

**Aus dem Institut für Molekulare Innere Medizin
der Universität Würzburg**

Leiter: Professor Dr. rer. nat. Harald Wajant

Mechanismen der TRAIL-induzierten Signaltransduktion

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jost-Julian Rumpf

aus Göttingen

Würzburg, Oktober 2007

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

Koreferentin: Prof. Dr. med. Claudia Sommer

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 09.04.2008

Der Promovend ist Arzt

1 Einleitung	1
1.1 Die TNF-Liganden- und TNF-Rezeptorfamilie.....	1
1.2 Apoptose	3
1.2.1 Mechanismen der Apoptoseinduktion	4
1.2.1.1 Todesrezeptor-vermittelte Apoptose	4
1.2.1.2 Apoptoseinduktion über den intrinsischen Weg.....	5
1.2.2 Regulation der Apoptoseinduktion	6
1.2.2.1 Die Bcl2-Familie	6
1.2.2.2 Regulation der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose durch FLIP.....	7
1.2.2.3 Regulation der Caspase-Aktivität durch IAPs.....	7
1.3 TRAIL.....	8
1.3.1 TRAIL-Todesrezeptoren	9
1.3.2 TRAIL-„Decoy“-Rezeptoren.....	10
1.3.3 TRAIL-induzierte Apoptose.....	11
1.3.4 TRAIL und NFκB	13
1.3.4.1 NFκB	13
1.3.4.2 Regulation der TRAIL-induzierten Apoptose durch NFκB	14
1.3.4.3 TRAIL-induzierte NFκB-Aktivierung.....	14
1.3.5 TRAIL und IFNγ	15
1.4 Zielsetzung.....	16
2 Material	17
2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien, Materialien	17
2.2 Puffer und Lösungen.....	18
2.3 Antikörper	19
2.4 Zelllinien.....	19
3 Methoden.....	20
3.1 Kultivierung und Konservierung der KB-Zellen	20
3.2 Ermittlung von Zellzahlen	20
3.3 Zytotoxizitätsanalyse und IL8-ELISA.....	21
3.3.1 Zellaussaat und Stimulation.....	21
3.3.2 Zytotoxizitätsanalyse	21
3.3.3 IL8-Bestimmung mittels IL8-ELISA	21
3.4 Nachweis von Zelloberflächenrezeptoren mittels Durchflusszytometrie	22
3.5 Transienter Transfer von siRNA.....	23
3.6 Westernblotanalysen	23
3.6.1 Herstellung der Zellysate.....	23
3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	23
3.6.3 SDS-PAGE.....	24
3.6.4 Westernblot	24
3.6.5 Immunodetektion.....	25
3.7 NFκB-ELISA	25
3.7.1 Herstellung der Zellkernextrakte	25
3.7.2 Detektion	26

4 Ergebnisse	27
4.1 Apoptotische und nicht-apoptotische Fas-Signaltransduktion	27
4.1.1 IFN γ verstärkt die FasL-induzierte Apoptose.....	27
4.1.2 IFN γ verstärkt die FasL-induzierte NF κ B-Aktivierung in KB-Zellen.....	28
4.2 Untersuchung der FasL-induzierten Signaltransduktion in Bcl2-exprimierenden Zellen	30
4.2.1 Bcl2-Expression inhibiert die FasL-induzierte Apoptose.....	30
4.2.2 Die FasL-induzierte IL8-Produktion ist im Vergleich zu den parentalen KB-Zellen in Bcl2-exprimierenden KB-Zellen verstärkt	31
4.3 KB-Zellen exprimieren TRAILR1, TRAILR2 und TRAILR4.....	32
4.3.1 IFN γ bewirkt eine Reduktion der TRAILR4-Expression in KB-Zellen	34
4.4 Einfluss von IFN γ auf die TRAIL-induzierte Apoptose und nicht-apoptotische Signaltransduktion	34
4.4.1 IFN γ sensibilisiert KB-Zellen für TRAILR1- und TRAILR2-vermittelte Apoptose	35
4.4.2 IFN γ verstärkt die TRAILR1-vermittelte IL8-Produktion in KB-Zellen	36
4.5 Bcl2 schützt KB-Zellen vor TRAILR1- und TRAILR2-vermittelter Apoptose..	37
4.6 Bcl2-Expression verstärkt die TRAIL-induzierte IL8-Produktion.....	38
4.7 TRAILR1 aktiviert NF κ B.....	39
4.7.1 TRAILR1 vermittelt die Degradation von I κ B α in KB-Zellen.....	40
4.7.2 NF κ B Kernlokalisierung.....	41
4.8 Modulation der TRAIL-Rezeptor-vermittelten Geninduktion durch FLIP	42
4.8.1 Die TRAIL-induzierte IL8-Produktion wird in KB-Zellen sowohl durch FLIP _L als auch durch FLIP _S inhibiert.....	42
4.8.2 Inhibition der TRAIL-Rezeptor-vermittelten IL8-Produktion durch endogen exprimiertes FLIP	44
5 Diskussion.....	46
5.1 FasL induziert das NF κ B-Zielgen IL8 in KB-Zellen.....	46
5.2 FasL-induzierte Signaltransduktion in Bcl2-exprimierenden Zellen.....	47
5.3 Modulation der TRAIL-Rezeptor Expression durch IFN γ	48
5.4 IFN γ verstärkt die TRAIL-induzierte Apoptose und NF κ B-Aktivierung	49
5.5 TRAIL-induzierte I κ B α -Degradation und Kerntranslokalisierung von NF κ B.....	51
5.6 Modulation der TRAIL-Rezeptor-vermittelten NF κ B-Aktivierung durch FLIP.	51
6 Zusammenfassung	54
7 Abkürzungen.....	55
8 Literaturverzeichnis	58

1 Einleitung

1.1 Die TNF-Liganden- und TNF-Rezeptorfamilie

1975 konnte ein durch Zellen des Immunsystems sezerniertes Zytokin identifiziert werden, das besonders aufgrund seiner Tumorzell-toxischen Wirkung Aufsehen erregte (Carswell et al., 1975; Helson et al., 1975). Dieses daraufhin Tumor Nekrose Faktor (TNF) genannte Zytokin wurde zum namengebenden Prototypen einer Gruppe von in der Folge entdeckten Zytokinen und zugehörigen Rezeptoren, die aufgrund von strukturellen Gemeinsamkeiten zur TNF-Liganden-Familie bzw. TNF-Rezeptor (TNFR)-Familie zusammengefasst werden. Die Liganden und korrespondierenden Rezeptoren der TNF-Familie bzw. TNFR-Familie werden hauptsächlich durch Zellen des Immunsystems exprimiert und spielen insbesondere bei der Koordination und Modulation zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Inflammation, Nekrose und Apoptose eine entscheidende Rolle (Locksley et al., 2001). Die Funktionen der Mitglieder der TNF- und TNFR-Familie umfassen auf der einen Seite für den Organismus vorteilhafte und protektive Effekte wie die Regulation von Entzündungsprozessen oder die Vermittlung einer adäquaten Immunantwort. Auf der anderen Seite resultiert die Dysregulation dieses Systems in chronischer Entzündung, dem Syndrom des septischen Schocks, Kachexie oder der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Hehlgans & Pfeffer, 2005). Weiterhin spielen die Mitglieder der TNF- und TNFR-Familie eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Krebserkrankungen (Aggarwal et al., 2002). Somit kann die Erforschung der Wirkmechanismen dieses komplexen Ligand-Rezeptor-Systems der Schlüssel zu einem besseren Verständnis der Pathogenese und besserer Therapie von Autoimmunerkrankheiten, entzündlichen- und neoplastischen Erkrankungen sein.

Die Liganden der TNF-Familie sind Typ II Transmembranproteine, die als membranständige oder lösliche Form, mit zum Teil veränderten Eigenschaften, vorkommen können (Idriss & Naismith, 2000). So kann membranständiger TNF α durch die Metalloprotease TACE („TNF-Alpha Converting Enzyme“) abgespalten und in löslicher Form freigesetzt werden, die sich von der membranständigen Form bezüglich ihrer Aktivität gegenüber den beiden TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 unterscheidet (Black et al., 1997; Grell et al., 1995). Die Liganden der TNF-Familie entfalten ihre biologische Funktion mittels korrespondierender Rezeptoren, die aufgrund

struktureller Homologien einer gemeinsamen Proteinfamilie zugeordnet werden können, der TNFR-Familie (Locksley et al., 2001). Die Mitglieder der TNFR-Familie sind Typ I Transmembranproteine und besitzen keine intrinsische Enzymaktivität. Als charakteristisches Merkmal enthalten sie in ihrer extrazellulären Domäne eine bis sechs Kopien einer cysteinreichen Subdomäne (CRD), welche typischerweise jeweils drei Disulfid-Brücken enthält (Smith et al., 1994).

Sowohl die membranständige als auch die lösliche TNF-Form sind als Homotrimere aktiv, welche nach früherer Meinung durch Trimerisierung der monomeren Rezeptoruntereinheiten den initialen Schritt für die Aktivierung der Rezeptoren induzieren (Smith et al., 1994). Nach neueren Erkenntnissen konnte im Gegensatz zu diesem als „ligand induced trimerisation model“ bezeichneten Mechanismus, für TNFR1, TNFR2, Fas, CD40 und TRAIL-Rezeptor 1 die Bildung Liganden-unabhängiger, prä-formierter Rezeptorkomplexe gezeigt werden. Diese wird über einen als „Pre-Ligand Association Domain“ (PLAD) bezeichneten Bereich der extrazellulären Domäne vermittelt und ist für die Rezeptoraktivierung notwendig (Chan et al., 2000, Siegel et al., 2000). Die Bindung eines Liganden an die präformierten Rezeptorkomplexe führt schließlich zu einer strukturellen Reorganisation der Rezeptoruntereinheiten und ermöglicht dadurch die Aktivierung intrazellulärer Signalwege. In der zytoplasmatischen Domäne der Rezeptoren der TNFR-Familie dienen unterschiedliche Interaktionsmotive als Bindungsstelle für zytoplasmatische Adaptermoleküle. Aufgrund dieser Interaktionsmotive können die Mitglieder der TNFR-Familie in drei Subklassen unterteilt werden (Dempsey et al., 2003). Die TRAF („TNF Receptor Associated Factor“-)bindenden Rezeptoren entfalten ihre Signalfunktion in Säugern unter anderem mittels sechs verschiedener TRAF-Moleküle (Wajant et al., 1999). Nachdem diese an der TRAF-Bindedomäne gebunden haben, aktivieren sie intrazelluläre Kinasen oder binden weitere regulatorische Proteine und Adapterproteine. Die in ihrem intrazellulären Teil eine Todesdomäne (DD)-enthaltenden Rezeptoren der TNFR-Familie üben ihre Signalfunktion durch DD-enthaltende Adapterproteine über DD-DD Interaktion aus und werden aufgrund ihres in manchen Fällen starken zytotoxischen Potentials allgemein als Todesrezeptoren bezeichnet. Rezeptoren der dritten Gruppe besitzen keinen zytoplasmatischen Rezeptorteil oder zumindest hinsichtlich der apoptotischen Wirkung nur

funktionsunfähige zytoplasmatische Interaktionsmotive. Diese Rezeptoren werden als „Decoy“ (Köder)-Rezeptoren bezeichnet (s. 1.3.2).

1.2 Apoptose

Der apoptotische Zelltod ist sowohl für die Entwicklung als auch für die Aufrechterhaltung eines mehrzelligen Organismus von zentraler Bedeutung (Jacobson et al., 1997). Der Begriff Apoptose oder programmierter Zelltod beschreibt eine Form des Zellsterbens, das durch einen spezifischen Stimulus ausgelöst wird und zu keiner inflammatorischen Reaktion führt. In Abgrenzung zur Apoptose kommt es im Rahmen des nekrotischen Zelltodes zu einem Anschwellen der Zelle, Veränderungen an den Mitochondrien und Platzen der Zellmembran sowie der intrazellulären Organellenmembranen. Dies bedingt die unkontrollierte Freisetzung des zytoplasmatischen Inhalts und inflammatorischer Mediatoren. Zudem kann der nekrotische Untergang infizierter Zellen durch Freisetzung intrazellulärer Pathogene zu einer Infektionsausbreitung im Organismus führen (Rathmell & Thompson, 1999). Im Gegensatz dazu bleibt die Integrität der Plasmamembran beim apoptotischen Zelltod bis zum phagozytotischen Abbau der untergegangenen Zelle erhalten (Hengartner, 2000). Es kommt vielmehr zur Bildung apoptotischer Membranvesikel, die dann hauptsächlich von dendritischen Zellen und Makrophagen ohne Entstehen einer größeren Entzündungsreaktion phagozytiert werden (Platt et al., 1998).

Der apoptotische Zelltod ist an vielen wichtigen physiologischen Prozessen beteiligt. So spielt der programmierte Zelltod insbesondere für die funktionelle Aufrechterhaltung des normalen Immunsystems eine zentrale Rolle. Hierzu gehören unter anderem die Eliminierung aktivierter reifer T-Zellen zur Beendigung einer Immunantwort, die Eliminierung Virus-infizierter oder maligner Zellen durch zytotoxische T-Zellen und natürliche Killer-Zellen sowie die Tötung von Entzündungszellen an immunprivilegierten Orten wie z. B. dem Auge (Schultz & Harrington, 2003). Die Dysregulation des apoptotischen Programms kann jedoch zur Entstehung von malignen Tumoren (Igney & Krammer, 2002), zu Autoimmunerkrankungen (Ravirajan, 1999), sowie neurodegenerativen Erkrankungen (Mattson, 2000) führen.

1.2.1 Mechanismen der Apoptoseinduktion

Die Aktivierung des apoptotischen Programms kann durch zwei prototypische Signaltransduktionswege induziert werden, die beide letztendlich zur Aktivierung von Proteasen, den so genannten Caspasen („Cysteiny Aspartat-specific Proteinases“) führen (Abb. 1). Der intrinsische Signaltransduktionsweg beschreibt die durch strukturelle Veränderungen der Mitochondrien ausgelöste Apoptose, welche durch Stressfaktoren wie z. B. Wachstumsfaktorenentzug, Chemotherapeutika oder ultraviolette Strahlung getriggert wird. Die Induktion der Apoptose über den extrinsischen Signaltransduktionsweg erfolgt hingegen durch Todesrezeptoren nach exogener Stimulation.

1.2.1.1 Todesrezeptor-vermittelte Apoptose

Das typische Strukturmotiv der Todesrezeptoren der TNFR-Familie stellt die im zytoplasmatischen Rezeptorteil liegende Todesdomäne dar. Dieses ca. 80 Aminosäuren umfassende und aus sechs antiparallelen- α -Helices bestehende Strukturmotiv konnte zuerst für Fas und TNFR1 mittels Deletionsmutagenese beschrieben werden (Itoh & Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1991). Neben Fas und TNFR1 konnten weiterhin TRAILR1, TRAILR2, DR3, DR6, NGFR und EDAR als Todesrezeptoren identifiziert werden. Das am besten untersuchte Beispiel der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose ist die Aktivierung des Todesrezeptors Fas durch den Fas-Liganden (FasL). In Abwesenheit des Liganden bildet Fas zunächst inaktive prä-formierte Komplexe (Siegel et al., 2000). Interaktion mit dem trimeren FasL bedingt dann die Bildung supramolekularer FasL-Fas Cluster und die Reorganisation der inaktiven Fas-Komplexe, was die Bildung des „Death Inducing Signaling Complex“ (DISC) ermöglicht. Im Fall von Fas wird zunächst FADD („Fas-Associated Death Domain“) (Chinnaiyan et al., 1995), das am C-Terminus eine Todesdomäne und eine als DED („Death-Effector-Domain“) bezeichnete Proteininteraktionsregion am N-Terminus besitzt, über DD-DD Interaktion rekrutiert. Die DED von FADD interagiert dann mit der DED der inaktiven Caspase-8/10 (Boldin et al., 1996). Der Fas-DISC besteht somit aus Fas, FADD und Pro-Caspase-8/10. Seine Bildung führt zur autokatalytischen Spaltung und Aktivierung der Caspase-8/10 Pro-Formen durch „induced proximity“ (Salvesen & Dixit, 1999). Die aktivierten Caspasen-8/10 prozessieren und aktivieren

schließlich Effektor-Caspasen wie Caspase-3, welche durch Spaltung weiterer Proteine letztendlich den apoptotischen Zelltod bewirken.

1.2.1.2 Apoptoseinduktion über den intrinsischen Weg

Der intrinsische Signaltransduktionsweg der Apoptoseinduktion wird im Gegensatz zur Weiterleitung spezifischer, körpereigener pro-apoptotischer Stimuli (Todesliganden) via Todesrezeptoren durch unspezifische, schädliche Umwelteinflüsse wie z. B. DNA-Schädigung induziert. Eine zentrale Rolle spielt in diesem Zusammenhang die Bildung eines intrazellulären, als Apoptosom bezeichneten Komplexes, der zur Aktivierung von Caspase-9 führt (Baliga & Kumar, 2003) (Abb. 1). Von besonderer Bedeutung ist hierbei das Mitochondrium, das Bax/Bak-abhängig neben den pro-apoptotischen Faktoren HtrA2/Omi („High temperature requirement protein A2“) und Smac/Diablo („Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP Binding Protein with Low PI“), Cytochrom c freisetzt (Barnhart et al., 2003). Cytochrom c bildet dann zusammen mit APAF-1 („Apoptotic Protease Activating Factor 1“), dATP/ATP und Pro-Caspase-9 den als Apoptosom bezeichneten Komplex, der jeweils mehrere Moleküle jedes Proteins enthält. Daraufhin wird die inaktive Caspase-9 durch Dimerisierung oder Oligomerisierung aktiviert und kann nun ihrerseits andere Caspasen, ähnlich der DISC-aktivierten Caspase-8, durch Spaltung aktivieren. HtrA2/Omi und Smac/Diablo üben ihre pro-apoptotische Funktion über eine Blockierung der Caspase-Inhibition durch Mitglieder der IAP („Inhibitor of Apoptosis Protein“-)Familie aus (Verhagen & Vaux, 2002).

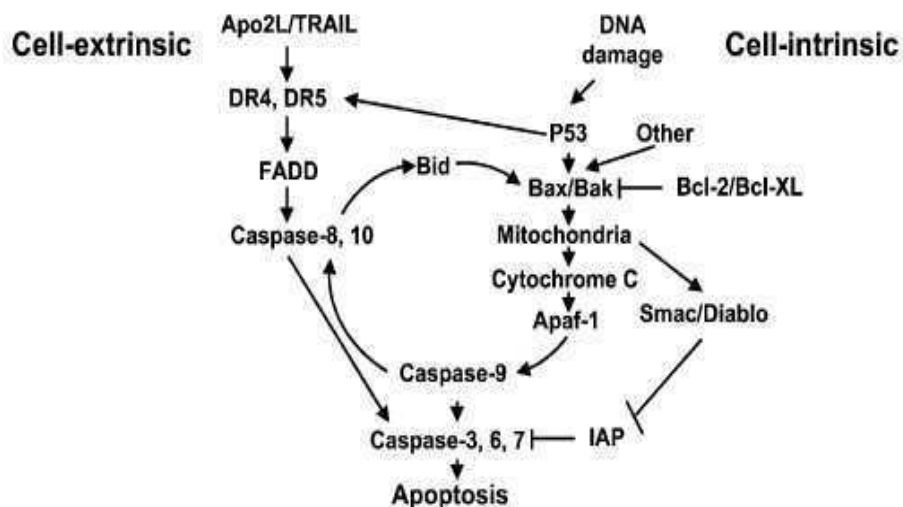


Abb. 1: Apoptoseinduktion über den extrinsischen- und intrinsischen Signaltransduktionsweg Details s. Text (aus Almasan & Ashkenazi, 2003)

1.2.2 Regulation der Apoptoseinduktion

1.2.2.1 Die Bcl2-Familie

Aufgrund ihres starken pro-apoptotischen Potentials muss die Freisetzung der genannten mitochondrialen Moleküle streng reguliert werden. Die Aufrechterhaltung der Integrität der Mitochondrienmembran wird durch Proteine der Bcl2-Familie gesteuert (Borner, 2003). Es lassen sich drei funktionelle Gruppen unterscheiden: Anti-apoptotische Mitglieder, wie Bcl2 oder BclxL, sind mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert und dienen der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität. Die Mitglieder der zweiten Gruppe, die so genannten „BH3-only“ Proteine, sind unter normalen Umständen inaktiv, können nach Aktivierung aber Mitglieder der dritten Gruppe, wie z. B. die pro-apoptotisch wirkenden Proteine Bax und Bak aktivieren (Sprick & Walczak, 2004). Ein gemeinsames Merkmal der anti-apoptotischen, wie auch der pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl2-Familie stellt die Konservierung einer oder mehrerer Bcl2 Homologie Domänen (BH1–BH4) dar, welche entscheidend für die regulatorische Aktivität und die Vermittlung von Protein-Protein Interaktion unter den Bcl2-Proteinen sind. So verhindert die Deletion von BH1 oder BH2 in Bcl2 die Heterodimerisierung mit Bax und Bcl2 verliert somit die Fähigkeit, Bax-induzierten Zelltod zu inhibieren (Reed, 1996). Eine Verbindung zwischen dem oben beschriebenen Rezeptor-vermittelten extrinsischen und dem Mitochondrien-vermittelten intrinsischen Signaltransduktionsweg ist durch das BH3-only Protein Bid gegeben (Luo et al., 1998). Bid wird Caspase-8-vermittelt aktiviert und transloziert daraufhin zum Mitochondrium, wodurch es zur Freisetzung von Cytochrom c und somit einer Verstärkung des extrinsisch-vermittelten Signals kommt (Abb. 1). Dieser Effekt kann sowohl auf der Aktivierung von Bax/Bak beruhen (Wei et al., 2000), als auch durch Inhibition anti-apoptotischer Mitglieder der Bcl2-Familie (Marsden & Strasser, 2003) vermittelt werden.

Die unterschiedliche Sensibilität von Zelllinien gegenüber FasL/Fas-induzierter Apoptose führte zur Unterscheidung von zwei Zelltypen (Schmitz et al., 1999). Typ I Zellen sind durch eine starke Fas-vermittelte DISC-Bildung und darauf folgende Aktivierung von Effektor-Caspasen charakterisiert. Diese Zellen können nicht durch Überexpression anti-apoptotischer Vertreter der Bcl2-Familie vor Fas-vermittelter Apoptose geschützt werden. In Typ II Zellen hingegen wird nur eine schwache DISC-

Bildung nach Stimulation mit FasL erreicht. Diese Zellen benötigen eine Verstärkung des extrinsischen apoptotischen Signals über den intrinsischen, mitochondrialen Signaltransduktionsweg und können somit durch anti-apoptotisch wirkende Mitglieder der Bcl2-Familie vor Fas-vermittelter Apoptose geschützt werden.

1.2.2.2 Regulation der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose durch FLIP

Die Steuerung der Caspasenaktivierung stellt einen bedeutsamen Punkt zum Schutz der Zelle vor unkontrollierter Auslösung des apoptotischen Programms dar. Natürlich-vorkommende zelluläre Moleküle, die in der Lage sind, eine Aktivierung von Pro-Caspase-8 zu verhindern, stellen wichtige Regulatoren der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose dar. Nach der Entdeckung viraler Moleküle, die eine Aktivierung von Pro-Caspase-8 inhibieren, konnte auch in Vertebraten ein homologes Molekül identifiziert werden. Dieses „cellular Flice-Like Inhibitory Protein“ (FLIP) genannte Molekül kommt hauptsächlich in zwei Isoformen vor, FLIP-long (FLIP_L) und FLIP-short (FLIP_S) (Irmeler et al., 1997). Beide Proteine besitzen zwei DED-Motive, die denen der Pro-Caspase-8 sehr ähnlich sind. Während FLIP_S nur aus den zwei DED-Motiven besteht, enthält FLIP_L daneben eine Caspase-8-Homologie-Domäne, die aufgrund von Veränderungen im aktiven Zentrum aber nicht enzymatisch wirksam ist. Während für FLIP_S eine vollständige Inhibition der proteolytischen Caspase-8-Prozessierung gezeigt werden konnte (Krueger et al., 2001), erlaubt die Existenz von FLIP_L im DISC immer noch eine unvollständige Prozessierung von Caspase-8 (Scaffidi et al., 1999). Für FLIP konnte eine direkte Interaktion mit FADD nachgewiesen werden (Irmeler et al., 1997). Weiterhin wurde die anti-apoptotische Funktion von cFLIP durch Unterbindung der Caspasen-Aktivierung eindeutig belegt (Kataoka et al., 1998). FLIP stellt somit einen wirksamen Inhibitor der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose dar.

1.2.2.3 Regulation der Caspase-Aktivität durch IAPs

Neben Bcl2 und cFLIP stellen Mitglieder der IAP („Inhibitor of Apoptosis Protein“-Familie eine weitere wichtige Klasse von Apoptose-Inhibitoren dar. Alle Mitglieder der IAP-Familie sind durch eine Zink-bindende, BIR („Baculovirus IAP Repeat“) genannte Domäne charakterisiert, die für die anti-apoptotische Funktion entscheidend ist (Salvesen & Duckett, 2002). Ein weiteres Strukturmerkmal stellt die RING-Domäne

dar, welche durch Übertragung von Ubiquitin die proteasomale Degradation von Zielmolekülen einleiten kann (Joazeiro & Weissman, 2000). Im Gegensatz zu FLIP ist der inhibitorische Effekt nicht nur auf Initiator-Caspasen beschränkt. So übt das am besten untersuchte Mitglied der IAP-Familie, XIAP, seine anti-apoptotische Funktion durch direkte Interaktion mit der aktivierten Caspase-9 und den Effektor-Caspasen 3 und 7 aus (Roy et al., 1997). Des Weiteren kann, neben der Caspase-inhibierenden Wirkung, die proteasomale Degradation des pro-apoptotischen SMAC/DIABLO durch Ubiquitinierung über die RING-Domäne eingeleitet werden (MacFarlane et al., 2002).

1.3 TRAIL

Apo2-Ligand oder TRAIL (“Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand”) wurde ursprünglich aufgrund seiner Sequenz-Homologie mit FasL identifiziert und ist wie dieser ein typisches Mitglied der TNF-Familie (Wiley et al., 1995; Pitti et al., 1996). Während TRAIL mRNA in vielen Geweben konstitutiv exprimiert wird, scheint die Expression von funktionellem TRAIL auf Zellen des Immunsystems wie T-Zellen, natürliche Killerzellen, Monozyten, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten beschränkt zu sein (Kayagaki et al., 1999; Griffith et al., 1999a; Fanger et al., 1999; Koga et al., 2004). Verstärkte Aufmerksamkeit erlangte TRAIL durch Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass rekombinant hergestelltes, lösliches TRAIL selektiv Tumorzellen, nicht aber normale Zellen tötet (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999). Während der therapeutische Nutzen anderer Mitglieder der TNF-Familie wie FasL und TNF durch deren systemische Toxizität limitiert ist, weckte TRAIL aufgrund seiner geringeren Toxizität gegenüber normalen Zellen und einem höheren Grad an Spezifität für neoplastische Zellen die Hoffnung auf eine mögliche klinische Anwendung.

TRAIL wird als Typ 2 Transmembranprotein synthetisiert, wobei die extrazelluläre Domäne, analog zur Prozessierung von TNF durch TACE, abgespalten werden kann. Somit besteht die Möglichkeit, dass TRAIL in vivo auch in löslicher Form vorliegt (Wajant et al., 2001; Liabakk et al., 2002). Wie die meisten anderen Liganden der TNF-Familie bildet TRAIL Homotrimere, die zur Rezeptoraktivierung jeweils drei Rezeptormoleküle zwischen ihren drei Untereinheiten binden (Hymowitz et al., 1999). Auch hier ist nach neueren Daten analog zu Fas die Bildung prä-formierter TRAIL-Rezeptor-

Komplexe über die PLAD wahrscheinlich, die durch Interaktion mit trimerem TRAIL reorganisiert werden und die Bildung des DISC ermöglichen (s. 1.3.3). Für optimale Stabilität und biologische Aktivität der TRAIL-Homotrimere ist ein Zink-Ion nötig, das von Cysteinresten (Cys 230) des trimeren TRAIL gebunden wird (Bodmer et al., 2000). So kann die verstärkte Toxizität bestimmter TRAIL-Präparationen gegenüber normalen Hepatozyten eventuell auf das Fehlen von Zn^{2+} und der damit verbundenen schlechteren Löslichkeit und Aggregation von TRAIL zu oligomeren TRAIL-Formen zurückgeführt werden (Lawrence et al., 2001). Auch Antikörper-vernetzte TRAIL-Formen zeigen gleichfalls eine stärkere Toxizität gegenüber einigen normalen Zellen als der trimere, Zn^{2+} -enthaltende Ligand (Almasan & Ashkenazi, 2003).

1.3.1 TRAIL-Todesrezeptoren

TRAIL bindet an vier verschiedene, nahe verwandte membranständige Rezeptoren und an einen löslichen Rezeptor, die allesamt der TNF-Rezeptorfamilie zugeordnet werden können. TRAIL-Rezeptor 1 (TRAILR1, DR4) (Pan et al., 1997a) und TRAIL-Rezeptor 2 (TRAILR2, DR5) (MacFarlane et al., 1997) besitzen beide eine zytoplasmatische Todesdomäne, die das charakteristische Strukturmotiv aller Todesrezeptoren darstellt. Ihre Hauptfunktion besteht in der Vermittlung TRAIL-induzierter Apoptose.

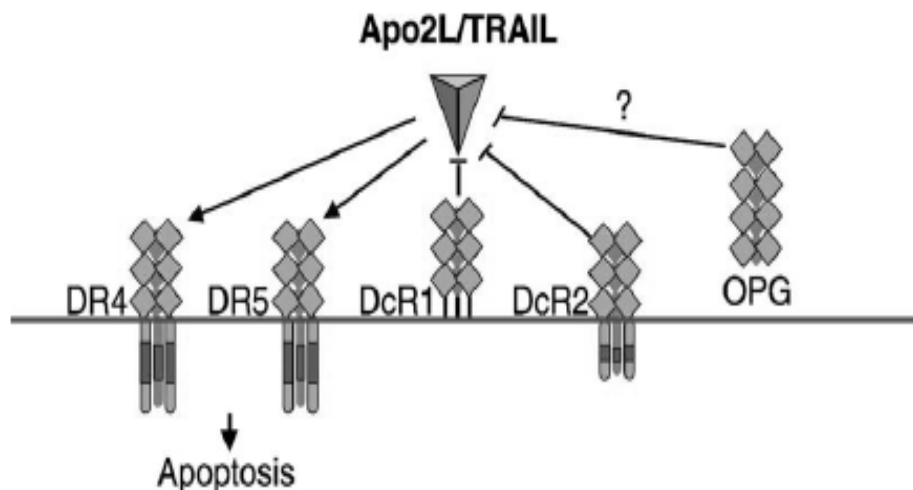


Abb. 2: TRAIL und die TRAIL-Rezeptoren (aus Almasan & Ashkenazi, 2003)

TRAILR1 (DR4) und TRAILR2 (DR5) besitzen eine zytoplasmatische Todesdomäne, über die Apoptose induziert werden kann. TRAILR3 (DcR1) besitzt keine zytoplasmatische Domäne und kann wie TRAILR4 (DcR2), der nur eine funktionsunfähige Todesdomäne enthält, keine Apoptose induzieren. Osteoprotegerin (OPG) ist ein löslicher Rezeptor für TRAIL.

1.3.2 TRAIL-, „Decoy“-Rezeptoren

Neben den beiden Todesrezeptoren TRAILR1 und TRAILR2 bindet TRAIL an drei weitere Rezeptoren, die aufgrund ihrer fehlenden oder nicht funktionsfähigen Todesdomäne und ihrer in Transfektionsexperimenten gezeigten antagonistischen Wirkung gegenüber TRAILR1- und TRAILR2-vermittelter Apoptose, als „Decoy“-Rezeptoren bezeichnet werden.

TRAIL-Rezeptor 3 (TRAILR3, DcR1) besitzt keine zytoplasmatische Domäne und ist durch einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker mit der Zellmembran verbunden (MacFarlane et al., 1997). TRAILR3 wird in nur wenigen Geweben exprimiert und kommt hauptsächlich auf peripheren Lymphozyten vor (Mongkolsapaya et al., 1998). In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Überexpression von TRAILR3 Zellen vor TRAIL-induzierter Apoptose über TRAILR1 und TRAILR2 schützt, wogegen die Entfernung von TRAILR3 von der Zelloberfläche zu verstärkter TRAIL-induzierter Toxizität führte (Sheridan et al. 1997; Pan et al, 1997b).

TRAIL-Rezeptor 4 (TRAILR4, DcR2) (Marsters et al., 1997) wird in vielen Geweben exprimiert und besitzt eine nur unvollständige zytoplasmatische Todesdomäne, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch TRAILR4 keine apoptotische Signaltransduktion induzieren kann und ebenfalls eine „Decoy“-Funktion erfüllt. Aufgrund der Größe der zytoplasmatischen Domäne von TRAILR4 ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass seine Funktion als „Decoy“-Rezeptor nicht nur auf der inkompletten Todesdomäne beruht, sondern auch auf Mechanismen, wie z. B. TRAILR4- vermittelter NFκB-Aktivierung (Degli-Esposti et al, 1997).

Die physiologische Funktion, sowie der Wirkmechanismus über den apoptotische Signaltransduktion durch TRAILR3 und TRAILR4 inhibiert wird, sind noch nicht verstanden. Die klassische „Decoy“-Theorie geht davon aus, dass TRAIL kompetitiv durch TRAILR3 und TRAILR4 depletiert wird und somit keine ausreichende Stimulation von TRAILR1 und TRAILR2 gegeben ist, um Apoptose zu induzieren. Zweitens gibt es wie schon erwähnt Hinweise, dass NFκB TRAILR4-vermittelt aktiviert werden kann und so durch die Induktion anti-apoptotischer Gene (s. 1.3.4.2) TRAILR1/2-vermittelte Apoptose inhibiert wird. Die Aktivierung von NFκB durch TRAILR4 konnte allerdings nicht bestätigt werden. Weiterhin könnte die wahrscheinliche Existenz einer PLAD in den „Decoy“- und TRAIL-Todesrezeptoren,

die Bildung gemischter Liganden-unabhängiger Prä-Aggregate zwischen Todes- und „Decoy“-Rezeptoren vermitteln, die dann z. B. zur Bildung eines unvollständigen DISC führt, der nicht ausreichend für die Apoptoseinduktion ist. (Kimberley & Screaton, 2004).

Während TRAILR1 bis TRAILR4 sehr ähnliche extrazelluläre Domänen besitzen, ist der fünfte TRAIL-Rezeptor, Osteoprotegerin (OPG), nur entfernt mit diesen verwandt. OPG ist ein löslicher Rezeptor der TNFR-Familie, und wurde zunächst als Rezeptor für RANK-L („Receptor Activator of NF κ B Ligand“) und Inhibitor der RANK-L-vermittelten Differenzierung von Osteoklasten und Knochenresorption entdeckt, bis die Bindung an TRAIL gezeigt werden konnte (Emery et al, 1998). Es zeigte sich allerdings, dass die Affinität von OPG für TRAIL bei physiologischer Körpertemperatur schwach ist (Truneh et al., 2000). In einigen Modellsystemen konnte nachgewiesen werden, dass OPG TRAIL-induzierte Apoptose behindert (Holen et al., 2002; Shipman & Croucher, 2003).

1.3.3 TRAIL-induzierte Apoptose

Die Mechanismen der Apoptoseinduktion durch TRAIL entsprechen denen der FasL-induzierten Apoptose. Wie oben beschrieben konnte auch für TRAILR1 die Bildung nicht-signalisierender, prä-formierter Rezeptorkomplexe gezeigt werden, welche durch Interaktion der Rezeptor-Monomere über eine PLAD vermittelt wird (Chan et al., 2000). Aufgrund der Strukturähnlichkeit mit TRAILR1 ist die Existenz der PLAD und die Bildung prä-formierter inaktiver Rezeptorkomplexe auch für TRAILR2, TRAILR3 und TRAILR4 wahrscheinlich (Wajant, 2004). Analog zu Fas bewirkt eine Interaktion von TRAIL mit den prä-formierten TRAILR1- und TRAILR2-Rezeptorkomplexen daraufhin deren strukturelle Reorganisation und erlaubt so die Induktion des intrazellulären apoptotischen Signalwegs.

In Zellen, die für TRAIL-induzierte Apoptose sensibel sind, führt dies zur Rekrutierung zytoplasmatischer Proteine an TRAILR1 und TRAILR2, die den DISC bilden. Eingeleitet wird die DISC-Bildung analog zu Fas durch die Rekrutierung mehrerer FADD-Proteine über homophile DD-DD-Interaktion (Kischkel et al., 2000). Rezeptorgebundenes FADD führt dann, durch homophile DED-DED Interaktion vermittelt, zur Anlagerung von Pro-Caspase-8 und/oder Pro-Caspase-10 an die

Rezeptor-gebundenen FADD Proteine. Dort erfolgt die DISC-induzierte autoproteolytische Aktivierung der Pro-Formen zu aktivierter Caspase-8/10 durch „induced proximity“ (Schneider & Tschopp, 2000; Salvesen & Dixit, 1999). Das Auslösen von Apoptose durch TRAIL kann unabhängig über TRAILR1 oder TRAILR2 vermittelt werden. In Zellen, die gleichzeitig TRAILR1 und TRAILR2 exprimieren, kann es zur Bildung von Rezeptor-Heterokomplexen kommen (Kischkel et al., 2000).

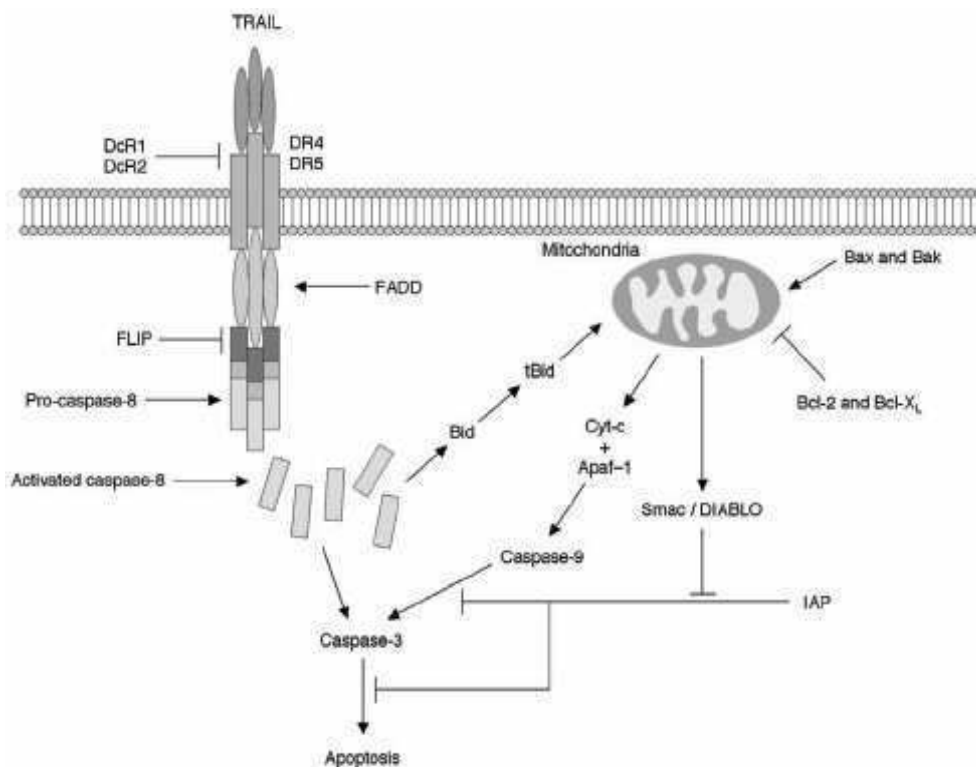


Abb. 3: TRAIL-induzierte Apoptose (aus Yagita et al., 2004)

Ebenfalls analog zur Fas-vermittelten Apoptose erfolgt die Weiterleitung des apoptotischen Signals je nach Zelltyp auf unterschiedliche Art und Weise (s. 1.2.2.1). Demnach ist die TRAILR1/2-vermittelte Caspase-8 Aktivierung in Typ I Zellen ausreichend für die direkte Aktivierung der Effektor-Caspase-3 (Schneider & Tschopp, 2000). Typ II Zellen, die nur über eine limitierte TRAILR1/2-vermittelte Caspase-8-Aktivierung verfügen, sind auf eine Verstärkung des extrinsischen apoptotischen Signals angewiesen. Diese wird durch die Caspase-8-vermittelte Spaltung des Bcl2-Proteins Bid zu tBid („truncated Bid“) initiiert (Li et al., 1998). tBid bewirkt die

Oligomerisierung von Bax und Bak in der äußeren Mitochondrienmembran und vermittelt die Freisetzung von Cytochrom c (Korsmeyer et al., 2000), was letztendlich zur Bildung des Apoptosoms und Aktivierung von Caspase-3 führt. Die Verstärkung des TRAIL-induzierten apoptotischen Signals erfolgt dann durch Prozessierung und Aktivierung von Caspase-8 und Caspase-9 durch Caspase-3 im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus (Tang et al., 2000). Die Überexpression von Bcl2, das die Bax/Bak-vermittelte Apoptose inhibiert, kann zur Unterscheidung von Typ I und Typ II Zellen genutzt werden, da eine Resistenz gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose nur in Typ II Zellen, nicht aber in Typ I Zellen durch dieses Verfahren bewirkt werden kann (Scaffidi et al., 1998).

1.3.4 TRAIL und NFκB

1.3.4.1 NFκB

Die phylogenetisch konservierten homo- und heterodimeren Transkriptionsfaktoren der NFκB Familie werden durch extrazelluläre Stimuli und physikalischen Stress aktiviert und regulieren viele mit Inflammation, Differenzierung und Apoptose-Steuerung assoziierte Gene. Die Homo- und Heterodimere der NFκB-Familie setzen sich aus cRel, RelA-, RelB-, NFκB1 (p50)- und NFκB2 (p52)-Proteinen zusammen. Gemeinsames Strukturmerkmal der Mitglieder der NFκB-Familie ist die als „Rel Homology Domain“ (RHD) bezeichnete Domäne. Neben Ihrer Funktion als DNA-Bindungs- und Dimerisierungs-Domäne besitzt sie eine Kern-Lokalisierungs-Sequenz und vermittelt die Assoziation mit einer Gruppe inhibitorischer, IκB genannter Proteine (Ghosh et al., 1998). Die humanen IκB-Proteine umfassen IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε, Bcl3 sowie die NFκB1/2 Vorläuferproteine p100 und p105. IκB-Proteine üben ihre NFκB-inhibierende Funktion durch die Maskierung der Kern-Lokalisierungs-Sequenz aus, wodurch sie diese Transkriptionsfaktoren aus dem Kern heraus halten und so die NFκB-Proteine an der Transkriptionsinitiation hindern (Rothwarf & Karin, 1999). Zur Aktivierung der NFκB-Proteine müssen die inhibierenden IκBs abgebaut werden. Dies wird durch einen Phosphorylierungsschritt eingeleitet, der von einem Multiproteinkomplex vermittelt wird, welcher aus den Kinasen IKKα und IKKβ (Mercurio et al., 1997), einer regulatorischen Untereinheit NEMO/IKKγ (Yamaoka et al., 1998) und den Chaperonen Hsp90 und Cdc37 (Chen et al., 2002) besteht. Die Phosphorylierung durch diesen IκB-

Kinase-Komplex (IKK) induziert die Ubiquitinierung und schließlich die Degradation der I κ Bs durch das Proteasom (Scherer et al., 1995). Nach der Degradation der I κ B-Proteine können die NF κ B-Proteine in den Nukleus translozieren und dort durch Bindung an spezifische „ κ B-sites“ die Transkription ihrer Zielgene, z. B. IL8, einleiten.

1.3.4.2 Regulation der TRAIL-induzierten Apoptose durch NF κ B

Für viele durch NF κ B aktivierte Zielgene und durch diese kodierte Proteine konnte eine anti-apoptotische Funktion nachgewiesen werden. Dazu gehören unter anderem die oben beschriebenen Proteine der Bcl2-Familie (Lee et al., 1999) und FLIP (Kreuz et al., 2001). Auf der anderen Seite werden wichtige Komponenten des NF κ B-Signaltransduktionsweges, wie z. B. I κ B α (Barkett et al., 1997) durch aktivierte Caspasen gespalten, so dass der pro-apoptotische und der NF κ B-aktivierende Signalweg einer wechselseitigen Inhibition unterliegen. Von zentraler Bedeutung für die Regulation der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose ist hierbei die Induktion von FLIP durch NF κ B, da beide Spliceformen, sowohl FLIP_L als auch FLIP_S, in den DISC von TRAILR1, TRAILR2 und Fas rekrutiert werden und die Aktivierung von Caspase-8 inhibieren (Krueger et al., 2001). Während auf den meisten Zellen mindestens ein TRAIL-Todesrezeptor gefunden werden kann, werden die „Decoy“-Rezeptoren TRAILR3 und TRAILR4 nur selten konstitutiv exprimiert. Unter bestimmten Bedingungen kann deren Expression aber induziert werden. So konnte ein Einfluss von NF κ B auf die Expression der TRAIL-Rezeptoren TRAILR2 (Ravi et al., 2001) und TRAILR3 (Bernard et al., 2001) gezeigt werden. Weiterhin konnte auch ein Einfluss von NF κ B auf die TRAIL-Expression nachgewiesen werden (Siegmond et al., 2001).

1.3.4.3 TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung

Neben der dominanten pro-apoptotischen Signaltransduktion konnte mittlerweile auch eine TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung nachgewiesen werden (Chaudhary et al., 1997; Schneider et al., 1997). Für den Prototypen der Todesrezeptoren, Fas, konnte gezeigt werden, dass die Fas-vermittelte Aktivierung von NF κ B durch FADD, Caspase-8 und RIP vermittelt und durch FLIP inhibiert wird (Kreuz et al., 2004). Während eine zentrale Rolle von FADD für die TRAIL-induzierte Apoptose nachgewiesen werden konnte (Kuang et al., 2000), ist über die Rolle von FADD in der TRAILR1- und

TRAILR2-vermittelten NF κ B-Aktivierung weniger bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass Überexpression von FADD zu einer NF κ B-Aktivierung führt und die TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung in FADD-defizienten Zellen reduziert ist (Wajant et al., 2000). Weiterhin konnte die FADD-vermittelte Rekrutierung von RIP („Receptor Interacting Protein“) in den TRAILR1-Signalkomplex nachgewiesen werden (Lin et al., 2000). Nachdem ursprünglich gezeigt werden konnte, dass RIP als Teil des TNFR1-Signalkomplexes die Kinasen des IKK-Komplexes aktiviert (Devin et al., 2000), wurde durch Versuche mit RIP-defizienten Zellen auch eine entscheidende Funktion für die TRAIL-Signaltransduktion deutlich (Lin et al., 2000). RIP gehört außerdem zu den Caspase-8 Substraten (Lin et al., 1999), so dass Spaltung von RIP durch TRAILR1/2-aktivierte Caspase-8 zu einer Inhibition der NF κ B-Signaltransduktion führen könnte. Übereinstimmend damit führt die Inhibition der Apoptose durch Caspase-Inhibitoren zu einer verstärkten TRAIL-induzierten NF κ B-Aktivierung (Wajant et al., 2000). Einen möglichen Mechanismus für die TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung stellt somit die FADD-vermittelte Rekrutierung von RIP in den TRAILR1/2 Signalkomplex dar.

Daneben gibt es Hinweise auf einen weiteren Caspase-abhängigen Signaltransduktionsweg (Secchiero et al., 2003). Als Komponenten des NF κ B-induzierenden Signalkomplexes kommen FADD, Caspase-8 und FLIP in Frage, da diese alle an der Regulation der Caspasenaktivität durch die TRAIL-Rezeptoren beteiligt sind und nach Überexpression eine NF κ B-Aktivierung bewirken (Hu et al., 2000). Insbesondere die Rolle von FLIP wirft hier Fragen auf. Auf der einen Seite führte die Überexpression von FLIP_L zu einer verstärkten basalen NF κ B-Aktivierung. Auf der anderen Seite konnte neben der Apoptose-inhibierenden Wirkung auch eine inhibierende Funktion von FLIP für Todesrezeptor-vermittelte NF κ B-Aktivierung gezeigt werden (Wajant et al., 2000). Die widersprüchliche Bedeutung von FLIP für die Todesrezeptor-vermittelte NF κ B-Aktivierung bedarf daher weiterer Untersuchung.

1.3.5 TRAIL und IFN γ

Interferone sind Mitglieder einer Zytokinfamilie, die eine zentrale Rolle bei der Abwehr viraler Infektionen spielen und immunmodulatorische Kompetenz besitzen. Außerdem können sie Apoptose induzieren und besitzen anti-angiogene und anti-proliferative Eigenschaften. Man unterscheidet Typ I Interferone (IFN α , β , ω , κ), die in den meisten

Zellen durch Viren und doppelsträngige RNA induziert werden, und Typ II Interferon ($\text{IFN}\gamma$) (Stark et al., 1998). $\text{IFN}\gamma$ wird wie TRAIL von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert (Chawla-Sarkar et al., 2003) und besitzt neben seiner antiviralen Aktivität zusätzlich pro-apoptotische und immunsupprimierende Funktion (Murphy et al., 1988). $\text{IFN}\gamma$ allein kann in einigen Zellen ausreichend für die Induktion von Apoptose sein oder Zellen für Todesrezeptor-vermittelte Apoptose sensibilisieren, ohne selbst apoptotische Wirkung zu entfalten (Chawla-Sarkar et al., 2003). So konnte die apoptotische Wirkung von TRAIL auf Ewing-Sarkom-Zellen durch $\text{IFN}\gamma$ gesteigert werden (Merchant et al., 2004). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl die Expression von TRAIL als auch die Expression der TRAIL-Rezeptoren durch Interferone moduliert werden kann. So induzieren Typ I und Typ II Interferone die TRAIL-Expression auf natürlichen Killerzellen, Monozyten, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten und modulieren deren zytotoxische Wirkung auf TRAIL-sensitive Tumorzellen in vitro (Yagita et al., 2004). Ob das Zusammenspiel von TRAIL und $\text{IFN}\gamma$ neben der synergistischen Wirkung auf die apoptotische Signaltransduktion auch Einfluss auf die nicht-apoptotische Signaltransduktion und insbesondere die Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ hat, ist bisher noch nicht klar geworden.

1.4 Zielsetzung

TRAIL wurde bislang hauptsächlich hinsichtlich seiner dominanten apoptotischen Wirkung erforscht. Die TRAIL-induzierten nicht-apoptotischen Signalwege stellen dagegen ein weniger erforschtes Gebiet dar. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die TRAIL-induzierte nicht-apoptotische Signaltransduktion näher untersucht werden. Dabei konzentrieren sich die Untersuchungen auf die TRAIL-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{B}$ und deren Modulation durch FLIP und $\text{IFN}\gamma$.

2 Material

2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien, Materialien

ABTS	Boehringer, Mannheim
Acrylamidlösung (30 %)	Roth, Karlsruhe
α TRAILR1-Serum	AG Wajant
α TRAILR2-Serum	AG Wajant
APS	Sigma, Deisenhofen
Bio-Rad-Lösung	Bio-Rad, München
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Roth, Karlsruhe
ECL	Amersham, Braunschweig
FasL-Flag	AG Wajant
FCS	PAA Lab. GmbH, Linz, Österreich
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Nonidet-P40	Sigma, Deisenhofen
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail I/II	Sigma, Deisenhofen
Protein A	Sigma, Deisenhofen
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
PVDF-Membran	Amersham, Braunschweig
RPMI	Seromed, Berlin
siRNAs	Ribopharma AG, Kulmbach
TEMED	Sigma, Deisenhofen
TNF	Knoll AG, Ludwigshafen
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA. Lab. GmbH, Linz, Österreich
zVAD-fmk	Bachem, Heidelberg

2.2 Puffer und Lösungen

Blot-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3
Coating-Puffer	100 mM Carbonat, pH 9,5
Kristallviolettlösung	0,5 % Kristallviolett, 20 % Methanol
Lauf-Puffer (SDS-PAGE)	0,05 M Tris, 0,38 M Glycin, 0,004 M SDS, pH 8,3
Lyse-Puffer	20 mM NaCl, 20 mM Tris, 1 % Nonidet P40, pH 7,4
Hypotoner Puffer (Kernextrakte)	20 mM Hepes, 5 mM NaF, 10 µM Na ₂ MoO ₄ , 0,1 mM EDTA, pH 7,5
PBA	1 x PBS, 0,025 % BSA
PBS (10 x)	80 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,7 % NaCl, pH 7,2
PBS-F	1 x PBS + 10 % FCS (v/v)
PBS-T	1 x PBS, 0,05 % (v/v) Tween-20
Probenpuffer (SDS-PAGE, 5-fach)	0,05 M Tris-HCl, 5 mM EDTA, 100 mM DTT, 5 % SDS, 50 % Glycerin, 0,5 % Bromphenolblau, pH 8,0
Puffer A	10 mM KCl, 10mM HEPES, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, pH 7,9
Sammelgelpuffer (SDS-Page)	0,5 M Tris, 0,015 M SDS, pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, 0,015 M SDS, pH 8,8
Trypsin-PBS	1 x Trypsin/EDTA-Lösung in 1 x PBS

2.3 Antikörper

anti-Flag (M2), Maus, monoklonal	Sigma, Deisenhofen
anti-human-Vinculin, Maus, monoklonal	Sigma, Deisenhofen
anti-I κ B α , Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
anti-Kaninchen-HRP	Dako, Glostrup, Dänemark
anti-Maus-HRP	Dako, Glostrup, Dänemark
anti-TRAILR1, Maus, monoklonal, FITC	Apotech, Epalinges, Schweiz
anti-TRAILR2, Maus, monoklonal, FITC	Apotech, Epalinges, Schweiz
anti-TRAILR3, Maus, monoklonal, PE	R&D Systems, Minneapolis, USA
anti-TRAILR4, Maus, monoklonal, PE	R&D Systems, Minneapolis, USA
IgG1, Maus, FITC	R&D Systems, Minneapolis, USA
IgG1, Maus, PE	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.4 Zelllinien

KB	Keratinocyten, Dr. Michael Kracht, Medizinische Hochschule Hannover
KB-FLIP _S	AG Wajant
KB-FLIP _L	AG Wajant
KB-Bcl2-GFP	AG Wajant

3 Methoden

3.1 Kultivierung und Konservierung der KB-Zellen

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien erfolgte in RPMI 1640 Medium mit hitze-inaktiviertem FCS (Endkonzentration 10 %). Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37 °C und konstanter CO₂-Begasung (5 %, Luftfeuchtigkeit 96 %). Um die adhärent wachsenden KB-Zellen zu verdünnen, wurden diese mit einem geeigneten Volumen Trypsin-PBS versetzt und im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Kulturflaschen ablösten. Danach wurde die Suspension in einen 15 mL Falcon gegeben und für fünf Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen in einem geeigneten Volumen frischer Nährlösung resuspendiert um dann in der gewünschten Verdünnung in die Kulturflaschen ausgesät zu werden.

Zur Langzeitlagerung der Zellen mittels Kryokonservierung wurden die Zellen wie beschrieben geerntet, in hitzeinaktiviertem FCS mit DMSO (Endkonzentration 10 %) resuspendiert und in 1,5 mL Polypropylenröhrchen überführt. Um ein schonendes Einfrieren der Zellen zu ermöglichen, wurde die Kryokonservierung zunächst für 24 h in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter bei -80 °C begonnen, bevor die Zellen dann endgültig bei -80 °C gelagert wurden.

3.2 Ermittlung von Zellzahlen

Zur Ermittlung der Anzahl von Zellen wurden diese in einer Neubauer-Kammer gezählt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einer Trypanblau-Lösung (Stammlösung 1:5 in PBS) 1:1 verdünnt. Das Trypanblau wird von toten Zellen aufgenommen und ermöglicht somit eine Unterscheidung von lebenden Zellen. 20 µL der Zellverdünnung wurden anschließend unter das Deckgläschen einer Neubauer-Zählkammer pipettiert und die lebenden Zellen in 2 Quadranten gezählt. Die Zellzahl wurde gemäß der Formel Mittelwert gezählter Zellen/Quadrant x Verdünnungsfaktor x 10⁴ = Zellzahl/mL berechnet.

3.3 Zytotoxizitätsanalyse und IL8-ELISA

3.3.1 Zellaussaat und Stimulation

Die Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von α TRAILR1-Serum, α TRAILR2-Serum, FasL und TNF auf die adhären wachsenden KB-Zellen wurde mittels Quantifizierung der Lebendzellzahl durch Kristallviolett färbung bestimmt. Die IL8-Produktion wurde mit Hilfe eines IL8-ELISAs quantifiziert.

Es wurden zunächst 2×10^4 KB-Zellen je well in 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät und kultiviert. 24 h später konnten die Zellen mit dem gewünschten Reagenz (200 μ L/well) in konstanten Konzentrationen oder sequentiellen Verdünnungen stimuliert werden. Zuvor wurde jedoch das Nährmedium ausgetauscht, um den störenden Einfluss von konstitutiv exprimiertem IL8 auf die IL8-Detektion im ELISA zu vermeiden. Die stimulierten Zellen wurden dann im Brutschrank inkubiert. Nach 6 h wurden 100 μ L des Überstandes aus jedem well entnommen und zur Analyse mittels IL8-ELISA bei -80 °C eingefroren. Die Platten wurden für die Zytotoxizitätsanalyse dann weitere 10-14 h inkubiert.

3.3.2 Zytotoxizitätsanalyse

Nach Ablauf der Inkubationszeit und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen für 15 Minuten mit einer Kristallviolettlösung (100 μ L/well) bei Raumtemperatur beschichtet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die überschüssige Lösung durch mehrmaliges Waschen in H_2O entfernt. Die Mikrotiterplatten wurden nun ausgeschlagen, getrocknet und das gebundene Kristallviolett durch Zugabe von Methanol (100-150 μ L/well) gelöst. Danach wurden die Mikrotiterplatten für ca. 1 h auf einen Schüttler gestellt und anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 590 nm mittels ELISA-Reader (Anthos Lucy 2) gemessen.

3.3.3 IL8-Bestimmung mittels IL8-ELISA

Alle für die IL8-Bestimmung verwendeten Antikörper sowie Streptavidin-HRP und rekombinantes IL8 stammen aus dem OptEIATM IL8-ELISA-Kit der Firma Pharmingen (San Diego, USA). Für die IL8 Detektion in den Zellkulturüberständen aus 3.3.1 wurde zunächst die benötigte Anzahl einer 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatte mit 50 μ L/well einer IL8-Antikörperlösung (anti-IL8 1:250 in Coating Puffer) versehen und

über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Platten drei Mal mit 200 µL/well PBS-T gewaschen. Daraufhin wurden 200 µL/well PBS-F auf die Platten gegeben und diese bei Raumtemperatur 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T wurden die Platten nun mit den zu analysierenden Zellkulturüberständen aus 3.3.1 befüllt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden nach Entfernen der Zellkulturüberstände erneut gewaschen (fünf Mal in PBS-T) und mit 50 µL/well einer Lösung aus biotinyliertem IL8-Antikörper und Streptavidin-HRP (jeweils 1:250 in PBS-F) versehen. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten sieben Mal mit PBS-T gewaschen und danach mit 100 µL/well ABTS-Lösung (1 mg/mL ABTS in ABTS-Puffer) versehen. Nach fünf bis zehn Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur konnte die Absorption im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden. Zur Quantifizierung der IL8-Konzentration, wurde auf jeder Platte eine Konzentrationsreihe mit definierten Konzentrationen von rekombinantem IL8 als Referenz angelegt.

3.4 Nachweis von Zelloberflächenrezeptoren mittels Durchflusszytometrie

Fluoreszierende Zellen können mit der Durchflusszytometrie untersucht werden. Die Fluoreszenz kann hierbei entweder von einer vorher durchgeführten Färbung herrühren oder durch die Expression eines Fluoreszenzproteins, das durch Transfektion/Infektion eingeführt wurde, verursacht sein. Die Färbungen können sowohl intrazelluläre, als auch extrazelluläre Strukturen betreffen. Im letzteren Fall kann die Expression von Zelloberflächen-Molekülen durch die Verwendung spezifischer, Fluoreszenzfarbstoff-konjugierter Antikörper auf Einzelzell-Niveau untersucht werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch einen Laserstrahl im „Fluorescence Activated Cell Scan“ (FACScan) angeregt und emittieren anschließend Licht charakteristischer Wellenlänge, welches detektiert wird. Zusätzlich zu den Fluoreszenzen gibt das an den Zellen gestreute Laserlicht Aufschluss über die Parameter Größe („forward scatter“) und Granularität („side scatter“) der Zellen.

Zur Untersuchung der TRAIL-Rezeptorexpression wurden je Probe ca. 10^6 KB-Zellen geerntet, bei 2000 U/min fünf Minuten zentrifugiert und darauf in 200 µL PBS resuspendiert. Zur Antikörpermarkierung wurde die Zellsuspension in ein well einer 96-well-Spitzbodenplatte gegeben und nach Herstellerangaben mit dem jeweiligen TRAIL-

Rezeptor-Antikörper oder der IgG1 Isotyp Kontrolle gefärbt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen wiederum mit 200 μL PBS gewaschen, anschließend in 400 μL PBS resuspendiert und am FACSCaliburTM (BD, San Jose, USA) analysiert. Ausgewertet wurden die FACS-Daten mit der Cell Quest Software für Apple-Macintosh.

3.5 Transienter Transfer von siRNA

Die Transfektion von siRNA in KB-Zellen wurde durch das Elektroporationsverfahren erreicht. Dafür wurden 6×10^6 Zellen in 1 mL Nährmedium resuspendiert und mit der gewünschten siRNA versetzt. Die Endkonzentration wurde auf 300 nM eingestellt. Für die folgende Elektroporation, die mit 250 V/1800 F erfolgte, wurden 800 μL in eine 4 mm Elektroporationsküvette (PeqLab, Erlangen) überführt. Die elektroporierten Zellen wurden dann in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät und am nächsten Tag für die geplanten Versuche verwendet.

3.6 Westernblotanalysen

3.6.1 Herstellung der Zellysate

Die KB-Zellen wurden in Petrischalen (\varnothing 6 cm) ausgesät und konnten nach Erreichen subkonfluenten Zelldichten mit den gewünschten Reagenzien stimuliert und nach Ablauf der Inkubationszeit geerntet werden. Nach der Ernte wurden die zu analysierenden, sedimentierten KB-Zellen in Puffer A + 0,6 % Nonidet-P40 (120 μL Puffer für 10^6 KB-Zellen) resuspendiert. Der genannte Lysepuffer wurde vorher mit einer Lösung verschiedener Proteaseinhibitoren (Complete Mini, Roche) versetzt. Danach wurden die Zellsuspensionen für 20 Minuten auf Eis inkubiert und daraufhin 10 Minuten zentrifugiert (13000 U/min, 4 °C), um lösliche und unlösliche Bestandteile der Ansätze zu trennen. Die Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße überführt und bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode. Zu diesem Zweck wurde jeweils 1 μL der zu analysierenden Überstände in 1 mL Bradford-Lösung (1:5 in H_2O verdünnt) gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur in

Plastikküvetten inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption bei 595 nm im Photometer gemessen. Die zur Analyse verwendeten Volumina der Ansätze wurden dann anhand der gemessenen Absorption so gewählt, dass die zu vergleichenden Proben die gleiche Proteinmenge enthielten.

3.6.3 SDS-PAGE

Das Auftrennen der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in SDS-Polyacrylamid-Gelen, die aus einer Sammelgel- und einer Trenngelphase bestanden. Zur Herstellung eines Trenngels wurden 2,75 mL Trenngelpuffer, 3,9 mL H₂O, 187 µL APS-Lösung (10 % in H₂O) und verschiedene Konzentrationen von Acrylamid (10 %, 12 %, 13,5 %) verwendet. Die Polymerisierungsreaktion wurde durch Zugabe von TEMED initiiert. Die Lösung wurde nun in den Spalt zwischen zwei zusammengeklebten Glasplatten gegeben und anschließend mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach Auspolymerisierung des Trenngels, wurde das Isopropanol entfernt und die Sammelgellösung (1,4 mL Acrylamidlösung, 1,75 mL Sammelgelpuffer, 3,8 mL H₂O, 84 µL der APS-Lösung und 7 µL TEMED) auf das Trenngel gegeben. Vor der Auspolymerisierung wurde das Sammelgel mit einem Kamm versehen. Die Proteinlysate wurden zur gelelektrophoretischen Auftrennung mit fünffach konzentriertem Probenpuffer versehen und für 5 Minuten auf 90 °C erhitzt, bevor sie nach Entfernen des Kamms in die Taschen des Sammelgels pipettiert werden konnten. Die Elektrophorese erfolgte für 90 Minuten bei 90-120 Volt in vertikalen Elektrophoresekammern.

3.6.4 Westernblot

Der Transfer der Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran erfolgte mittels Elektroblobverfahren in horizontalen Blotkammern (PeqLab, Erlangen). Zu diesem Zweck wurden 4 Lagen Whatman-Filterpapier sowie ein Stück PVDF-Membran, welches kurz mit Methanol geblockt wurde, in der Größe des Trenngels zugeschnitten und in Blot-Puffer getränkt. Das Sammelgel wurde vom Trenngel abgetrennt und verworfen. Für den Aufbau der Elektroblobvorrichtung (vom Plus- zum Minuspol) wurden nun 2 Lagen Whatman-Filterpapier, die PVDF-Membran, das Trenngel und erneut 2 Lagen Whatman-Filterpapier möglichst luftblasenfrei

übereinander gelegt. Nach Anschließen der Blotapparatur an eine Spannungsquelle wurden die negativ geladenen Proteine bei einer Stromstärke von 1,5 mA pro cm² Membranfläche in Richtung Pluspol auf die PVDF-Membran übertragen. Die Blotdauer betrug je nach Größe der Proteine 80-100 Minuten.

3.6.5 Immunodetektion

Nach der Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran, wurde diese zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen für 1 h auf einem Schüttler in einer 3 %igen Milchlösung (3 % Milchpulver in PBS-T) bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Membran gewaschen (drei mal fünf Minuten in PBS-T) und anschließend mit dem gewünschten Primär-Antikörper (anti-IκBα oder anti-Vinculin) über Nacht bei 4 °C oder für 2 h bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde der Primärantikörper entfernt und die Membran nach dem Waschen (drei Mal fünf Minuten in PBS-T) mit einem Peroxidase-markierten Sekundär-Antikörper (1:10000 in PBS-T) für 45 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Die PVDF-Membran wurde dann noch drei Mal 15 Minuten in PBS-T gewaschen und darauf für 1 Minute mit Luciferase-Lösung beschichtet. Nun konnten Filme bis zum Erhalt der gewünschten Signalintensität belichtet und entwickelt werden.

3.7 NFκB-ELISA

3.7.1 Herstellung der Zellkernextrakte

KB-Zellen wurden in Petrischalen (Ø 10 cm) ausgesät, über Nacht kultiviert und am nächsten Tag mit den für den Versuch benötigten Reagenzien stimuliert oder ohne Stimulation weiter inkubiert. Nach Beendigung der Stimulation wurden alle Zellen zunächst mit 10 mL eiskaltem PBS, das mit einem Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (PI, Sigma, Deisenhofen) versetzt war, gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 mL eiskaltem PBS + PI mit einem Gummisspatel geerntet und mit 300 x g fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nun wurden die Pellets in 1 mL eiskaltem hypotonem Puffer resuspendiert und in 1,5 mL Polypropylenröhrchen überführt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit auf Eis wurden 50 µL 10 % Nonidet P-40 zugegeben und das Gemisch 30 sek mit der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde daraufhin mit 50 µL

„Complete Lysis Buffer“ resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch 10 Minuten bei 4 °C und 14000 x g zentrifugiert und danach der Überstand bei -80 °C aufbewahrt. Die Proteinbestimmung zum Abgleich der Proteinkonzentration der Proben erfolgte mit dem Bradford-Assay.

3.7.2 Detektion

In die mit einem spezifisch NFκB bindenden Oligonucleotid (5' -GGGACTTTCC- 3') versehenen Mikrotiterplatten wurden zunächst 30 µL/well „Complete Binding Buffer“ und 20 µL/well der Proben gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde darauf versiegelt und bei Raumtemperatur 1 h auf dem Schütter inkubiert. Dann wurde die Mikrotiterplatte drei Mal mit „Washing Buffer“ gewaschen und getrocknet. Als nächstes wurden die benutzten wells mit 100 µL/well NFκB-Antikörper (1:1000 in „Antibody Binding Buffer“) versehen, wiederum 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach drei Mal gewaschen und getrocknet. Nun wurden 100 µL/well HRP-Antikörper (1:1000 in „Antibody Binding Buffer“) in die wells gegeben. Nach 1 h Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Wells vier Mal mit 200 µL/well „Washing Buffer“ gewaschen. Zur Entwicklung wurden 100 µL/well der Entwickler-Lösung zugegeben. Nach 4 Minuten Entwicklungszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µL/well „Stop Solution“ gestoppt. Nun konnte die Absorption mittels Spektrophotometer bei 450 nm bestimmt werden. Alle für die NFκB-Detektion verwendeten Antikörper und Pufferlösungen (außer hypotoner Puffer, PBS) stammen aus dem TransAMTM NFκB Transcription Factor Assay Kit der Firma Activemotif (Carlsbad, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Apoptotische und nicht-apoptotische Fas-Signaltransduktion

Die Todesrezeptoren der TNFR-Familie Fas, TRAILR1 (DR4) und TRAILR2 (DR5) wurden bisher vornehmlich hinsichtlich ihrer dominanten Funktion als Auslöser des apoptotischen Programms untersucht. Mittlerweile konnte aber in einer Reihe von Untersuchungen gezeigt werden, dass sowohl der klassische Todesrezeptor Fas als auch die TRAIL-Todesrezeptoren nicht nur bei der Induktion von Apoptose sondern auch bei der Vermittlung nicht-apoptotischer Signalwege wie Proliferation oder NFκB-Aktivierung eine Rolle spielen können. In Studien zur nicht-apoptotischen Signaltransduktion durch Fas/FasL (Kreuz et al., 2004) konnte gezeigt werden, dass FasL unter bestimmten Bedingungen in KB-Zellen nicht nur apoptotischen Zelltod auslösen kann, sondern auch eine deutlich Hochregulation des bekannten NFκB-Zielgens IL8 induziert. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB ist in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung, da dieser durch Induktion anti-apoptotischer Gene zu einer Inhibition der apoptotischen Signaltransduktion führen kann und außerdem eine zentrale Rolle bei der Steuerung von Entzündungsreaktionen durch Aktivierung pro-inflammatorischer Gene und verschiedener Chemokine, wie z. B. IL8, einnimmt.

4.1.1 IFN γ verstärkt die FasL-induzierte Apoptose in KB-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass für die FasL-induzierte Apoptose in KB-Zellen eine Sensibilisierung durch den Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid (CHX) notwendig ist (Kreuz et al., 2004). Aus der in Abb. 4 gezeigten Zytotoxizitätsanalyse ist ersichtlich, dass wie in der Literatur beschrieben, eine Vorbehandlung der KB-Zellen mit CHX, aber auch mit IFN γ ausreichend ist, um diese für FasL-vermittelte Apoptose zu sensibilisieren. Die verwendete Konzentration von CHX (2,5 μ g/mL) führte dabei nur zu einer partiellen Blockade der Proteinsynthese und sowohl die alleinige Behandlung der Zellen mit CHX, als auch mit IFN γ resultierte in nur gering verstärktem Zelltod. Die Tötung der Zellen erfolgte in beiden Fällen über die Aktivierung von Caspasen, da der Zelltod durch den Caspase-Inhibitor zVAD-fmk inhibiert werden konnte. Die Vorbehandlung der KB-Zellen mit IFN γ hatte keinen Einfluss auf die

zytotoxische Wirkung von TNF. Die FasL- und TNF-induzierte Apoptose müssen also zumindest teilweise unterschiedlich reguliert sein.

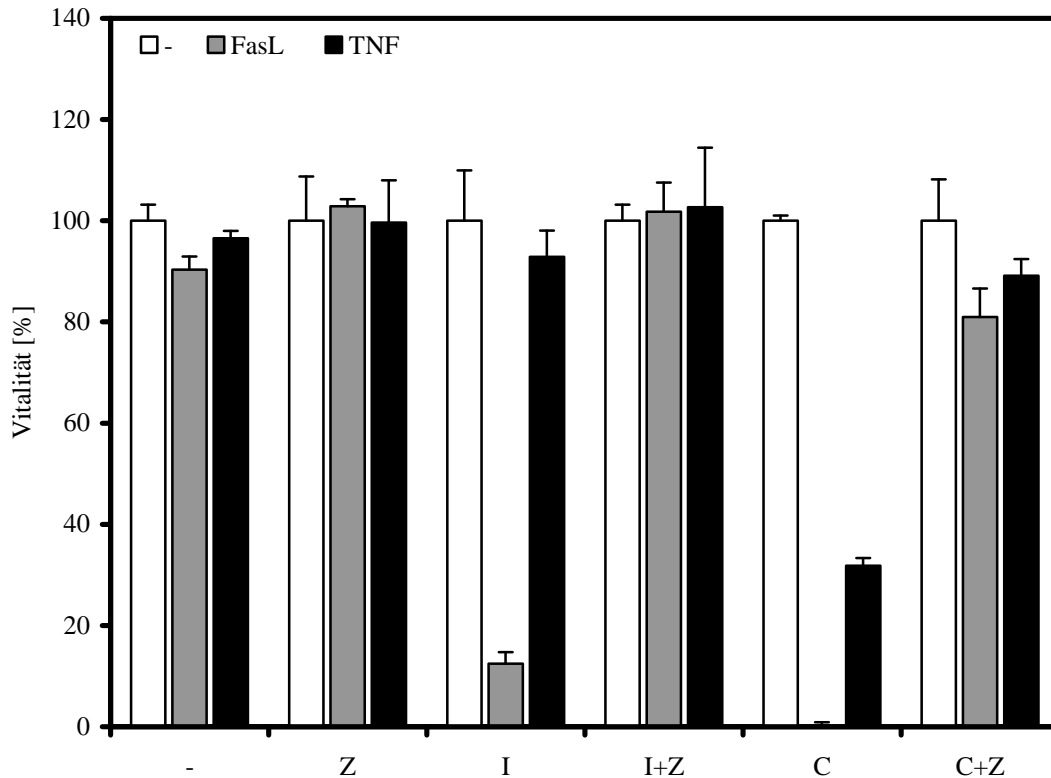


Abb. 4: KB-Zellen werden durch IFN γ und CHX für FasL-induzierte Apoptose sensibilisiert.

2 x 10⁴ KB-Zellen/well wurden in 96-well Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde eine Gruppe für 24 h mit IFN γ (20 ng/mL) inkubiert und anschließend für 16 h mit FasL-Flag (200 ng/mL) + anti-Flag-Ak (M2, 0,5 μ g/mL) oder TNF (10 ng/mL) in Gegenwart von IFN γ stimuliert. Die andere Gruppe wurde 16 h in Gegenwart von CHX mit FasL oder TNF stimuliert. CHX (2,5 μ g/mL) und zVAD-fmk (20 μ M) wurden dabei 1,5 h vor Beginn der Stimulation zugegeben. Die Zytotoxizitätsanalyse erfolgte mittels Kristallviolett-färbung. Abkürzungen: C: CHX, I: IFN γ , Z: zVAD-fmk.

4.1.2 IFN γ verstärkt die FasL-induzierte NF κ B-Aktivierung in KB-Zellen

In 4.1.1 konnte gezeigt werden, dass eine Sensibilisierung der KB-Zellen durch CHX oder IFN γ ausreichend ist, um FasL die Induktion von Apoptose zu ermöglichen. Um die Auswirkung von IFN γ und CHX auf die nicht-apoptotische Fas-Signaltransduktion in KB-Zellen zu untersuchen, wurde die FasL-induzierte IL8-Produktion in An- und Abwesenheit von IFN γ und CHX mittels IL8-ELISA untersucht. Da IL8 NF κ B-abhängig hochreguliert wird (Hoffmann et al., 2002), kann es als Indikator für eine

NFκB-Aktivierung dienen. IFN γ zeigte, neben der oben beschriebenen Funktion als Sensibilisator für FasL-induzierte Apoptose auch eine verstärkende Wirkung auf die IL8-Produktion und somit NFκB-Aktivierung durch FasL in KB-Zellen (Abb. 5). Im Gegensatz dazu war die TNF-induzierte IL8-Produktion nicht durch IFN γ zu beeinflussen. Lediglich unter apoptotischen Bedingungen nach CHX-Behandlung war die TNF-induzierte IL8-Produktion vermindert. Weiterhin fiel auf, dass die FasL-induzierte IL8-Produktion auch unter apoptotischen Bedingungen nach IFN γ -Vorbehandlung verstärkt war. Dies lässt darauf schließen, dass apoptotische und geninduzierende Prozesse gleichzeitig ablaufen können. Wie erwartet führte eine Blockierung der Caspasen und somit des apoptotischen Signalwegs durch zVAD-fmk zu einer Verstärkung der IL8-Produktion. Weiterhin war zu beobachten, dass durch die alleinige Behandlung mit CHX, im Gegensatz zur Behandlung mit IFN γ , bereits eine deutliche IL8-Produktion in den KB-Zellen ausgelöst wurde.

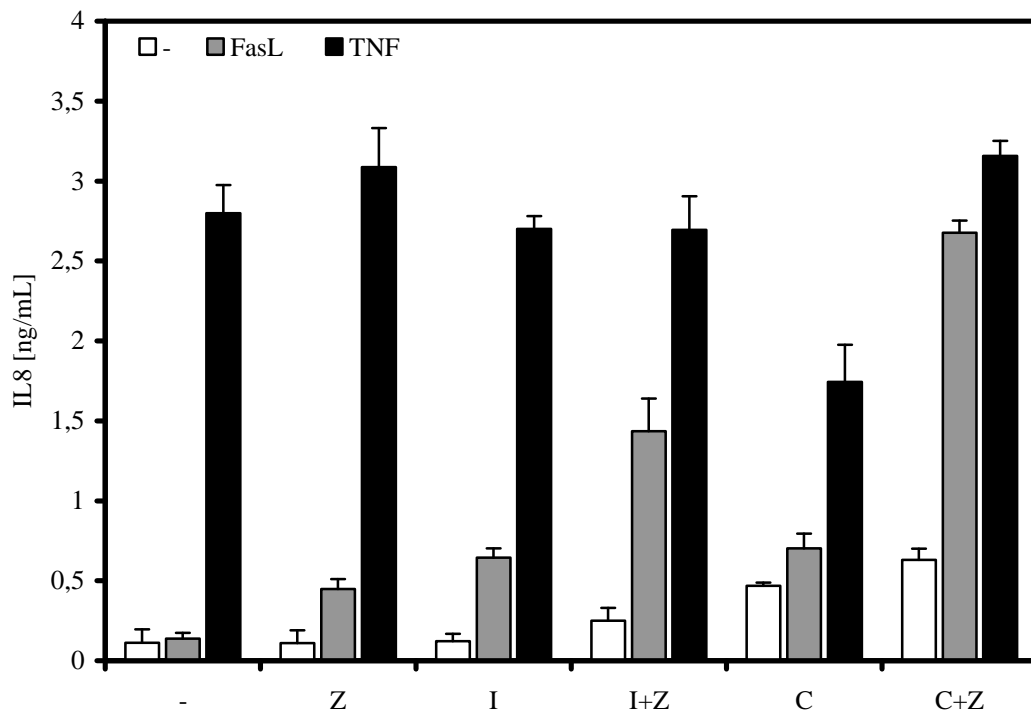


Abb. 5: IFN γ und CHX sensibilisieren KB-Zellen für Fas-vermittelte IL8-Produktion

Es wurden 2×10^4 KB-Zellen/well in 96-well Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Eine Gruppe wurde daraufhin für 24 h mit IFN γ (20 ng/mL) inkubiert und anschließend mit FasL-Flag (200 ng/mL) + M2 (0,5 μ g/mL) oder TNF (10 ng/mL) in Gegenwart von IFN γ stimuliert. Die andere Gruppe wurde in Gegenwart von CHX mit FasL-Flag oder TNF stimuliert. CHX (2,5 μ g/mL) und zVAD-fmk (20 μ M) wurden 1,5 h vor Beginn der Stimulation zugegeben. 6 h nach Zugabe von quervernetztem FasL-Flag bzw. TNF wurden 100 μ L der Kulturüberstände zur Analyse entnommen und mit Hilfe eines IL8-ELISA Kits untersucht. Abkürzungen: C: CHX, I: IFN γ , Z: zVAD-fmk.

4.2 Untersuchung der FasL-induzierten Signaltransduktion in Bcl2-exprimierenden Zellen

Als zentrales Ereignis bei der malignen Transformation von Zellen und der Entstehung von Tumoren gilt die Inhibierung des apoptotischen Programms (Hanahan & Weinberg, 2000). Übereinstimmend mit Untersuchungen, die eine wechselseitige negative Regulation des apoptotischen und NF κ B-aktivierenden Signalweges zeigen, konnte in den unter 4.1.2 beschriebenen Versuchen eine Verstärkung der NF κ B-Aktivierung nach Blockierung des apoptotischen Signalwegs durch den pharmakologischen Caspase-Inhibitor zVAD-fmk beobachtet werden. Eine andere, physiologische Möglichkeit zur Blockierung des apoptotischen Programms stellt die Expression des anti-apoptotisch wirkenden Bcl2-Proteins dar. Wie in 1.2.2.1 beschrieben kann die Auslösung des apoptotischen Programms durch Todesrezeptoren zelltypspezifisch über zwei verschiedene Signalwege erfolgen. In Typ I Zellen ist eine direkte Aktivierung von Effektor-Caspasen möglich und ausreichend, um Apoptose auszulösen. Typ II Zellen hingegen benötigen eine Verstärkung des apoptotischen Signals über den intrinsischen Weg der Apoptoseinduktion, um genügend Effektor-Caspasen zur Ausführung der Apoptose zu aktivieren. Da Bcl2 den intrinsischen Signalweg inhibiert, eignet sich die Überexpression von Bcl2 zur Unterscheidung zwischen Typ I und Typ II Zellen. In den folgenden Versuchen wurde nun die Bedeutung der Bcl2-Expression für Apoptose und NF κ B-Aktivierung in KB-Zellen untersucht.

4.2.1 Bcl2-Expression inhibiert die FasL-induzierte Apoptose

Die Expression von Bcl2-GFP in KB-Zellen bewirkt einen effektiven Schutz vor FasL-vermittelter Apoptose (Abb. 6). Dies gilt sowohl in CHX- als auch in IFN γ -sensibilisierten Zellen. Nach der in 1.2.2.1 beschriebenen Vorstellung gehören KB-Zellen somit zur Gruppe der Typ II Zellen, die eine Verstärkung des initialen apoptotischen Signals über den intrinsischen Weg benötigen, um die apoptotischen Effektorfunktionen robust zu stimulieren. Diese Zellen sind somit in besonderer Weise zur Untersuchung der nicht-apoptotischen Fas-Signaltransduktion geeignet.

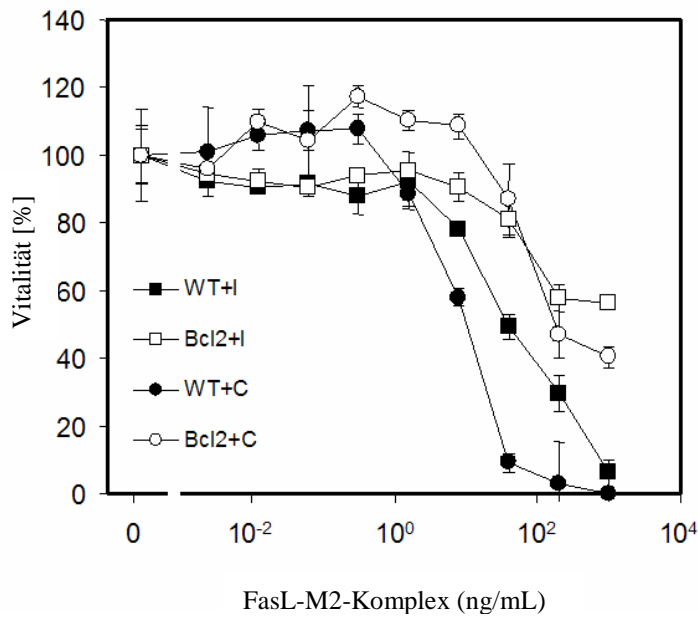


Abb. 6: Bcl2 schützt KB-Zellen vor FasL-induzierter Apoptose

2 x 10⁴ KB- und KB-Bcl2-GFP-Zellen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. Die IFN γ -Gruppe wurde 24 h mit IFN γ (20 ng/mL) vorbehandelt. Daraufhin wurden die Zellen mit durch M2 (0,5 μ g/mL) komplexiertem FasL-Flag bei einer Anfangskonzentration von 1 μ g/mL in Anwesenheit von IFN γ oder CHX (2,5 μ g/mL) stimuliert. CHX und zVAD-fmk (20 μ M) wurden 1,5 h vor Stimulationsbeginn zugegeben. Die Verdünnungsschritte erfolgten im Verhältnis 1:5 beginnend bei 1000 ng/mL FasL-M2-Komplex. Die Stimulationsdauer betrug 16 h. Abkürzungen: WT: KB-wildtyp, Bcl2: KB-Bcl2-GFP, C: CHX, I: IFN γ .

4.2.2 Die FasL-induzierte IL8-Produktion ist im Vergleich zu den parentalen KB-Zellen in Bcl2-exprimierenden KB-Zellen verstärkt

Um zu untersuchen, ob die Blockade der apoptotischen Signaltransduktion durch Bcl2 eine Verstärkung der nicht-apoptotischen Signaltransduktion analog zur Behandlung mit zVAD-fmk bewirkt, wurde die FasL-induzierte IL8-Produktion der parentalen und Bcl2-GFP exprimierenden KB-Zellen verglichen. Es zeigte sich, dass die Inhibition des intrinsischen apoptotischen Signalwegs durch Bcl2 auch in Abwesenheit von zVAD-fmk zu einer verstärkten IL8-Produktion führt (Abb. 7). Auch unter verstärkter apoptotischen Bedingungen, durch Vorbehandlung mit CHX oder IFN γ , konnte eine im Vergleich zu den parentalen KB-Zellen deutliche IL8-Produktion in den KB-Bcl2-GFP-Zellen durch quervernetzten FasL erreicht werden. Die Expression von Bcl2 führte somit nicht nur zur Inhibition des intrinsischen apoptotischen Signalweges, sondern verstärkte analog zu einer Behandlung mit zVAD-fmk, die nicht-apoptotische Signaltransduktion in KB-Zellen.

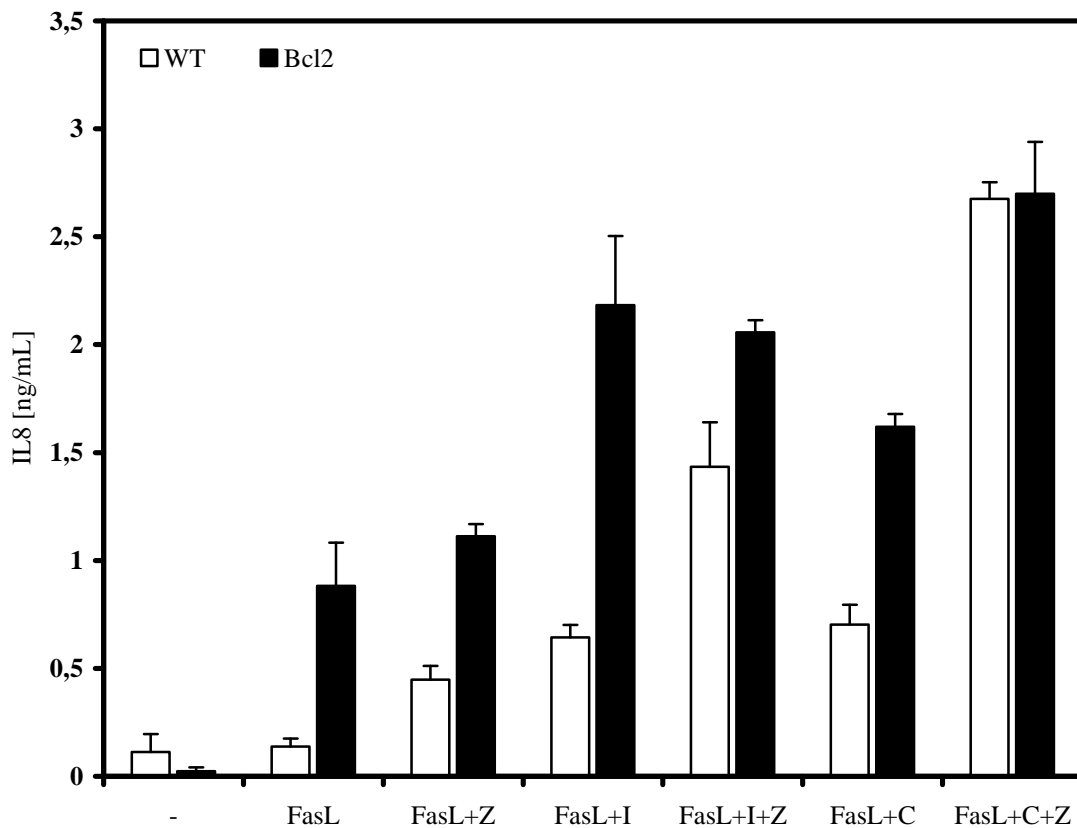


Abb. 7: Die IL8-Induktion durch FasL ist in KB-Bcl2 Zellen verstärkt

2×10^4 KB- und KB-Bcl2-GFP-Zellen pro well wurden in 96-well Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde für 24 h mit $\text{IFN}\gamma$ (20 ng/mL) vorbehandelt. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit M2-quervernetztem FasL-Flag (200 ng/mL) in Anwesenheit von $\text{IFN}\gamma$ oder CHX stimuliert. Cycloheximid (2,5 $\mu\text{g/mL}$) und zVAD-fmk (20 μM) wurden 1,5 h vor Stimulation mit FasL zugegeben. Die Kulturüberstände wurden nach 6 h Inkubationszeit zur Analyse mittels IL8-ELISA entnommen und untersucht. Abkürzungen: WT: KB-wildtyp, Bcl2: KB-Bcl2-GFP C: CHX, I: $\text{IFN}\gamma$, Z: zVAD-fmk.

4.3 KB-Zellen exprimieren TRAILR1, TRAILR2 und TRAILR4

Nachdem in den in 4.1 und 4.2 beschriebenen Versuchen gezeigt wurde, dass FasL in KB-Zellen unter bestimmten Bedingungen sowohl apoptotische als auch nicht-apoptotisches Signaltransduktion induzieren kann und dass beides durch $\text{IFN}\gamma$ verstärkt wird, sollte nun untersucht werden, ob dies auch für andere Todesrezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie, nämlich TRAILR1 und TRAILR2, gilt. TRAIL und $\text{IFN}\gamma$ werden von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen produziert und wirken synergistisch auf ihre Zielzellen (s. 1.3.5). Des Weiteren unterliegt die Expression der TRAIL-

Rezeptoren und TRAIL selbst dem Einfluss von $\text{IFN}\gamma$ (Sedger et al., 1999). Um sicher zu stellen, dass KB-Zellen zur Untersuchung der TRAIL-induzierten apoptotischen und nicht-apoptotischen Signaltransduktion geeignet sind, wurden die KB-Zellen zunächst mittels FACS-Analyse hinsichtlich Expression der TRAIL-Rezeptoren charakterisiert. Dabei wurden für die vier TRAIL-Rezeptoren spezifische, Phycoerythrin (PE)- oder Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markierte Antikörper verwendet. In Abb. 8 ist gezeigt, dass KB-Zellen TRAILR1, TRAILR2 und TRAILR4 exprimieren, jedoch keine wesentlichen Mengen TRAILR3.

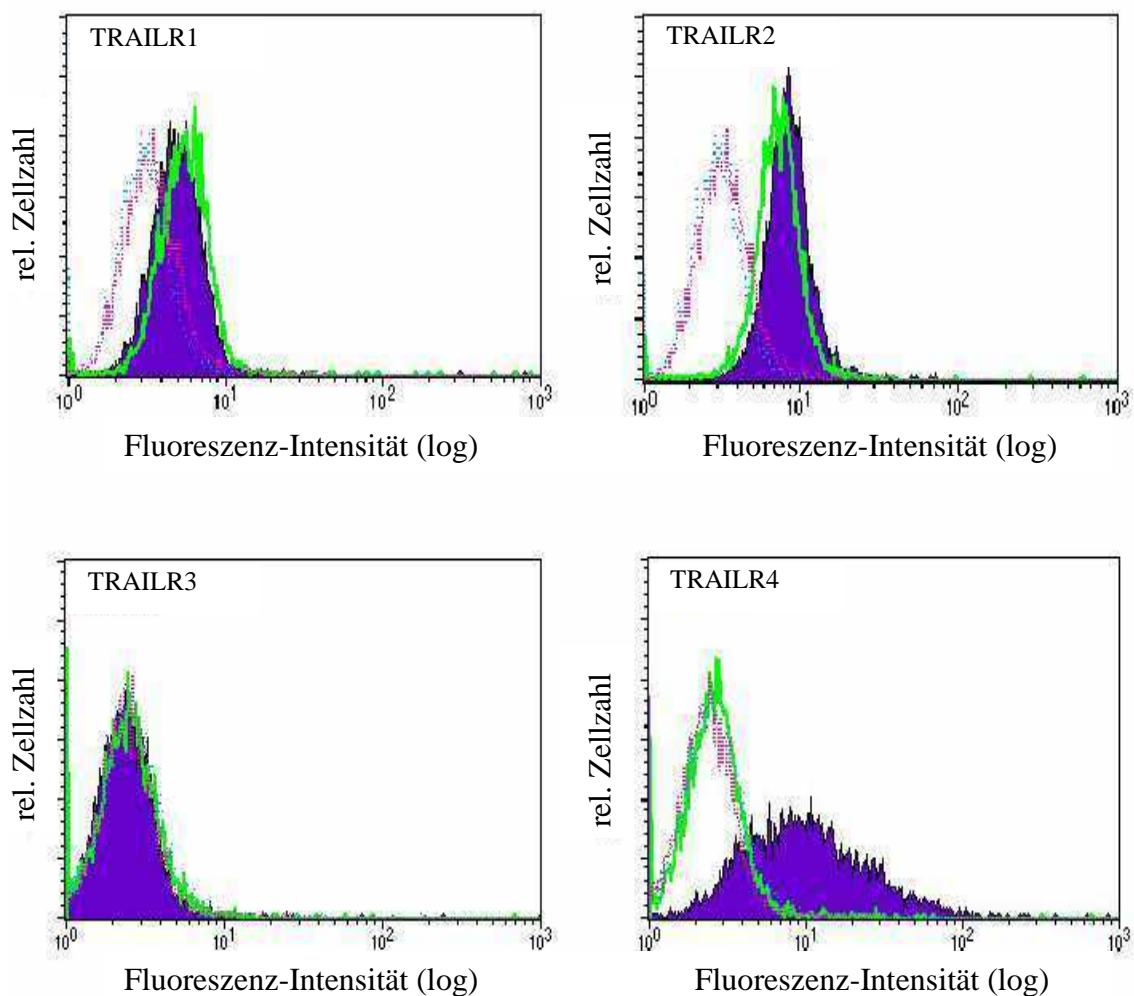


Abb. 8: FACS-Analyse der Expression von TRAIL-R1, -R2, -R3 und -R4 in KB-WT-Zellen

Die blau dargestellten Verteilungskurven repräsentieren die mit $\alpha\text{TRAILR1}$, -R2, -R3, -R4 und Sekundärantikörper behandelten KB-Zellen. Die grüne Kurve stellt die mit $\alpha\text{TRAILR1}$, -R2, -R3, -R4 behandelten Zellen dar, die zuvor für 24 h mit $\text{IFN}\gamma$ (20 ng/mL) behandelt wurden. Die mit Kontroll-IgG1 behandelten Zellen sind durch die rote- (ohne $\text{IFN}\gamma$ - Vorstimulation) und die hellblaue Kurve (mit $\text{IFN}\gamma$ -Vorstimulation) dargestellt.

4.3.1 IFN γ bewirkt eine Reduktion der TRAILR4-Expression in KB-Zellen

Um einen möglichen Einfluss von IFN γ auf die TRAIL-Rezeptor-Expression zu untersuchen, wurden die KB-Zellen für 24 h mit IFN γ vorbehandelt und anschließend wiederum mittels FACS-Analyse untersucht. Es fiel auf, dass nach 24 h Stimulation mit IFN γ , eine Abnahme der TRAILR2-Expression, sowie eine völlige Reduktion der TRAILR4-Expression auf der Zelloberfläche nachweisbar war (Abb. 8). Die Herunterregulierung des „Decoy“-Rezeptors TRAILR4 durch IFN γ könnte zumindest zum Teil die verstärkte TRAIL-induzierte Apoptose, die in diesen Zellen beobachtet wird erklären.

4.4 Einfluss von IFN γ auf die TRAIL-induzierte Apoptose und nicht-apoptotische Signaltransduktion

In den in 4.1 und 4.2 beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass KB-Zellen durch Cycloheximid und durch IFN γ für die FasL-induzierte nicht-apoptotische Signaltransduktion sensibilisiert werden können. Obwohl die Inhibition der Proteinsynthese durch das Chemotherapeutikum Cycloheximid die Situation viral infizierter Zellen zum Teil simuliert, muss diese Methode jedoch als unphysiologisch betrachtet werden. Es ist bekannt, dass Krebszellen durch Behandlung mit IFN γ , das wie TRAIL in vivo von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert wird, für TRAIL-Rezeptor-vermittelte Apoptose sensibilisiert werden können (Park et al., 2004; Merchant et al., 2004). Das Zusammenwirken von IFN γ und TRAIL ist daher vermutlich von physiologischer Relevanz. Da in letzter Zeit klar geworden ist, dass auch TRAIL die Fähigkeit besitzt NF κ B zu aktivieren, sollte nun untersucht werden, ob sich der Einfluss von IFN γ nicht nur auf die apoptotischen-, sondern auch auf die geninduzierenden Eigenschaften von TRAIL auswirkt. Zu diesem Zwecke wurden KB-Zellen mit α TRAILR1-Serum und α TRAILR2-Serum in An- und Abwesenheit von IFN γ stimuliert.

4.4.1 IFN γ sensibilisiert KB-Zellen für TRAILR1- und TRAILR2-vermittelte Apoptose

Wie Fas besitzen TRAILR1 und TRAILR2 eine Todesdomäne. Im folgenden Versuch sollte geklärt werden, ob auch für diese Todesrezeptoren eine Sensibilisierung der KB-Zellen nötig ist, um effektiv Apoptose induzieren zu können. Es zeigte sich, dass eine Vorbehandlung der KB-Zellen mit IFN γ oder CHX suffizient ist, um diese für TRAILR1- und TRAILR2-vermittelte Apoptose zu sensibilisieren (Abb. 9). Es fiel jedoch auf, dass die TRAILR1- und TRAILR2-vermittelte Apoptose in den IFN γ -sensitivierten Zellen weniger effizient induziert wurde als in den mit CHX behandelten Zellen. Die Tötung der Zellen erfolgte analog zur Fas-vermittelten Apoptose über Caspasen. Dies ist daraus ersichtlich, dass die Behandlung der Zellen mit einem Caspase-Inhibitor diese vollständig vor TRAILR1- und TRAILR2-vermittelter Apoptose zu schützen vermochte (Abb. 9).

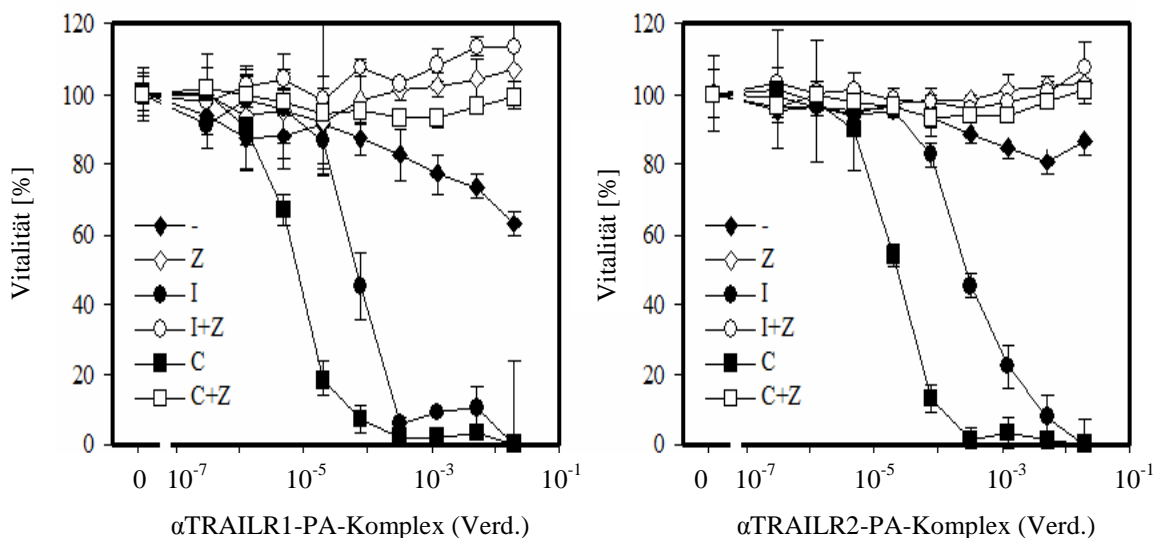


Abb. 9: IFN γ sensibilisiert KB-Zellen für TRAILR1- und TRAILR2-induzierte Apoptose

2 x 10⁴ KB-Zellen/well wurden in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde zu einer Gruppe IFN γ (20 ng/mL) zugegeben und diese für weitere 24 h kultiviert. CHX (2,5 μ g/mL) und zVAD-fmk (20 μ M) wurden 1,5 h vor Stimulation zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einer bei 1/50 beginnenden Verdünnung von durch Protein A (2,5 μ g/mL)-quervernetztem α TRAILR1- oder α TRAILR2-Serum versehen. Die Inkubationsdauer betrug 16 h. Die Verdünnungsschritte erfolgten im Verhältnis 1:4. Die Vitalitätsbestimmung erfolgte durch Zytotoxizitätsanalyse mittels Kristallviolett färbung. Abkürzungen: C: Cycloheximid, I: IFN γ , Z: zVAD-fmk.

4.4.2 IFN γ verstärkt die TRAILR1-vermittelte IL8-Produktion in KB-Zellen

Nachdem eine Verstärkung der TRAIL-induzierten Apoptose durch IFN γ in 4.4.1 gezeigt werden konnte, sollte im Folgenden der Einfluss von IFN γ auf die nicht-apoptotische Signaltransduktion untersucht werden.

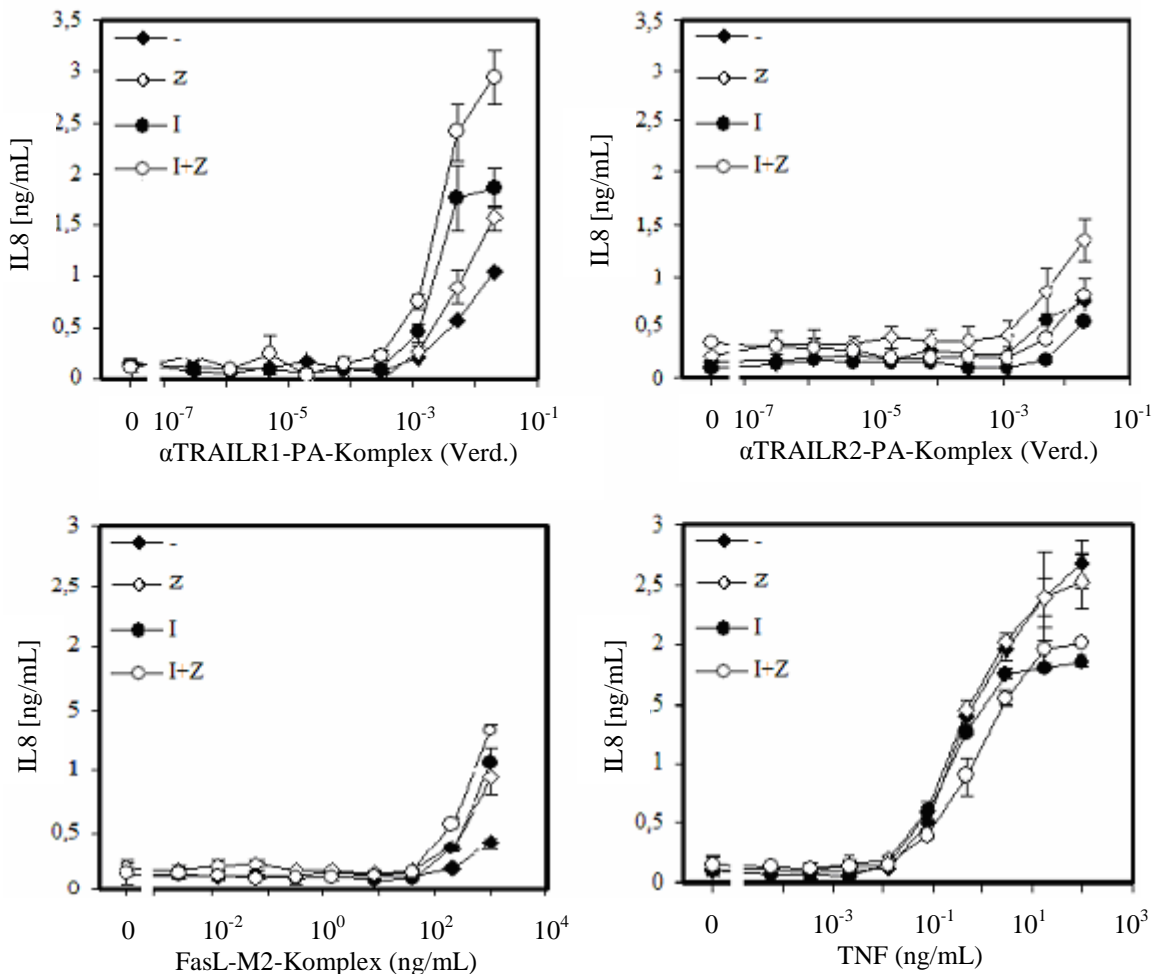


Abb. 10: TRAILR1 und TRAILR2 vermitteln IL8-Produktion

Es wurden 2×10^4 KB-Zellen pro well in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach Erreichen subkonfluenter Zelldichten wurde ein Teil der Zellen für 24 h mit IFN γ (20 ng/mL) vorbehandelt. Darauf wurden die IFN γ -vorbehandelten Zellen in Anwesenheit und die nicht-vorbehandelten Zellen in Abwesenheit von IFN γ mit durch PA (0,5 μ g/mL)-quervernetztem α TRAILR1-Serum, α TRAILR2-Serum (Anfangskonzentration jeweils 1/50, Verdünnungsschritte 1:4), quervernetztem FasL-Flag (Anfangskonzentration 1 μ g/mL, Verdünnungsschritte 1:5) und TNF (Anfangskonzentration 100 ng/mL, Verdünnungsschritte 1:6) stimuliert. Die Zellen wurden 1 h vor Stimulation mit zVAD-fmk (20 μ M) behandelt, um diese vor Apoptose zu schützen. Nach 6 h Inkubationszeit wurden 100 μ L des Überstandes zur Analyse mittels IL8-ELISA abgenommen. Abkürzungen: I: IFN γ , Z: zVAD-fmk.

Um die Auswirkungen von $\text{IFN}\gamma$ auf die TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung zu studieren, wurden die mit α TRAILR1-Serum und α TRAILR2-Serum stimulierten Zellen auf ihre IL8-Produktion hin untersucht. Zum Vergleich wurde zusätzlich die FasL- und TNF-vermittelte IL8-Produktion bestimmt. Die in Abb. 10 dargestellten Versuchsergebnisse zeigen, dass durch Vorbehandlung mit $\text{IFN}\gamma$ eine deutlich verstärkte IL8-Produktion in den mit α TRAILR1-Serum stimulierten Zellen erreicht werden konnte. Die IL8-Produktion unter verstärkt apoptotischen Bedingungen nach $\text{IFN}\gamma$ -Vorbehandlung ist höher als die der mit zVAD-fmk geschützten KB-Zellen, was auch hier, analog zur FasL-vermittelten Geninduktion auf gleichzeitig ablaufende apoptotische und nicht-apoptotische Signalwege schließen lässt. Durch Schutz der $\text{IFN}\gamma$ -vorbehandelten Zellen vor Apoptose mittels zVAD-fmk erhöhte sich die IL8-Konzentration im Überstand noch einmal. Es fiel auf, dass die durch α TRAILR2-Serum induzierte IL8-Produktion im Vergleich mit der durch α TRAILR1-Serum induzierten IL8-Produktion schwächer ausfiel und durch $\text{IFN}\gamma$ scheinbar nicht verstärkt wurde. Die IL8-Konzentration in den Überständen der mit α TRAILR1, zVAD-fmk und $\text{IFN}\gamma$ behandelten Zellen erreichte hingegen Werte im Bereich der durch TNF-induzierten IL8-Produktion. TRAILR1 verhielt sich hinsichtlich der IL8-Produktion sowie im Hinblick auf die Auswirkungen der Vorbehandlung mit $\text{IFN}\gamma$ wie Fas, wogegen für TNF keine Verstärkung des IL8-Signals durch $\text{IFN}\gamma$ nachgewiesen werden konnte.

4.5 Bcl2 schützt KB-Zellen vor TRAILR1- und TRAILR2-vermittelter Apoptose

In 4.2.1 konnte gezeigt werden, dass das anti-apoptotisch wirkende Bcl2-Protein in KB-Zellen einen guten Schutz vor FasL-induzierter Apoptose bewirkt. Im folgenden Versuch wurde nun gefunden, dass die Expression von Bcl2 in KB-Zellen auch vor TRAILR1- und TRAILR2-induzierter Apoptose schützt (Abb. 11). Wie für Fas beschrieben, zeigte sich auch für TRAILR1 und TRAILR2, dass die Effizienz der Apoptoseinduktion in den $\text{IFN}\gamma$ -vorbehandelten Zellen gegenüber den mit CHX behandelten Zellen etwas geringer ist.

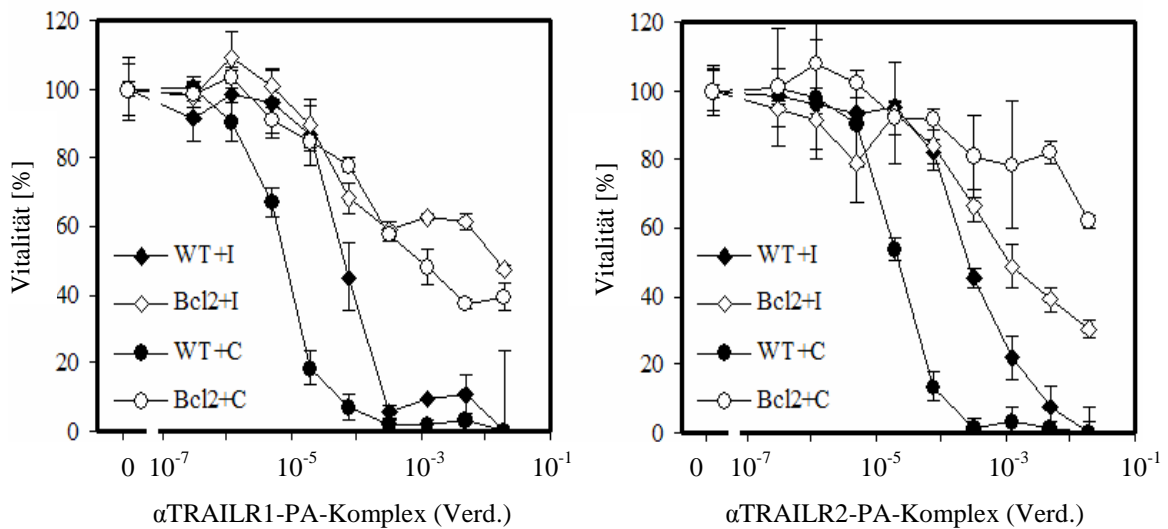


Abb. 11: KB-Zellen werden durch Expression von Bcl2 gegen TRAILR1- und TRAILR2-vermittelte Apoptose geschützt.

2×10^4 KB- und KB-Bcl2-GFP-Zellen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. Eine Gruppe wurde zunächst 24 h mit IFN γ (20 ng/mL) vorbehandelt. CHX (2,5 μ g/mL) und zVAD-fmk wurden 1,5 h vor Stimulation zugegeben. Die Zellen wurden dann mit einer bei 1/50 beginnenden Verdünnung von durch Protein A (2,5 μ g/mL) quervernetztem α TRAILR1- oder α TRAILR2-Serum versehen. Die Verdünnungsschritte erfolgten im Verhältnis 1:4 und die Inkubationsdauer betrug 16 h. Die Vitalitätsbestimmung erfolgte durch Zytotoxizitätsanalyse mittels Kristallviolett-färbung. Abkürzungen: WT: KB-wildtyp, Bcl2: KB-Bcl2-GFP, C: Cycloheximid, I: IFN γ PA: Protein A.

4.6 Bcl2-Expression verstärkt die TRAIL-induzierte IL8-Produktion

Die Expression von Bcl2 in KB-Zellen schützt diese vor FasL-vermittelter Apoptose und bewirkt außerdem wie zVAD-fmk eine verstärkte FasL-induzierte IL8-Produktion (4.2.2). Da in 4.4.3 gezeigt werden konnte, dass die Expression von Bcl2 in KB-Zellen auch vor TRAILR1- und TRAILR2- vermittelter Apoptose schützt, sollte nun untersucht werden, ob sich analog zur Untersuchung mit FasL auch eine verstärkte IL8-Produktion nach Stimulation mit α TRAIL-Rezeptor-Seren nachweisen lässt. Da sich herausgestellt hatte, dass α TRAILR1-Serum in Verbindung mit IFN γ die effektivste IL8-Produktion bewirkt, wurde für die folgenden Versuche α TRAILR1-Serum in Kombination mit einer IFN γ -Vorbehandlung verwendet. Es zeigte sich erwartungsgemäß, dass in den durch Bcl2-GFP-Expression vor Apoptose geschützten KB-Zellen eine stärkere IL8-Produktion durch α TRAILR1-Serum erreicht werden konnte als in den parentalen KB-Zellen (Abb. 12).

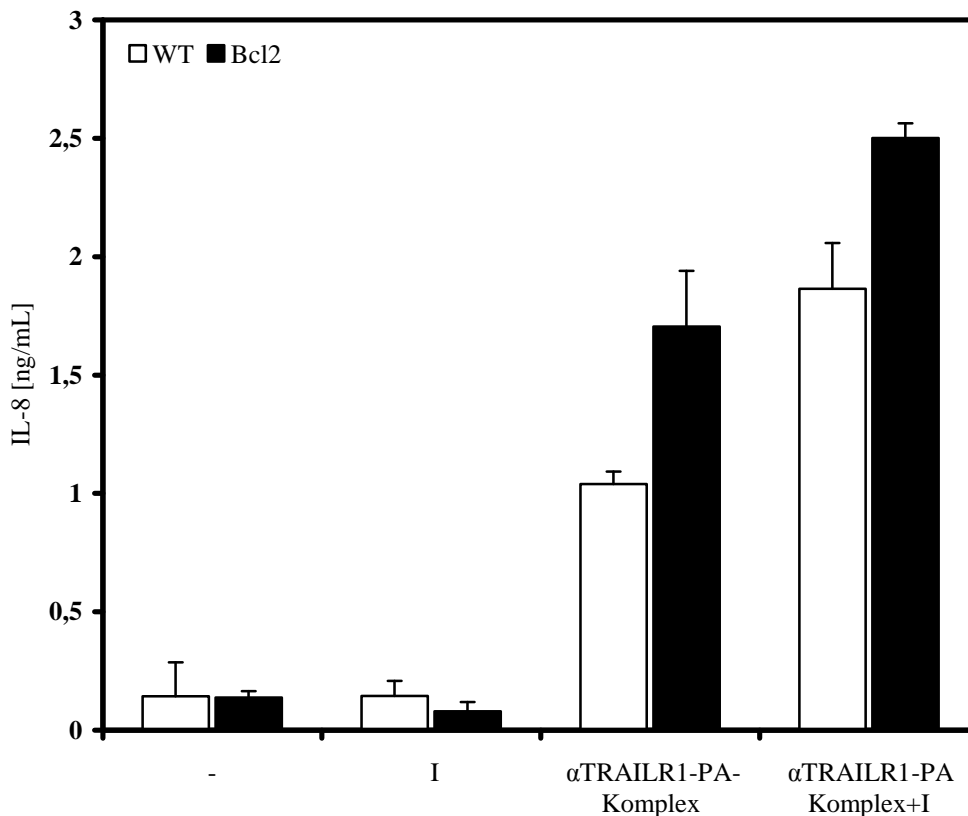


Abb. 12: Analyse der α TRAILR1-Serum-vermittelten IL8-Induktion in KB- und KB-Bcl2-GFP-Zellen

KB-Zellen und KB-Bcl2-GFP -Zellen wurden in 96-well-Mikrotiterplatten (2×10^4 Zellen pro well) ausgesät und kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde für 24 h mit $\text{IFN}\gamma$ vorbehandelt. Daraufhin wurde der Überstand entfernt und die Zellen in An- oder Abwesenheit von $\text{IFN}\gamma$ (20 ng/mL) mit durch PA (0,5 $\mu\text{g/mL}$) quervernetztem α TRAILR1-Serum (Verdünnung: 1/50) stimuliert. Nach 6 h Inkubationszeit wurden 100 μL des Überstandes zur Analyse mittels IL8-ELISA entnommen. Abkürzungen: WT: KB-wildtyp, Bcl2: KB-Bcl2-GFP, I: $\text{IFN}\gamma$, PA: Protein A.

4.7 TRAILR1 aktiviert $\text{NF}\kappa\text{B}$

In Abb. 10 ist dargestellt, dass durch α TRAILR1-Serum-Stimulation in Kombination mit Vorbehandlung durch $\text{IFN}\gamma$ und zVAD-fmk in KB-Zellen IL8-Konzentrationen erreicht werden konnten, die denen der durch TNF-induzierten IL8-Produktion vergleichbar sind. IL8 diente hierbei als Indikator für die Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$, da IL8 $\text{NF}\kappa\text{B}$ -abhängig reguliert wird (Hoffmann et al., 2002). Da neben dem $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweg auch andere Signalwege, wie z. B. der JNK-Signalweg an der IL8-Induktion beteiligt sein können, sollte nun in den folgenden Versuchen untersucht werden, ob es durch die Stimulation der KB-Zellen mit α TRAILR1-Serum tatsächlich zur Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ kommt.

4.7.1 TRAILR1 vermittelt die Degradation von I κ B α in KB-Zellen

In Untersuchungen zur TNF-induzierten Aktivierung von NF κ B konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung der I κ Bs und die daran anschließende Degradation dieser durch das Proteasom notwendig sind, um NF κ B zu aktivieren. Da sich in den oben gezeigten Versuchen herausgestellt hatte, dass die TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung in KB-Zellen unter nicht-apoptotischen Bedingungen und nach Sensibilisierung durch CHX oder IFN γ am effektivsten ist, wurden die mit α TRAILR1-Serum stimulierten Zellen mit CHX oder IFN γ und zVAD-fmk vorbehandelt. Die darauf folgende Stimulation mit α TRAILR1-Serum bewirkte ebenso wie eine Stimulation mit TNF eine deutliche transiente Abnahme des I κ B α -Signals im Westernblot (Abb. 13). Es zeigte sich jedoch, dass die TNF-induzierte I κ B α -Degradation mit einer anderen Kinetik verläuft als die TRAILR1-vermittelten I κ B α -Degradation. Die durch TRAILR1-vermittelte Degradation von I κ B α begann nach einer Stunde mit einem Maximum nach zwei Stunden, während bei der TNF-vermittelten I κ B α -Degradation eine Abnahme des I κ B α -Signals schon nach zehn Minuten zu beobachten war.

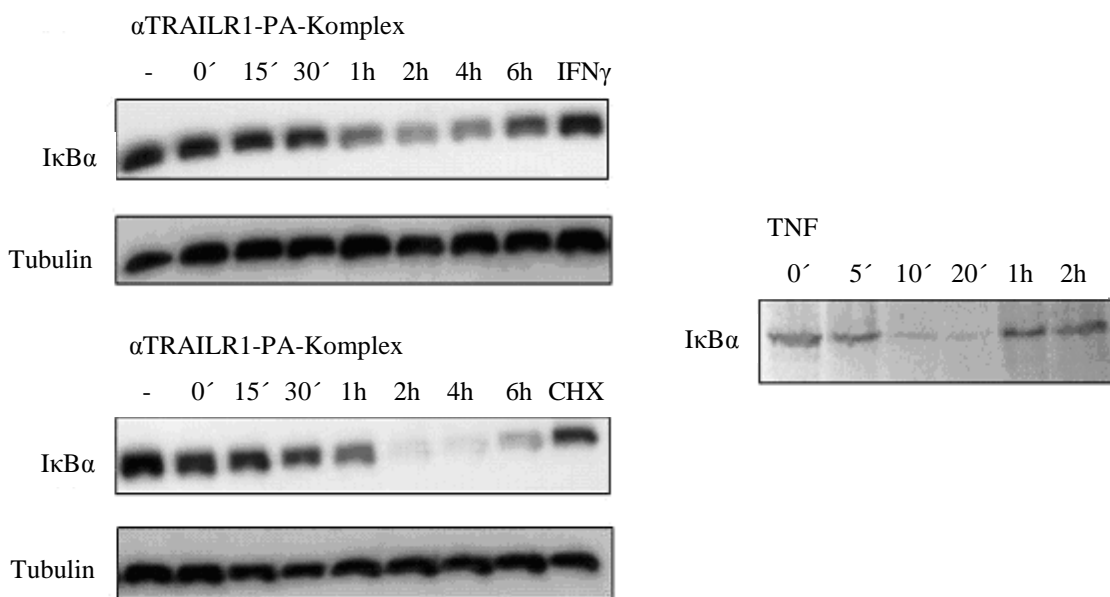


Abb. 13: I κ B α -Degradation nach Stimulation mit α TRAILR1-Serum

KB-Zellen wurden in 6 cm Petrischalen ausgesät und kultiviert. Am folgenden Tag wurde ein Teil der Zellen für 24 h mit IFN γ (20 ng/mL) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Protein A-quervernetztem α TRAILR1-Serum (Verd.: 1/50) für die angegebenen Zeiten stimuliert, geerntet und lysiert. Für die CHX-Gruppe wurde CHX (2,5 μ g/mL) 2,5 h vor Stimulation zugegeben. Zur Kontrolle wurden die letzte Gruppe allein mit IFN γ für 28 h oder CHX für 8,5 h stimuliert. In beiden Gruppen wurden die Zellen durch Zugabe von zVAD-fmk (20 μ M) vor Apoptose geschützt. Für die TNF-Gruppe wurden die Zellen mit TNF (10 ng/mL) stimuliert und nach den angegebenen Zeiten geerntet und lysiert.

Die nur transiente Abnahme des I κ B α -Signals ist auf die unter nicht-apoptotischen Bedingungen mögliche Resynthese von I κ B α durch verstärkte Transkription des Gens zurückzuführen, die unter apoptotischen Bedingungen, in denen die Proteinsynthese blockiert ist, nicht möglich ist.

4.7.2 NF κ B Kernlokalisierung

Neben der I κ B α -Degradation durch das Proteasom kann auch die Translokation von aktiviertem NF κ B in den Kern als Indikator für eine Aktivierung des NF κ B-Signalwegs dienen. Um dies zu untersuchen, wurden KB-Zellen mit α TRAILR1-Serum nach Vorbehandlung mit IFN γ und zVAD-fmk stimuliert. Die Kernlysate wurden anschließend mittels NF κ B-ELISA (Active Motif, TransAM-NF κ B-Kit) untersucht. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich eine deutliche Zunahme des NF κ B-Signals im Zellkern nach Stimulation der Zellen mit α TRAILR1-Serum. Dieses erreichte, wie schon im IL8-ELISA zu sehen war, annähernd das Niveau der TNF-induzierten NF κ B-Antwort (Abb. 14).

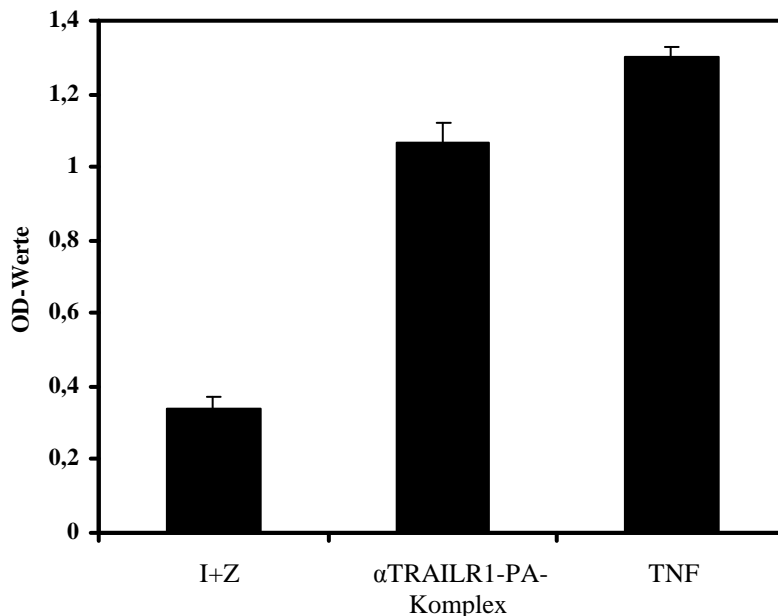


Abb. 14: α TRAILR1-Serum induziert die Translokation von NF κ B in den Zellkern

KB-Zellen wurden 24 h mit IFN γ (20 ng/mL) vorbehandelt und anschließend mit Protein A (0,5 μ g/mL)-vernetztem α TRAILR1-Serum (Konz.: 1/50) in Anwesenheit von zVAD-fmk (20 μ M) stimuliert. Die Zellen wurden nach 2 h geerntet und es wurden Zellkernlysate zur Analyse im NF κ B-ELISA angefertigt. Zum Vergleich ist die TNF (10 ng/mL)-induzierte NF κ B-Kerntranslokation gezeigt. Abkürzungen: I: IFN γ , Z: zVAD-fmk, PA: Protein A.

4.8 Modulation der TRAIL-Rezeptor-vermittelten Geninduktion durch FLIP

Wie in den vorhergehenden Kapiteln gezeigt wurde, benötigt die TRAIL-induzierte apoptotische als auch die nicht-apoptotische Signaltransduktion in KB-Zellen eine Sensibilisierung durch IFN γ oder CHX. Die Existenz eines Inhibitors mit hohem Umsatz, der durch Hemmung der Proteinsynthese mittels CHX oder durch Steigerung der proteasomalen Proteindegradation durch IFN γ depletiert wird, stellt eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen dar. Für das Caspase-8 homologe FLIP konnte sowohl eine stark ausgeprägte Sensitivität gegenüber CHX nachgewiesen, als auch ein inhibitorischer Effekt auf die FasL- und TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung gezeigt werden (Wajant et al, 2000). Um weitere Einblicke in die TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung zu erhalten, sollte daher der mögliche Einfluss von FLIP auf die TRAIL-induzierte IL8-Produktion untersucht werden.

4.8.1 Die TRAIL-induzierte IL8-Produktion wird in KB-Zellen sowohl durch FLIP_L als auch durch FLIP_S inhibiert

Zur Untersuchung der TRAIL-induzierten IL8-Produktion wurden FLIP-Long-GFP (FLIP_L) und FLIP-Short-GFP (FLIP_S) exprimierende KB-Zellen verwendet. Zunächst konnte in Zytotoxizitätsanalysen gezeigt werden, dass KB-Zellen durch die Überexpression von FLIP_L und FLIP_S vollständig vor TRAIL-induzierter Apoptose geschützt sind (Daten nicht gezeigt). Als nächstes sollte untersucht werden, wie sich die Überexpression der beiden Spliceformen von FLIP auf die TRAIL-induzierte IL8-Produktion in KB-Zellen auswirkt. Da die TRAILR1-vermittelte IL8-Produktion durch IFN γ gesteigert werden kann, wurden die parentalen wie auch die FLIP_{L/S} exprimierenden Zellen für 24h mit IFN γ vorbehandelt. Die parentalen KB-WT-Zellen wurden zusätzlich mit zVAD-fmk behandelt, um auch diese vor Apoptoseinduktion durch TRAIL zu schützen. Das in Abb. 15 dargestellte Versuchsergebnis zeigt, dass sowohl in FLIP_S- als auch in FLIP_L-exprimierenden KB-Zellen die TRAILR1- und TRAILR2-vermittelte IL8-Produktion deutlich vermindert ist, während in den parentalen KB-Zellen eine deutliche IL8-Produktion nachweisbar war.

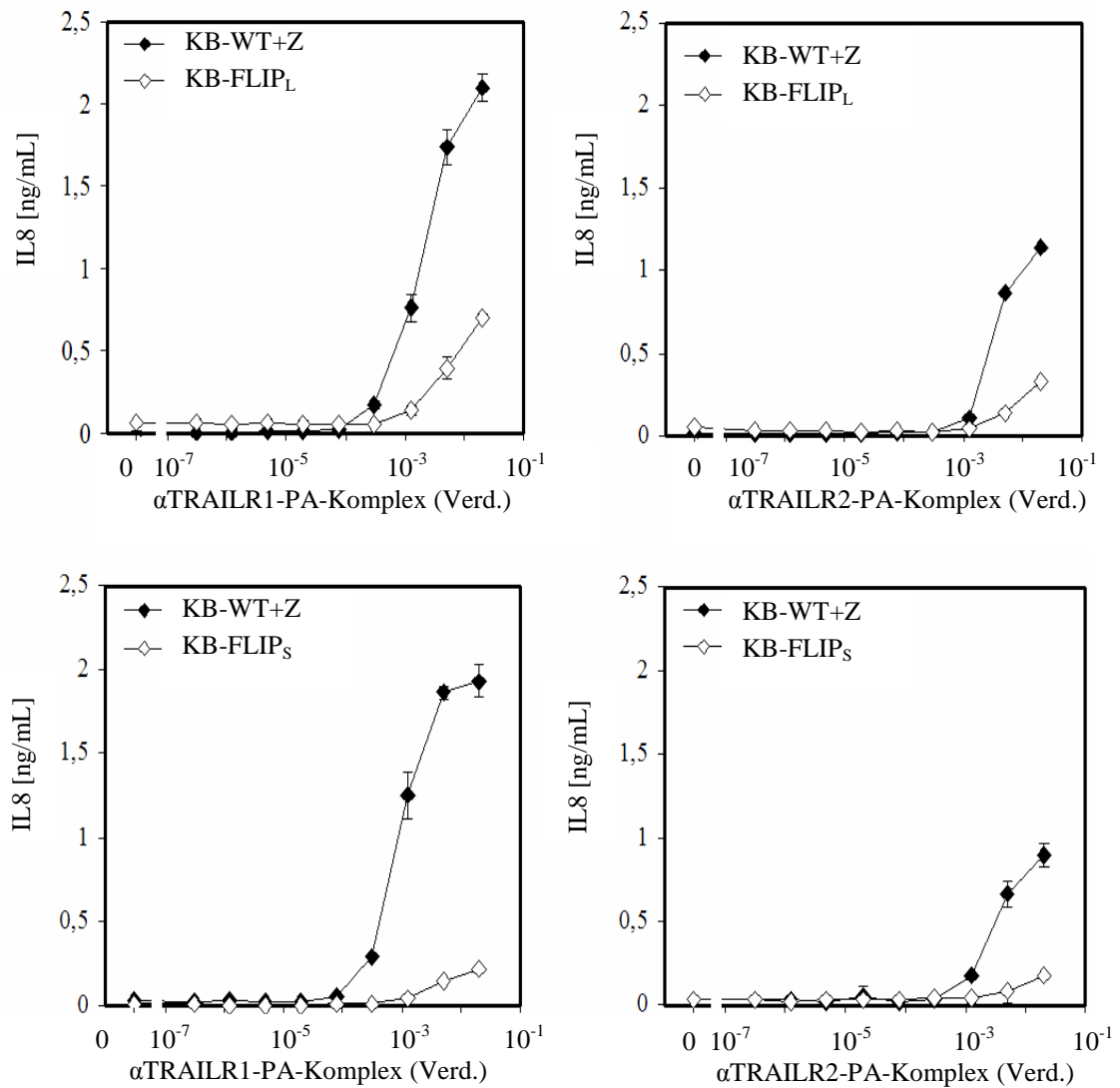


Abb. 15: FLIP_L und FLIP_S inhibieren die TRAIL-R1- und TRAIL-R2-vermittelte IL8-Produktion

Es wurden 2×10^4 KB-WT, -FLIP_S oder -FLIP_L Zellen pro well in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. Nach Erreichen subkonfluer Zeldichten wurden die Zellen mit IFN γ (20 ng/mL) für 24 h vorbehandelt. Dann wurden die Zellen in Anwesenheit von IFN γ mit durch Protein A (0,5 μ g/mL)-quervernetztem α TRAILR1 (Verd.: 1/100)- oder α TRAILR2 (Verd.: 1/50)-Serum stimuliert. Die Verdünnungsschritte erfolgten im Verhältnis 1:4. Die KB-WT-Zellen wurden 1 h vor Stimulation mit zVAD-fmk behandelt. Nach 6 h Inkubationszeit wurde der Überstand zur Analyse mittels IL8-ELISA entnommen.

4.8.2 Inhibition der TRAIL-Rezeptor-vermittelten IL8-Produktion durch endogen exprimiertes FLIP

Wie zuvor gezeigt, benötigt die TRAIL-induzierte Apoptose sowie die TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung in KB-Zellen eine Sensibilisierung z. B. durch IFN γ und kann durch FLIP_L- als auch durch FLIP_S-Expression inhibiert werden. Die Blockierung der TRAIL-vermittelten Signaltransduktion durch endogenes FLIP scheint somit wahrscheinlich.

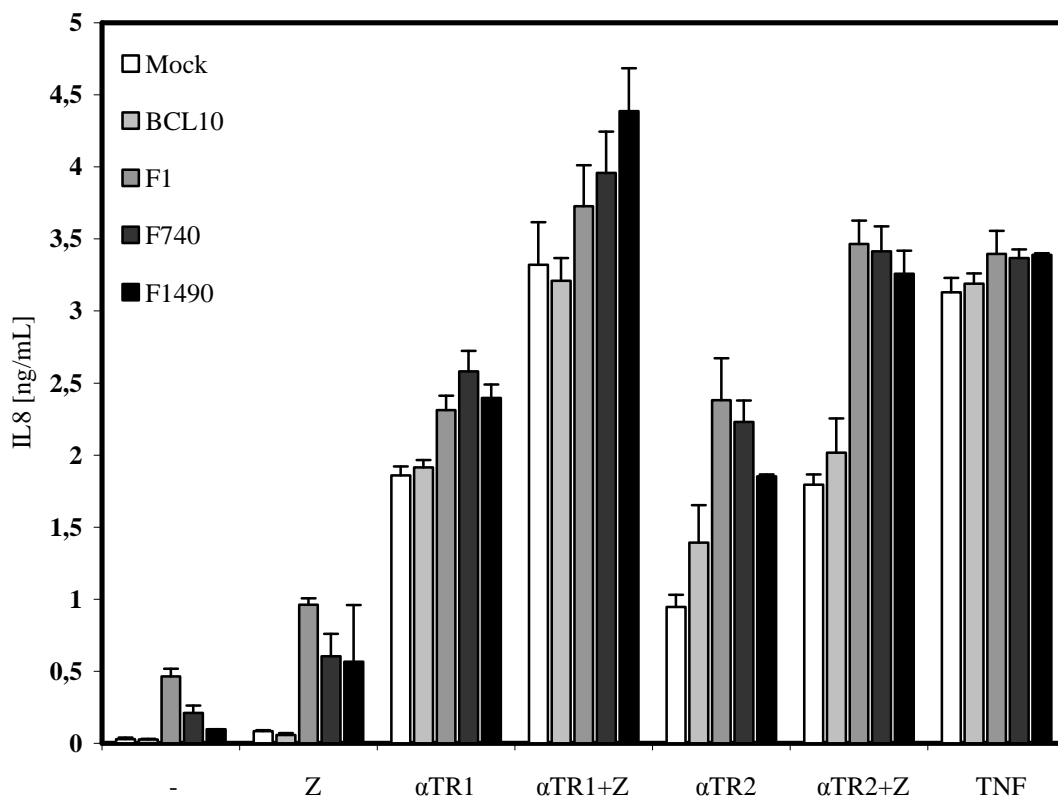


Abb. 16: Endogen exprimiertes FLIP beeinflusst die TRAILR1- und TRAILR2-vermittelte IL8-Produktion

KB-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (BCL10), F1-, F740- und F1490-siRNA, sowie in Abwesenheit von siRNA (Mock) elektroporiert. Die siRNAs wurden mit einer Konzentration von 300 nM, bezogen auf das Volumen des Transfektionsansatzes, eingesetzt. Die elektroporierten Zellen wurden in 96-well Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von zVAD-fmk (20 μ M) mit Protein A-quervernetztem α TRAILR1-Serum (Verd.: 1/50), α TRAILR2-Serum (Verd.: 1/100) oder TNF (20 ng/mL) stimuliert und für 6 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und mittels IL8-ELISA untersucht. Abkürzungen: α TR1: α TRAILR1-PA-Komplex, α TR2: α TRAILR2-PA-Komplex, Z: zVAD-fmk.

Um zu prüfen, ob endogenes FLIP die TRAIL-induzierte Signaltransduktion in KB-Zellen blockiert, wurde die Wirkung FLIP-spezifischer siRNA untersucht. Durch die Reduktion von endogenem FLIP_L und FLIP_S durch F1-siRNA oder spezifisch FLIP_L durch die siRNAs F1490 sowie F740, wurde eine Verstärkung der TRAILR1- und TRAILR2- vermittelten Apoptose (Daten nicht gezeigt) und IL8-Produktion bewirkt. Der inhibierende Effekt war dabei für TRAILR2 besonders ausgeprägt (Abb. 16). Des Weiteren konnte eine erhöhte basale IL8-Produktion in den mit FLIP-siRNA behandelten Zellen beobachtet werden. Die TNF-induzierte IL8-Produktion wurde durch die Reduktion von endogenem FLIP nicht beeinflusst. Die oben gezeigte inhibitorische Funktion von ektopisch exprimiertem FLIP für die TRAIL-vermittelte Signaltransduktion in KB-Zellen konnte somit auch für endogenes FLIP bestätigt werden.

5 Diskussion

5.1 FasL induziert das NFκB-Zielgen IL8 in KB-Zellen

In dieser Arbeit wurden Mechanismen der nicht-apoptotischen Signaltransduktion am Beispiel der Todesrezeptoren TRAILR1 und TRAILR2 untersucht. Den zentralen Punkt der Untersuchungen stellte hierbei die Untersuchung der Modulation der TRAIL-induzierten NFκB-Aktivierung durch FLIP und IFN γ dar. Da Fas und die TRAIL-Todesrezeptoren Apoptose über sehr ähnliche Mechanismen vermitteln und beide NFκB aktivieren können (Wachter et al., 2004; Wajant et al., 2000), wurde zum späteren Vergleich zunächst das am besten untersuchte Mitglied der Todesrezeptoren, Fas, hinsichtlich apoptotischer und nicht-apoptotischer Signaltransduktion untersucht. Die Analyse der Expression bekannter NFκB-Zielgene in mit Todesliganden behandelten Zellen stellt eine gute Möglichkeit zur Untersuchung der Todesrezeptor-vermittelten NFκB-Aktivierung dar. Zunächst wurde die NFκB-Aktivierung durch den klassischen Todesrezeptor Fas in einer humanen Zelllinie (KB-Zellen) anhand der Expression des NFκB-Zielgens IL8 untersucht. Dabei konnte eine Hochregulation der Expression von IL8 in mit FasL stimulierten KB-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 5). Die Fas-vermittelte IL8-Produktion war dabei, wie bereits in einer anderen Studie beschrieben (Sekine et al., 1996), nicht von der Auslösung des apoptotischen Programms abhängig. Die Inhibition der Apoptose mittels des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk führte vielmehr zu einer verstärkten Fas-vermittelten IL8-Produktion. Unter diesen anti-apoptotischen Bedingungen konnte die IL8-Produktion durch den Einsatz des Proteinsynthese-Inhibitors CHX noch einmal verstärkt werden (Abb. 5). Da Zellen auch durch die Vorbehandlung mit IFN γ für Todesrezeptor-vermittelte Apoptose sensibilisiert werden können (Chawla-Sarkar et al., 2003) und dies im Gegensatz zur Behandlung mit CHX eine „physiologische“ Situation widerspiegelt, sollte untersucht werden, ob hierdurch ein vergleichbarer Effekt erreicht werden kann. Nicht unerwartet, bewirkte die Behandlung der KB-Zellen mit IFN γ auch eine Sensibilisierung der Zellen hinsichtlich Fas-vermittelter Apoptose (Abb. 4). Im Einklang mit anderen Untersuchungen (Siegmond et al., 2005) zeigte sich neben den Auswirkungen auf die apoptotische Signaltransduktion auch eine deutliche Verstärkung der FasL-induzierten IL8-Produktion nach IFN γ -Vorbehandlung (Abb. 5). Die Mechanismen der IFN γ -vermittelten Sensibilisierung von Zellen für Fas-vermittelte Apoptose wie auch NFκB-

Aktivierung konnten noch nicht vollständig geklärt werden. In verschiedenen Studien wurde die Induktion oder Repression von mit der Apoptosesteuerung in Zusammenhang stehenden Genen wie z. B. Fas und FasL (Bernassola et al., 1999), TRAIL und TRAILRs (Sedger et al., 1999), Bcl2 und BclxL (Spanaus et al., 1998) und Caspase-8 (Ruiz-Ruiz et al., 2000) durch IFN γ nachgewiesen. Weiterhin konnte auch für das später näher erläuterte anti-apoptotisch wirkende Protein FLIP eine IFN γ -vermittelte Reduktion auf Protein-Ebene nachgewiesen werden (Siegmond et al., 2005).

5.2 FasL-induzierte Signaltransduktion in Bcl2-exprimierenden Zellen

Durch die Blockierung der Apoptose mittels Caspase-Inhibition durch zVAD-fmk konnte übereinstimmend mit der in 1.3.4.2 beschriebenen wechselseitigen Repression apoptotischer und NF κ B-aktivierender Signaltransduktion eine verstärkte Fas-vermittelte NF κ B-Aktivierung nachgewiesen werden (Abb. 4). Die Verwendung von zVAD-fmk zur Inhibition apoptotischer Signaltransduktion stellt nun aber einen „unphysiologischen“ Mechanismus dar. Eine naturgemäßere Möglichkeit, zumindest manche Zellen vor Apoptose zu schützen, ist die Expression des Bcl2-Moleküls. So führt die physiologische Expression von Bcl2 in Krebszellen zu einem Schutz vor Apoptose und Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. In anderen Apoptose-insensitiven Zellen konnten virale Bcl2-Homologe beschrieben werden (Cheng et al., 1997; Marshall et al., 1999). Weiterhin kann eine viral-induzierte Hochregulation von zellulärem Bcl2 in infizierten Zellen zum Schutz vor Apoptose beitragen, wie dies z. B. für das Epstein-Barr Virus gezeigt werden konnte (Henderson et al., 1991). Um sicher zu stellen, dass die Bcl2-exprimierenden KB-Zellen geeignet sind, um FasL-vermittelte NF κ B-Aktivierung zu untersuchen, wurden diese zunächst hinsichtlich der Effektivität des Schutzes gegenüber Fas-vermittelter Apoptose untersucht. In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen (Kreuz et al., 2004) zeigte sich eine deutliche Inhibition der FasL-induzierte Apoptose in den KB-Bcl2-Zellen. Somit können diese den Typ II Zellen (s. 1.2.2.1) zugeordnet werden, die zur Auslösung des apoptotischen Programms einer Verstärkung des extrinsischen Signals über den mitochondrialen Weg bedürfen.

Nun konnte die FasL-induzierte NF κ B-Aktivierung an den vor Apoptose geschützten KB-Bcl2-GFP-Zellen untersucht werden. In den Bcl2-GFP-exprimierenden Zellen konnte hierbei gegenüber den parentalen KB-Zellen eine deutlich verstärkte Fas-

vermittelte IL8-Produktion beobachtet werden (Abb. 7). Auch ließ sich in den mit zVAD-fmk behandelten Bcl2-exprimierenden Zellen eine verstärkte IL8-Produktion gegenüber den parentalen mit zVAD-fmk behandelten KB-Zellen beobachten. Die Expression von Bcl2 in KB-Zellen führt somit nicht nur zu einer Blockierung der apoptotischen Signaltransduktion, sondern vermag auch die Fas-vermittelte NFκB-Aktivierung analog zu zVAD-fmk signifikant zu verstärken. Hierzu passt auch, dass durch die Inhibition der Caspasen-Aktivierung durch Bcl2-Expression in Typ II-Zellen die Inaktivierung von Komponenten des NFκB-Signaltransduktionsweges wie RIP (Lin et al., 1999) oder IκBα (Barkett et al., 1997) verhindert wird.

5.3 Modulation der TRAIL-Rezeptor Expression durch IFN γ

Um die Eignung der KB-Zellen zur Untersuchung TRAIL-induzierter apoptotischer und nicht-apoptotischer Signaltransduktion sicher zu stellen, wurden diese zunächst hinsichtlich der TRAIL-Rezeptor Expression untersucht. Dabei zeigte sich, dass TRAILR1, TRAILR2 und TRAILR4 durch KB-Zellen exprimiert werden (Abb. 8) und diese somit zur Untersuchung TRAIL-induzierter Signaltransduktion geeignet sind. Während in einigen Untersuchungen die Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose auf die Expression von „Decoy“-Rezeptoren zurückgeführt werden konnte (Gura, 1997), korrelierte die TRAIL-„Decoy“-Rezeptor Expression in anderen Untersuchungen nicht mit der Sensibilität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose (Griffith et al., 1998; Griffith et al., 1999b). Da die TRAIL-induzierte Signaltransduktion insbesondere hinsichtlich des Einflusses von IFN γ untersucht werden sollte und in anderen Untersuchungen ein Einfluss auf die Expression der TRAIL-Rezeptoren durch IFN γ beobachtet werden konnte (z. B. Sedger et al., 1999), wurde das Expressionsniveau der TRAIL-Rezeptoren auf den KB-Zellen nach Vorbehandlung mit IFN γ untersucht. Neben geringen Veränderungen im Expressionsniveau von TRAILR1 und TRAILR2 zeigte sich eine beinahe vollständige Reduktion von TRAILR4 auf der Zelloberfläche nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit IFN γ (Abb. 8). Dies steht im Einklang mit Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass IFN γ die Zelloberflächen-Expression von TRAILR4 inhibiert und dessen proteolytische Degradation induziert (Wicovsky et al., 2005). Der Abbau von TRAILR4 nach IFN γ -Stimulation über das Proteasom wäre ein möglicher

Reduktionsweg, da die Stimulation mit IFN γ zu einer Verstärkung der proteolytischen Aktivität des Proteasoms führt (Groettrupp et al., 2001). Die unterschiedliche Sensibilität verschiedener Zellen gegenüber TRAILR1/2-vermittelter Apoptose und Selektivität für TRAIL-induzierte Apoptose in malignen Zellen wird unter anderem auch auf den protektiven Effekt der Decoy-Rezeptoren TRAILR3 und TRAILR4 zurückgeführt (Sheridan et al., 1997; Pan et al., 1998; Ashkenazi & Dixit, 1998). Der IFN γ -induzierte Abbau von TRAILR4 könnte somit Ursache einer Sensibilisierung von Zellen für TRAIL-vermittelte Apoptose sein. Da in den folgenden Untersuchungen aber spezifische TRAILR1- und TRAILR2-Antisera verwendet wurden, ist hier ein protektiver Effekt von TRAILR4 durch Depletion der TRAILR1/2-Antikörper im Sinne der klassischen Decoy-Rezeptor-Theorie ausgeschlossen. Ob die Bildung gemischter Rezeptorkomplexe oder die anderen in 1.3.2 beschriebenen Theorien eine Rolle spielen bedarf weiterer Klärung.

5.4 IFN γ verstärkt die TRAIL-induzierte Apoptose und NF κ B-Aktivierung

Hinsichtlich der TRAIL-induzierten Apoptose zeigte sich sowohl für TRAILR1 als auch für TRAILR2 analog zur Fas-vermittelten Apoptose, dass eine Behandlung der KB-Zellen mit IFN γ oder CHX ausreichend ist, um diese für TRAIL-induzierte Apoptose zu sensibilisieren (Abb. 9). Der in anderen Untersuchungen beobachtete synergistische Effekt von IFN γ und TRAIL hinsichtlich der Apoptoseinduktion (Merchant et al., 2004), konnte somit bestätigt werden. Ebenfalls analog zur Fas-vermittelten Apoptose konnte durch Caspase-Inhibition mittels zVAD-fmk (Abb. 9) oder stabiler Expression von Bcl2 (Abb. 11) die Induktion von Apoptose über TRAILR1 oder TRAILR2 in den KB-Zellen verhindert werden. Dies bestätigt erneut, dass KB-Zellen den Typ II Zellen zugeordnet werden müssen und dass Bcl2-GFP-exprimierende KB-Zellen zur Untersuchung der nicht-apoptotischen TRAIL-vermittelten Signaltransduktion geeignet sind. In den parentalen sowie in den transgenen KB-Zellen konnte eine vergleichbare Rezeptorexpression nachgewiesen werden, so dass die beobachtete Resistenz der KB-Bcl2-Zellen nicht auf eine veränderte Rezeptorexpression zurückgeführt werden kann (Daten nicht gezeigt).

Um herauszufinden, ob neben der synergistischen Wirkung von TRAIL und IFN γ hinsichtlich der apoptotischen Signaltransduktion auch ein möglicher gegenseitiger

Einfluss von TRAIL und $\text{IFN}\gamma$ hinsichtlich der nicht-apoptotischen Signaltransduktion existiert, wurden die KB-Zellen nun auf TRAILR1- und TRAILR2-vermittelte $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung hin untersucht. Hier zeigte sich besonders für TRAILR1 eine deutliche Verstärkung der IL8-Produktion nach Vorbehandlung mit $\text{IFN}\gamma$ (Abb. 12). Somit war klar geworden, dass $\text{IFN}\gamma$ nicht nur einen verstärkenden Effekt auf die TRAIL-induzierte Apoptose besitzt, sondern wiederum analog zur FasL-induzierten Signaltransduktion auch deutlichen Einfluss auf die nicht-apoptotische TRAILR1- und TRAILR2-vermittelte Signaltransduktion nimmt. Die TRAIL-induzierte $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung konnte durch den Schutz der Zellen vor Apoptose mittels zVAD-fmk oder durch Bcl2-Expression nochmals deutlich verstärkt werden (Abb. 10). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die TNF-induzierte $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung weder durch $\text{IFN}\gamma$ noch durch zVAD-fmk zu verstärken war (Abb. 10). Somit scheint die TRAIL-induzierte $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung eher dem Mechanismus der Fas-, als dem der TNF-induzierten $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung zu entsprechen.

Wie oben beschrieben wird $\text{IFN}\gamma$ wie auch TRAIL von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert. Die Verstärkung der apoptotischen TRAIL-Signaltransduktion durch $\text{IFN}\gamma$ steht in gutem Einklang mit der zytotoxischen Funktion dieser Zellen. Bcl2 und andere anti-apoptotische Mitglieder der Bcl2-Familie spielen bei der Entstehung hämopoetischer Krankheiten wie der akuten Promyelozyten-Leukämie (Kogan et al., 2001) und auch nicht-hämopoetischer maligner Erkrankungen wie dem Mamma-Carcinom eine Rolle (Jäger et al., 1997). Unter diesen pathophysiologischen Bedingungen, in denen die Apoptose durch Überexpression von Bcl2 inhibiert ist, führt das Zusammenwirken von TRAIL und $\text{IFN}\gamma$ jedoch zu einer massiven Verstärkung der nicht-apoptotischen TRAIL-Signaltransduktion. Das durch $\text{NF}\kappa\text{B}$ regulierte Zytokin IL8 besitzt neben seiner inflammatorischen Wirkung auch eine Angiogenese-fördernde Wirkung (Koch et al., 1992). Da Angiogenese und Tumorwachstum eng miteinander verbunden sind (Bergers & Benjamin, 2003), besteht die Möglichkeit, dass das Zusammenwirken von TRAIL und $\text{IFN}\gamma$ unter anti-apoptotischen Bedingungen sogar eine Tumorprogression begünstigt. So konnte z. B. gezeigt werden, dass TRAIL im Tiermodell die Metastasierung des humanen duktales Pankreas-Adenocarcinoms begünstigt (Trauzold et al., 2006).

5.5 TRAIL-induzierte I κ B α -Degradation und Kerntranslokation von NF κ B

In den vorherigen Versuchen wurde die TRAILR1- und TRAILR2-vermittelte nicht-apoptotische Signaltransduktion anhand des NF κ B-Zielgens IL8 untersucht. Die Induktion von IL8 benötigt eine Aktivierung von NF κ B, unterliegt aber auch der Steuerung durch andere induzierbare Signaltransduktionswege. So ist zu einer signifikanten Induktion von IL8 die Aktivierung von NF κ B und mindestens einer oder zweier MAP-Kinasen nötig (Hoffmann et al., 2002). Die entscheidenden Schritte bei der Aktivierung von NF κ B stellen die Degradation von I κ Bs durch das Proteasom und die anschließende Translokation von NF κ B in den Kern dar (s. 1.3.4.1). Hier zeigte sich, sowohl in den mit CHX als auch in den mit IFN γ behandelten Zellen, eine deutlich Abnahme des I κ B α -Signals im Western-Blot. Die Kinetik der TRAIL-induzierten I κ B α -Degradation gleicht der in einer anderen Untersuchung (Siegmond et al., 2005) dargestellten Fas-vermittelten I κ B α -Degradation und unterscheidet sich von der durch TNF-induzierten I κ B α -Degradation (Abb. 13). Dies bestätigt erneut die Beobachtung, dass der Mechanismus der TRAIL-induzierten nicht-apoptotischen Signaltransduktion dem der Fas-vermittelten ähnlich ist, sich aber von dem des Tumor Nekrose Faktors unterscheidet. Weiterhin bestätigte sich die im IL8-ELISA gemachte Beobachtung, dass die TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung unter nicht-apoptotischen Bedingungen und nach Vorbehandlung der KB-Zellen mit IFN γ ebenso effektiv wie die TNF-induzierte NF κ B-Aktivierung sein kann (Abb. 14).

5.6 Modulation der TRAIL-Rezeptor-vermittelten NF κ B-Aktivierung durch FLIP

Neben der inhibitorischen Wirkung von FLIP auf die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose, deuten neuere Studien auch auf eine Funktion bei der Regulation der nicht-apoptotischen Signaltransduktion hin. So konnte eine Inhibition der FasL- und TRAIL-induzierten NF κ B-Aktivierung durch die transiente Überexpression von FLIP nachgewiesen werden (Wajant et al., 2000). Weiterhin konnte eine inhibierende Funktion von FLIP bei der Fas-vermittelten NF κ B-Aktivierung in stabil-exprimierenden KB-FLIP_{L/S}-Zellen gezeigt werden (Kreuz et al., 2004). Andere Studien zeigen dagegen einen NF κ B-induzierenden Einfluss von FLIP (Kataoka et al., 2000). Dies deutet darauf hin, dass FLIP eine zentrale Funktion bei der Modulation der Todesrezeptor-vermittelten Signaltransduktion besitzt. Um einen genaueren Einblick in die

Wirkungsweise von FLIP bei der TRAIL-induzierten nicht-apoptotischen Signaltransduktion zu erlangen, wurde die TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung in stabil FLIP_{L/S}-exprimierenden KB-Zellen untersucht, die erwartungsgemäß gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose resistent waren und somit zur Untersuchung der TRAIL-induzierten NF κ B-Aktivierung geeignet sind (Daten nicht gezeigt).

Im Vergleich mit den parentalen, durch zVAD-fmk vor Apoptose geschützten Zellen, zeigte sich eine starke Suppression der TRAILR1- und TRAILR2-vermittelten IL8-Produktion sowohl in den FLIP_L- als auch den FLIP_S-exprimierenden KB-Zellen (Abb. 15). Die in einer früheren Studie mit transient überexprimiertem FLIP (Wajant et al., 2000) aufgefallene inhibitorische Wirkung von FLIP nicht nur auf die Todesrezeptor-vermittelte apoptotische Signaltransduktion, sondern auch auf die nicht-apoptotische Signaltransduktion, konnte somit bestätigt werden. Die Inhibition sowohl der TRAIL-induzierten NF κ B-Aktivierung als auch Apoptose durch die Expression von FLIP_{L/S} in den mit IFN γ -vorbehandelten KB-Zellen, deutet auf eine Regulation beider Signaltransduktionsmechanismen auf der Ebene des DISC hin.

In den weiter oben beschriebenen Untersuchungen war eine starke Abhängigkeit der TRAIL-induzierten Signaltransduktion in KB-Zellen von einer CHX- oder IFN γ -Vorbehandlung festgestellt worden. In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl CHX (Wajant et al., 2000), als auch IFN γ (Siegmond et al., 2005) die Expression von FLIP reduzieren können. Hierzu passt, dass die FLIP-Expression auf Protein Ebene durch proteasomalen Abbau reguliert wird (Kim et al., 2002) und IFN γ die proteolytische Aktivität des Proteasoms stimulieren kann (Groettrup et al., 2001). Somit wäre es möglich, dass die oben gezeigte IFN γ -bedingte Sensibilisierung von KB-Zellen für die TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung zumindest teilweise auf einem verstärkten proteasomalen Abbau von FLIP beruht.

Nachdem die inhibitorische Wirkung von sowohl stabil-exprimiertem FLIP_L als auch FLIP_S in KB-Zellen auf die TRAIL-induzierte nicht-apoptotische Signaltransduktion gezeigt werden konnte, sollte zusätzlich der Einfluss von endogen exprimiertem FLIP auf die nicht-apoptotische Signaltransduktion der TRAIL-Todesrezeptoren untersucht werden. Wie vermutet führte die Reduktion endogener FLIP-Moleküle durch FLIP-spezifische siRNA zu einer deutlich verstärkten TRAILR1- und TRAILR2-vermittelten IL8-Produktion, sowohl in den ungeschützten als auch in den mit zVAD-fmk vor

Apoptose geschützten KB-Zellen (Abb. 16). Wie bereits für die Behandlung der KB-Zellen mit IFN γ beschrieben, zeigte auch die Reduktion von endogenem FLIP keinerlei Auswirkung auf die TNF-induzierte IL8-Produktion. Des Weiteren konnte eine erhöhte basale NF κ B-Aktivität in den sowohl mit FLIP_{LS}-reduzierender siRNA-behandelten Zellen als auch in den mit nur FLIP_L-spezifischer siRNA behandelten KB-Zellen beobachtet werden, was die supprimierende Wirkung von FLIP auf die NF κ B-Aktivierung in KB-Zellen zusätzlich bestätigt.

6 Zusammenfassung

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass TRAIL neben der dominanten Funktion als Auslöser des apoptotischen Programms unter bestimmten Bedingungen auch eine starke Aktivierung nicht-apoptotischer Signalwege bewirken kann. Um die Mechanismen der TRAIL-induzierten nicht-apoptotischen Signaltransduktion genauer zu untersuchen, wurde in der hier vorliegenden Arbeit besonderes Augenmerk auf die TRAIL-vermittelte NF κ B-Aktivierung und deren Modulation durch IFN γ und FLIP gelegt.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung von KB-Zellen mit CHX oder IFN γ ausreichend ist, um diese sowohl für die TRAIL-induzierte apoptotische Signaltransduktion, als auch nicht-apoptotische Signaltransduktion zu sensibilisieren. TRAIL und IFN γ werden physiologisch von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen sezerniert und induzieren synergistisch die Auslösung des apoptotischen Programms. Hier konnte nun gezeigt werden, dass IFN γ besonders unter nicht-apoptotischen Bedingungen, die durch Caspase-Inhibition oder Bcl2-Expression erreicht wurden, auch eine synergistische Wirkung auf die TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung entfaltet. Eine IFN γ -Vorbehandlung der KB-Zellen bewirkte weiterhin die vollständige Reduktion des „Decoy“-Rezeptors TRAILR4, was ebenfalls zur Regulation der TRAIL-vermittelten Signaltransduktion in KB-Zellen beitragen könnte. Die Möglichkeit der Sensibilisierung der KB-Zellen für die TRAIL-induzierte Apoptose und NF κ B-Aktivierung durch CHX deutet auf einen kurzlebigen Inhibitor der TRAIL-vermittelten Signaltransduktion hin. Ein möglicher Kandidat hierfür ist das anti-apoptotisch wirkende FLIP, für das ein Einfluss auf die TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung gezeigt werden konnte und dessen Expression unter anderem durch IFN γ reguliert wird. In Versuchen zur Rolle von FLIP in der TRAIL-induzierten nicht-apoptotischen Signaltransduktion zeigte sich zusammenfassend sowohl in Versuchen mit FLIP_L- und FLIP_S-exprimierenden Zellen, als auch durch Reduktion von endogenem FLIP mittels siRNA eine inhibierende Wirkung von FLIP auf die TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung. Die Inhibition sowohl der TRAIL-Rezeptor-vermittelten Apoptose als auch der NF κ B-Aktivierung durch FLIP-Überexpression deutet auf eine gemeinsame Regulation beider Mechanismen auf der Ebene des DISC hin.

7 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
APS	Ammonium-Persulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
Bcl	B-Cell Lymphoma (Protein)
BH	Bcl Homologie (Domäne)
°C	Grad Celsius
Caspase	Cysteiny Aspartat-spezifische Protease
Cdc	Cell division cycle (Protein)
cDNA	komplementär DNA
CHX	Cycloheximid
CRD	Cysteine-Rich Domain
dATP	desoxy-Adenosin-Triphosphat
DcR	Decoy Receptor
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
DR	Death Receptor
DTT	Dithiothreitol
EDAR	Ectodysplasin A Receptor
EDTA	Ethylendiamin-Tetra-Essigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Essay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fetal Calf Serum
FADD	Fas-Associated Death Domain
FLICE	FADD-Like ICE
FLIP	FLICE-Inhibitory Protein
FLIP _L	FLIP-Long

FLIP _s	FLIP-Short
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde(n)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-Ethansulfonsäure
Hsp	Heat shock protein
HtrA2	High temperature requirement protein A2 (=Omi)
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICE	Interleukin-1beta-Converting Enzyme
IFN	Interferon
IKK	I κ B Kinase Komplex
I κ B	Inhibitor of NF κ B
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
MAP-Kinase	Mitogen-Activated Protein Kinase
min	Minute
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
NF κ B	Nuclear Factor kappaB
NGFR	Nerve Growth Factor Receptor
nm	Nanometer
nM	Nano-Molar
OPG	Osteoprotegerin
PA	Protein A
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
P LAD	Pre-Ligand Association Domain
RANK-L	Receptor Activator of NF κ B Ligand
RHD	Rel Homology Domain
RIP	Receptor-Interacting Protein
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat

Abkürzungen

siRNA	small interfering RNA
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspase (=DIABLO)
TACE	TNF α Converting Enzyme
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TE-PBS	Trypsin/EDTA-PBS
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TRAF	TNF Receptor Associated Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAILR	TRAIL-Rezeptor
U/min	Umdrehungen/Minute
V	Volt
Verd.	Verdünnung
WT	Wildtyp
XIAP	X-Chromosome-Linked Inhibitor of Apoptosis
zVAD-fmk	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-Fluoromethylketon

8 Literaturverzeichnis

Aggarwal BB, Shishodia S, Ashikawa K, Bharti AC. 2002. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. **1**(4):327-41.

Almasan A, Ashkenazi A . 2003. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. **14**:337-348.

Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. **281**(5381):1305-8.

Ashkenazi A., Pai R.C., Fong S., Leung S., Lawrence D.A., Marsters S.A., Blackie C., Chang L., McMurtrey A.E., Hebert A., DeForge L., Koumenis I.L., Lewis D., Harris L., Bussiere J., Koeppen H., Shahrokh Z., Schwall R.H. 1999. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*. **104**(2):155-62.

Baliga & Kumar. 2003. Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow. *Cell Death Differ*. **10**(1):16-8.

Barkett M, Xue D, Horvitz HR, Gilmore TD. 1997. Phosphorylation of IkappaB-alpha inhibits its cleavage by caspase CPP32 in vitro. *J Biol Chem*. **272**(47):29419-22.

Barnhart, B.C., Allapat, J.C., Peter, M.E. 2003. The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol*. **15**:185-193.

Bergers G, Benjamin LE. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. **3**(6):401-10.

Bernard D, Quatannens B, Vandebunder B, Abbadie C. 2001. Rel/NF-kappaB transcription factors protect against tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by up-regulating the TRAIL decoy receptor DcR1. *J Biol Chem*. **276**(29):27322-8.

Bernassola F, Scheuerpflug C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM, Melino G. 1999. Induction of apoptosis by IFNgamma in human neuroblastoma cell lines through the CD95/CD95L autocrine circuit. *Cell Death Differ*. **6**(7):652-60.

Black, RA, Rauch, CT, Kozlosky, CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP.et al. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**:729-733.

Bodmer JL, Meier P, Tschopp J, Schneider P. 2000. Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*. **275**(27):20632-7.

Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. **85**(6):803-15.

Borner, C. 2003. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*. **39**(11):615-47.

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 U S A*. **72**(9):3666-70.

Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*. **288**(5475):2351-4.

Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. 1997. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity*. **7**(6):821-30.

Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, Borden EC. 2003. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*. **8**(3):237-49.

Chen G, Cao P, Goeddel DV. 2002. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell*. **9**(2):401-10.

Cheng EH, Nicholas J, Bellows DS, Hayward GS, Guo HG, Reitz MS, Hardwick JM. 1997. A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**(2):690-4.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. **81**(4):505-12.

Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. 1997. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*. **7**(6):813-20.

Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. 2003. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*. **14**(3-4):193-209.

Devin A, Cook A, Lin Y, Rodriguez Y, Kelliher M, Liu Z. 1996. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*. **12**(4):419-29.

Emery J.G., McDonnell P., Burke M.B., Deen K.C., Lyn S., Silverman C., Dul E., Appelbaum E.R., Eichman C., DiPrinzio R., Dodds R.A., James I.E., Rosenberg M.,

Lee J.C., Young P.R. 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem.* **273**(23):14363-7.

Fanger N.A., Maliszewski C.R., Schooley K., Griffith T.S. 1999. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med.* **190**(8):1155-64.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* **16**:225-60.

Grell M., Douni E., Wajant H., Lohden M., Clauss M., Maxeiner B., Georgopoulos S., Lesslauer W., Kollias G., Pfizenmaier K., Scheurich P. 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* **83**(5):793-802

Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, Lynch DH, Kubin MZ. 1998. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol.* **161**(6):2833-40.

Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR, Fanger NA 1999. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med.* 1999. **189**(8):1343-54.

Griffith TS, Rauch CT, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Lynch DH, Smith CA, Goodwin RG, Kubin MZ. 1999. Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies. *J Immunol.* **162**(5):2597-605.

Groettrup M, van den Broek M, Schwarz K, Macagno A, Khan S, de Giuli R, Schmidtke G. 2001. Structural plasticity of the proteasome and its function in antigen processing. *Crit Rev Immunol.* **21**(4):339-58.

Gura T. 1997. How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science.* **277**(5327):768.

Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* **100**(1):57-70.

Hehlgans, T., Pfeffer, K. 2004. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* **115**(1):1-20

Helson L, Green S, Carswell E, Old LJ. 1975. Effect of tumour necrosis factor on cultured human melanoma cells. *Nature.* **258**(5537):731-2.

Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, Longnecker R, Kieff E, Rickinson A. 1991. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell.* **65**(7):1107-15.

- Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. **407**(6805):770-6.
- Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. 2002. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol*. **72**(5):847-55.
- Holen I, Croucher PI, Hamdy FC, Eaton CL. 2002. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res*. **62**(6):1619-23.
- Hu WH, Johnson H, Shu HB. 2000. Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8. *J Biol Chem*. **275**(15):10838-44.
- Hymowitz S.G., Christinger H.W., Fuh G., Ultsch M., O'Connell M., Kelley R.F., Ashkenazi A., de Vos A.M. 1999. Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol Cell*. **4**(4):563-71.
- Idriss, H.T., Naismith, J.H. 2000. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microscopy Res. and Tech*. **50**:184-195
- Igney FH, Krammer PH. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. **2**(4):277-88.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E., Tschopp, J. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. **388**(6638):190-5.
- Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*. **268**(15):10932-7.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*. **88**(3):347-54.
- Jager R, Herzer U, Schenkel J, Weiher H. 1997. Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice. *Oncogene*. **15**(15):1787-95.
- Joazeiro CA, Weissman AM. 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*. **102**(5):549-52.
- Kataoka T, Schroter M, Hahne M, Schneider P, Irmeler M, Thome M, Froelich CJ, Tschopp J. 1998. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol*. **161**(8):3936-42.
- Kataoka T, Budd RC, Holler N, Thome M, Martinon F, Irmeler M, Burns K, Hahne M, Kennedy N, Kovacsovics M, Tschopp J. 2000. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol*. **10**(11):640-8.

Kayagaki N., Yamaguchi N., Nakayama M., Takeda K., Akiba H., Tsutsui H., Okamura H., Nakanishi K., Okumura K., Yagita H. 1999. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol.* **163**(4):1906-13.

Kim Y, Suh N, Sporn M, Reed JC. 2002. An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem.* **277**(25):22320-9.

Kimberley FC, Screaton GR. 2004. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res.* **14**(5):359-72.

Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. 2000. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity.* **12**(6):611-20.

Koch AE, Poverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.* **258**(5089):1798-801.

Koga Y., Matsuzaki A., Suminoe A., Hattori H., Hara T. 2004. Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils. *Cancer Res.* **64**(3):1037-43.

Kogan SC, Brown DE, Shultz DB, Truong BT, Lallemand-Breitenbach V, Guillemin MC, Lagasse E, Weissman IL, Bishop JM. 2001. BCL-2 cooperates with promyelocytic leukemia retinoic acid receptor alpha chimeric protein (PMLRARalpha) to block neutrophil differentiation and initiate acute leukemia. *J Exp Med.* **193**(4):531-43.

Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. 2003. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* **7**(12):1166-73.

Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H. 2001. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol.* **21**(12):3964-73.

Kreuz S, Siegmund D, Rumpf JJ, Samel D, Leverkus M, Janssen O, Hacker G, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Scheurich P, Wajant H. 2004. NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol.* **166**(3):369-80.

Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. 2001. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem.* **276**(23):20633-40

Kuang AA, Diehl GE, Zhang J, Winoto A. 2000. FADD is required for DR4- and DR5-mediated apoptosis: lack of trail-induced apoptosis in FADD-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem.* **275**(33):25065-8.

- Lawrence D., Shahrokh Z., Marsters S., Achilles K., Shih D., Mounho B., Hillan K., Totpal K., DeForge L., Schow P., Hooley J., Sherwood S., Pai R., Leung S., Khan L., Gliniak B., Bussiere J., Smith C.A., Strom S.S., Kelley S., Fox J.A., Thomas D., Ashkenazi A. 2001. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med.* **7**(4):383-5.
- Lee HH, Dadgostar H, Cheng Q, Shu J, Cheng G. 1999. NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(16):9136-41.
- Li H., Zhu H., Xu C.J. Yuan, J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* **94**(4):491-501
- Liabakk N.B., Sundan A., Torp S., Aukrust P., Froland S.S., Espevik T. 2002. Development, characterization and use of monoclonal antibodies against sTRAIL: measurement of sTRAIL by ELISA. *J Immunol Methods.* **259**(1-2):119-28.
- Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, Liu ZG. 1999. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev.* **13**(19):2514-26.
- Lin Y, Devin A, Cook A, Keane MM, Kelliher M, Lipkowitz S, Liu ZG. 2000. The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of IkappaB kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Mol Cell Biol.* **20**(18):6638-45.
- Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J. 2001. The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell.* **104**:487-501
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* **94**(4):481-90.
- MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES. 1997. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem.* **272**(41):25417-20.
- MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, Cohen GM. 2002. Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem.* **277**(39):36611-6.
- Marsden V.S., Strasser A. 2003. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol.* **21**:71-105.
- Marshall WL, Yim C, Gustafson E, Graf T, Sage DR, Hanify K, Williams L, Fingerroth J, Finberg RW. 1999. Epstein-Barr virus encodes a novel homolog of the bcl-2 oncogene that inhibits apoptosis and associates with Bax and Bak. *J Virol.* **73**(6):5181-5.

Marsters S.A., Sheridan J.P., Pitti R.M., Huang A., Skubatch M., Baldwin D., Yuan J., Gurney A., Goddard A.D., Godowski P., Ashkenazi A. 1997. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol.* **7**(12):1003-6.

Mattson MP. 2000. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **1**(2):120-9.

Merchant MS, Yang X, Melchionda F, Romero M, Klein R, Thiele CJ, Tsokos M, Kontny HU, Mackall CL. Interferon gamma enhances the effectiveness of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor agonists in a xenograft model of Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* **64**(22):8349-56.

Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A. 1997. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science.* **278**(5339):860-6.

Mongkolsapaya J., Cowper A.E., Xu X.N., Morris G., McMichael A.J., Bell J.I., Screaton G.R. 1998. Lymphocyte inhibitor of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand): a new receptor protecting lymphocytes from the death ligand TRAIL. *J Immunol.* **160**(1):3-6.

Murphy M, Perussia B, Trinchieri G. 1988. Effects of recombinant tumor necrosis factor, lymphotoxin, and immune interferon on proliferation and differentiation of enriched hematopoietic precursor cells. *Exp Hematol.* **16**(2):131-8.

Pan G., O'Rourke K., Chinnaiyan A.M., Gentz R., Ebner R., Ni J., Dixit V.M. 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science.* **276**(5309):111-3.

Pan G., Ni J., Wei Y.F., Yu G., Gentz R., Dixit V.M. 1997. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science.* **277**(5327):815-8.

Park SY, Seol JW, Lee YJ, Cho JH, Kang HS, Kim IS, Park SH, Kim TH, Yim JH, Kim M, Billiar TR, Seol DW. 2004. IFN-gamma enhances TRAIL-induced apoptosis through IRF-1. *Eur J Biochem.* **271**(21):4222-8.

Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. 1996. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem.* **271**(22):12687-90.

Platt N, da Silva RP, Gordon S. 1998. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol.* **8**(9):365-72.

Rathmell JC, Thompson CB. 1999. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol.* **17**:781-828

Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, Zeng Q, Mookerjee B, Gelinas C, Fuchs EJ, Bedi A. 2001. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol.* **3**(4):409-16.

- Ravirajan CT, Pittoni V, Isenberg DA. 1999. Apoptosis in human autoimmune diseases. *Int Rev Immunol.* **18**(5-6):563-89.
- Ruiz-Ruiz C, Munoz-Pinedo C, Lopez-Rivas A. 2000. Interferon-gamma treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program. *Cancer Res.* **60**(20):5673-80.
- Reed J.C., Zha H., Aime-Sempe C., Takayama S., Wang H.G. 1996. Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death. *Adv Exp Med Biol* **406**:99-112
- Rothwarf DM, Karin M. 1999. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE.* 1999(5):RE1.
- Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.***16**(23):6914-25.
- Salvesen GS, Dixit VM. 1999. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(20):10964-7.
- Salvesen GS, Duckett CS. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**(6):401-10.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**(6):1675-87.
- Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem.* **274**(3):1541-8.
- Scherer DC, Brockman JA, Chen Z, Maniatis T, Ballard DW. 1995. Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(24):11259-63.
- Schmitz, I., Walczak, H., Krammer, P.H., Peter, M.E. 1999. Differences between CD95 type I and II cells detected with the CD95 ligand. *Cell Death Differ.* **6**(9):821-2.1999
- Schneider P, Tschopp J. 2000. Apoptosis induced by death receptors. *Pharm Acta Helv.* **74**(2-3):281-6.
- Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, Holler N, Tschopp J. 1997. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity.* **7**(6):831-6.
- Schultz DR, Harrington WJ Jr. 2003. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum.* **32**(6):345-69

Secchiero P, Milani D, Gonelli A, Melloni E, Campioni D, Gibellini D, Capitani S, Zauli G. 2003. Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TNF-alpha promote the NF-kappaB-dependent maturation of normal and leukemic myeloid cells. *J Leukoc Biol.* **74**(2):223-32.

Sedger LM, Shows DM, Blanton RA, Peschon JJ, Goodwin RG, Cosman D, Wiley SR. 1999. IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J Immunol.* **163**(2):920-6.

Sekine C, Yagita H, Kobata T, Hasunuma T, Nishioka K, Okumura K. 1996. Fas-mediated stimulation induces IL-8 secretion by rheumatoid arthritis synoviocytes independently of CPP32-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* **228**(1):14-20.

Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science.* **277**(5327):818-21.

Shipman CM, Croucher PI. 2003. Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Res.* **63**(5):912-6.

Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. 2000. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science.* **288**(5475):2354-7.

Siegmund D, Hausser A, Peters N, Scheurich P, Wajant H. 2001. Tumor necrosis factor (TNF) and phorbol ester induce TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) under critical involvement of NF-kappa B essential modulator (NEMO)/IKKgamma. *J Biol Chem.* **276**(47):43708-12.

Siegmund D, Wicovsky A, Schmitz I, Schulze-Osthoff K, Kreuz S, Leverkus M, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Wajant H. 2005. Death receptor-induced signaling pathways are differentially regulated by gamma interferon upstream of caspase 8 processing. *Mol Cell Biol.* **25**(15):6363-79.

Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell.* **76**(6):959-62.

Spanaus KS, Schlapbach R, Fontana A. 1998. TNF-alpha and IFN-gamma render microglia sensitive to Fas ligand-induced apoptosis by induction of Fas expression and down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL. *Eur J Immunol.* **28**(12):4398-408

Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H. 2000. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity.* **12**(6):599-609.

Sprick & Walczak, 2004. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. **1644**(2-3):125-32.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*. **67**:227-64.

Tang D, Lahti JM, Kidd VJ. 2000. Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. **275**(13):9303-7.

Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA Jr, Goeddel DV. 1991. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**(20):9292-6.

Trauzold A, Siegmund D, Schniewind B, Sipos B, Egberts J, Zorenkov D, Emme D, Roder C, Kalthoff H, Wajant H. 2006. TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*. **25**(56):7434-9.

Truneh A, Sharma S, Silverman C, Khandekar S, Reddy MP, Deen KC, McLaughlin MM, Srinivasula SM, Livi GP, Marshall LA, Alnemri ES, Williams WV, Doyle ML. Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *J Biol Chem*. **275**(30):23319-25.

Verhagen, A.M., Vaux, D.L. 2002. Cell Death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis*. **7**(2):163-6.

Wachter T, Sprick M, Hausmann D, Kerstan A, McPherson K, Stassi G, Brocker EB, Walczak H, Leverkus M. 2004. cFLIPL inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated NF-kappaB activation at the death-inducing signaling complex in human keratinocytes. *J Biol Chem*. **279**(51):52824-34.

Wajant H, Grell M, Scheurich P. 1999. TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. **10**(1):15-26.

Wajant H, Haas E, Schwenzer R, Muhlenbeck F, Kreuz S, Schubert G, Grell M, Smith C, Scheurich P. 2000. Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J Biol Chem*. **275**(32):24357-66.

Wajant H., Moosmayer D., Wuest T., Bartke T., Gerlach E., Schonherr U., Peters N., Scheurich P., Pfizenmaier K. 2001. Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene*. **20**(30):4101-6.

Wajant H. 2004. TRAIL and NFkappaB signaling--a complex relationship. *Vitam Horm*. **67**:101-32.

Walczak H., Degli-Esposti M.A., Johnson R.S., Smolak P.J., Waugh J.Y., Boiani N., Timour M.S., Gerhart M.J., Schooley K.A., Smith C.A., Goodwin R.G., Rauch C.T. 1997. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* **16**(17):5386-97.

Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH. 1999. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med.* **5**(2):157-63.

Wicovsky A, Siegmund D, Wajant H. 2005. Interferons induce proteolytic degradation of TRAILR4. *Biochem Biophys Res Commun.* **337**(1):184-90.

Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J. 2000. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* **14**(16):2060-71.

Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, et al. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* **3**(6):673-82.

Yagita H, Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Okumura K. 2004. TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. *Cancer Sci.* **95**(10):777-83.

Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, Kirk HE, Kay RJ, Israel A. 1998. Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell.* **93**(7):1231-40.

Danksagung

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

Weiterhin gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Claudia Sommer für die Erstellung des Zweitgutachtens, sowie dem Laborteam des Instituts für Molekulare Innere Medizin. Insbesondere danke ich hier Frau Dr. Daniela Siegmund, Herrn Dr. Frank Henkler, Herrn Dr. Andreas Wicovsky und Herrn Dr. Clemens Warnke für die kollegiale und anregende Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern und meiner Freundin Agnes, für deren große persönliche Unterstützung.

Lebenslauf

Jost-Julian Rumpf, geb. am 28.09.1979 in Göttingen

Schulbildung

1986 – 1992	Grundschule und Orientierungsstufe Dransfeld
1992 – 1996	Max-Planck-Gymnasium Göttingen
1996 – 1997	Crestview High-School, Florida, USA
1997 – 1999	Max-Planck-Gymnasium Göttingen

Wehrdienst

10/1999 – 07/2000	Sanitätsdienst bei der Marine in List + Eckernförde
-------------------	---

Hochschulbildung

2000 – 2007	Medizinstudium an der Universität Würzburg
08/2002	Physikum (Vorklinische Prüfung)
08/2003	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2006	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2006 – 2007	Praktisches Jahr in Schweinfurt, Würzburg und Edinburgh
05/2007	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Approbation

Promotion

2004 – 2007 Institut für Molekulare Innere Medizin, Würzburg; Publikation: Kreuz S, Siegmund D, Rumpf JJ, Samel D, Leverkus M, Janssen O, Häcker G, Dittrich-Breitholz O, Kracht M, Scheurich P, Wajant H. NF κ B activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. J Cell Biol. 2004 Aug 2; 166(3):369-380.

Beruflicher Werdegang

Seit 07/2007 Wissenschaftlicher Assistent an der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg

Würzburg, den 24.10.2007

 Jost-Julian Rumpf