 53: 457-465
- <sup>10</sup> Ashkenazi, Dixit (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308
- <sup>11</sup> Wallach et al. (1999). TNF-Receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu. Rev Immunol.* 17, 331-367

- 
- <sup>12</sup> Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001). The TNF and TNF-Receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501
- <sup>13</sup> Wicovsky A, Muller N, Daryab N, Marienfeld R, Kneitz C, Kavuri S, Leverkus M, Baumann B, 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, 2174-83
- <sup>14</sup> Chan FK, Jun HJ, Zheng L et al. (2000). A domain in TNF Receptors that mediates ligand- independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351-2354
- <sup>15</sup> Legler DF, Micheau O, Doucey MA, Tschopp J, Bron C (2003). Recruitment of TNFR1 to lipid rafts is essential for TNF $\alpha$ -mediated NF $\kappa$ B activation. *Immunity* 18, 655-664
- <sup>16</sup> Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF $\kappa$ B signal. *Immunity* 8, 297–303
- <sup>17</sup> Ting AT, Pimentel-Muinos FX, and Seed B (1996). RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF $\kappa$ B but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J.* 15, 6189–6196
- <sup>18</sup> Lee SY, Reichlin A, Santana A, Sokol KA, Nussenzweig MC, Choi Y (1997). TRAF2 is essential for JNK but not NF $\kappa$ B activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity* 7, 703–713
- <sup>19</sup> Yeh WC, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, de la Pompa JL, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Ohashi P, Rothe M, Goeddel DV, Mak TW (1997). Early lethality, functional NF $\kappa$ B activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* 7, 715–725
- <sup>20</sup> Tada K, Okazaki T, Sakon S, Kobarai T, Kurosawa K, Yamaoka S, Hashimoto H, Mak TW, Yagita H, Okumura K, Yeh WC, Nakano H (2001). Critical Roles of TRAF2 and TRAF5 in Tumor Necrosis Factor-induced NF $\kappa$ B Activation and Protection from Cell Death. *J. Biol. Chem.* 276, 36530–36534
- <sup>21</sup> Hsu H, Huang J, Goeddel DV (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF $\kappa$ B activation. *Cell* 81, 495-504

- 
- <sup>22</sup> Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV (1996b). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP-1 to the TNFR1 signaling complex. *Immunity* 4, 387-396
- <sup>23</sup> Schneider-Brachert W, Tschikov V, Schütze S, et al. (2004). Compartmentalization of TNFR1-Signaling: Internalized TNF Receptosomes as Death Signaling Vesicles. *Immunity* 21, 415-428
- <sup>24</sup> Micheau O, Tschopp J (2003). Induction of TNFR1-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181-190
- <sup>25</sup> Zhang SQ, Kovalenko A, Cantarella G, Wallach D (2000). Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKK $\gamma$ ) upon receptor stimulation. *Immunity* 12, 301–311
- <sup>26</sup> Devin A, Cook A, Lin Y, Rodriguez Y, Kelliher M, Liu Z (2000). The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNFR1: TRAF2 recruits IKK to TNFR1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 12, 419–429
- <sup>27</sup> Scaffidi C, Kirchhoff S, Krammer PH, Peter ME (1999). Apoptosis signaling in Lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 277-285
- <sup>28</sup> Boatright KM, Renshaw M, Salvesen GS et al. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell* 11, 529-541
- <sup>29</sup> Wajant H (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635-1636
- <sup>30</sup> Harper N, Hughes M, MacFarlane M, Cohen GM (2003). FADD and Caspase-8 are not recruited to the TNFR1 signaling complex during TNF-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 25534-25541
- <sup>31</sup> Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNFR1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299-308
- <sup>32</sup> Thomas LR, Stillman DJ, Thorburn A (2002). Regulation of Fas-associated death domain interactions by the death effector domain identified by a modified reverse two-hybrid screen. *J. Biol. Chem.* 277, 34343-34348
- <sup>33</sup> Varfolomeev EE, Boldin MP, Goncharov TM, Wallach D (1996). A potential mechanism of “crosstalk” between the p55 tumor necrosis factor receptor and

---

Fas/Apo1: proteins binding to the death domains of the two receptors also bind to each other. *J. Exp. Med.* 183, 1271-1275

<sup>34</sup> Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, 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

<sup>35</sup> Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. (1998). NF- $\kappa$ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680-1683

<sup>36</sup> Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW (1997). Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF $\kappa$ B control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10057-10062

<sup>37</sup> Clem RJ (2001). Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death Differ.* 8, 137-143

<sup>38</sup> Roy N, Deveraux QL, Takahashi R et al. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 16, 6914-6925

<sup>39</sup> Fotin-Mleczek M, Henkler F, Samel D, Wajant H. et al. (2002). Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2 induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependant activation of caspase-8. *J. Cell Sci.* 115, 2757-2770

<sup>40</sup> Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J (2001). NF $\kappa$ B signal induce the expression of c-Flip. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5299-5305

<sup>41</sup> Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H (2001). NF $\kappa$ B inducers upregulate cFlip, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3964-3973

<sup>42</sup> Irmeler M, Thome M, Tschopp J et al. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195

<sup>43</sup> Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S (2001). FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 21, 8247

<sup>44</sup> Eissner G, Kolch W, Scheurich P (2004). Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15(5), 353-366

- 
- <sup>45</sup> Wiley SR, Goodwin RG, Smith CA (1996). Reverse signaling via CD30 ligand. *J. Immunol.* 157, 3635
- <sup>46</sup> Miyashita T, McIlraith MJ, Grammer AC, Miura Y, Attrep JF, Shimaoka Y, Lipsky PE (1997). Bidirectional regulation of human B cell responses by CD40-CD40 ligand interactions. *J. Immunol.* 158, 4620
- <sup>47</sup> Suzuki I, Fink PJ (1998). Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signaling through Fas ligand. *J. Exp. Med.* 187, 123
- <sup>48</sup> Langstein J, Michel J, Fritsche J, Kreutz M, Andreesen R, Schwartz H (1998). CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bidirectional signaling. *J. Immunol.* 160, 2488
- <sup>49</sup> Grell M, Douni E, Wajant H, Scheurich P et al. (1995). The transmembrane form of TNF is the prime activating ligand of the 80 kDa TNF receptor. *Cell* 83, 793-802
- <sup>50</sup> Kollias G, Kontoyiannis D (2003). Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine Growth Factor Rev* 13 (4-5), 315-21
- <sup>51</sup> Akassoglou K, Douni E, Bauer J, Lassmann H, Kollias G, Probert L (2003). Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* 100(2), 709-714
- <sup>52</sup> Grell M, Scheurich P, Meager A, Pfizenmaier K (1993). TR60 and TR80 TNF-receptors can independently mediate cytotoxicity. *Lymphokine Cytokine Res.* 12, 143-148
- <sup>53</sup> Grell M, Zimmermann G, Gottfried E, Strasser A, et al. (1999). Induction of cell death by TNFR2, CD 30 and CD 40: a role for TNFR1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J.* 18, 3034-3043
- <sup>54</sup> Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83, 1243-1252
- <sup>55</sup> Li X, Yang Y, Ashwell JD (2002). TNFR2 und cIAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 416, 345-347

- 
- <sup>56</sup> Weingärtner M, Siegmund D, Schlecht U, Fotin-Mleczek M, Scheurich P, Wajant H (2002). Endogenous membrane TNF is a potent amplifier of TNFR1-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 34853-34859
- <sup>57</sup> Schneider P, Schwenzler R, Haas E, Wajant H, et al. (1999). Tweak can induce cell death via endogenous TNF and TNFR1. *Eur. J. Immunol.* 29, 1785-1792
- <sup>58</sup> Loetscher H, Stueber D, Banner D, Mackay F, Lesslauer W (1993). Human TNF alpha mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF Receptors. *J. Biol. Chem.* 268, 26350-26357
- <sup>59</sup> Decoster E, Vanhaesebroeck B, Vandenabeele P, Grooten J, Fiers W (1995). Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine TNF. *J. Biol. Chem.* 270, 18473-18478
- <sup>60</sup> Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J (1998). Conversion of membrane-bound Fas (CD95) Ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J. Exp. Med.* 187, 1205-1213
- <sup>61</sup> Grell M, Wajant H, Zimmermann G, Scheurich P (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci* 95(2), 570-5
- <sup>62</sup> Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 72, 847-855
- <sup>63</sup> Kreuz S, Siegmund D, Rumpf JJ, Samel D, Leverkus M, Janssen O, Hacker G, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Scheurich P, Wajant H (2004). NFκB activation by Fas is mediated through FADD, Caspase-8 and RIP and is inhibited by Flip. *J. Cell Biol.* 166, 369-380
- <sup>64</sup> Muppidi JR, Siegel RM (2004). Ligand-independent redistribution of Fas into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. *Nat. Immunol.* 5, 182-189

---

## **DANKSAGUNG**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Harald Wajant für die stets ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Peter Rieckmann für die wohlwollende und zügige Erstellung des Zweitgutachtens, sowie dem Laborteam des Instituts für Molekulare Innere Medizin der Universität Würzburg, insbesondere Frau Dr. Daniela Siegmund, Herrn Andreas Wicovsky, Herrn Jost Julian Rumpf und Herrn Dr. Frank Henkler für die produktive und kollegiale Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt auch der großen persönlichen Unterstützung meiner Eltern, meiner Frau Silvia und ihrer Eltern.

---

## LEBENS LAUF

Clemens Warnke, geboren am 23.08.1979 in München

### Schul Ausbildung

1986-1992 Grundschule Marburg  
1992-1999 Siebold-Gymnasium Würzburg

### Zivildienst

1999-2000 Medizinische Poliklinik Würzburg, Überwachungsstation

### Hochschulausbildung

2000-2007 Medizinstudium an der Universität Würzburg  
9/2002 Ärztliche Vorprüfung  
8/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
9/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
5/2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2005-2006 Praktisches Jahr in Newcastle (UK), Edinburgh (UK), Toronto (Canada) und Würzburg

### Promotion

2003-2007 Institut für Molekulare Innere Medizin, **Publikation:**  
[Henkler F, Behrle E, Dennehy KM, Wicovsky A, Peters N, Warnke C, Pfizenmaier K, Wajant H.](#) The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability. J Cell Biol. 2005 Mar 28;168(7):1087-98.

Datum: 5. Juni 2007

Unterschrift:

