

Entwicklung von TRAIL-Fusionsproteinen und ihre Wirkung auf Myelomzellen

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

vorgelegt von

Daniela Berg

aus

Esslingen am Neckar

Würzburg 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Professor Dr. H. Wajant

2. Gutachter: Professor Dr. R. Benz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

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

Würzburg, den

.....

(Daniela Berg)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1. November 2004 bis 1. Februar 2008 an der Medizinischen Poliklinik II in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Professor Dr. Wajant angefertigt.

Danksagung

Mein spezieller Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wajant. Seine sehr gute wissenschaftliche Betreuung, die anregenden Diskussionen und Ideen sowie die sehr gute Zusammenarbeit haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Benz für die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit als Zweitkorrektor zu begutachten.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Innere Medizin für die Unterstützung bei der praktischen Arbeit und für die gute Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt möchte ich besonders meinen Eltern und Geschwistern und natürlich DoDo für die Motivation und Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit danken.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	3
2. Summary	5
3. Einleitung	6
3.1 Die TNF-Ligandenfamilie und ihre Rezeptoren	6
3.1.1 Die TNF- Ligandenfamilie	6
3.1.2 Die TNF- Rezeptorfamilie	7
3.2 Der „TNF-related apoptosis inducing Ligand“ (TRAIL) und sein Potential für die Tumorthherapie	9
3.2.1 Der „TNF-related apoptosis inducing Ligand“ (TRAIL)	9
3.2.2 Die TRAIL-Todesrezeptoren: TRAILR1/DR4 und TRAILR2/DR5	9
3.2.3 Die TRAIL-Decoy-Rezeptoren: TRAILR3/DcR1, TRAILR4/ DcR2 und Osteoprotegerin	10
3.2.4 Die murinen TRAIL- Rezeptoren	11
3.2.5 Lösliches rekombinantes TRAIL, Transmembran-TRAIL und aggregiertes TRAIL besitzen unterschiedliche Bioaktivitäten	12
3.2.6 Die Bedeutung von TRAIL im Immunsystem	14
3.2.7 Der extrinsische und intrinsische Signalweg der Apoptose	15
3.2.8 Proinflammatorische Signalwege durch TRAIL	19
3.2.9 Das Multiple Myelom und TRAIL	19
3.3 Ziel der Arbeit	21
4. Material	22
4.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien	22
4.2 Antikörper und Antiseren	23
4.3 Plasmide	24
4.4 Eukaryotische Zelllinien	25
4.5 Medien für Bakterien	25
4.6 Prokaryontische Zellen	25
4.7 Fusionsproteine	25
4.8 Lösungen und Puffer	26
4.9 Oligonukleotide	27
4.10 Enzyme	27
5. Methoden	28
5.1 Klonierung der Fusionsproteine	28
5.1.1 Polymerase Chain Reaktion (PCR)	28
5.1.2 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung der DNA	28
5.1.3 Ligation und Transformation der DNA in One Shot ^R Top10 chemisch kompetente <i>E.</i> <i>colis</i>	29
5.1.4 Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien	29
5.1.5 Klonierungsstrategien der TRAIL-Fusionsproteine	29
5.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen	31
5.3 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen	31
5.4 Aufreinigung der Fusionsproteine	31
5.5 Herstellung der Zelllysate	32
5.6 Western-Blot	32
5.6.1 SDS-Page	32

5.6.2 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose	33
5.6.3 Immundetektion	33
5.6.4 Silberfärbung	33
5.7 Zytotoxizitätsassay	34
5.8 FACS-Färbungen	35
5.9 Crosslinken mit Bis(sulfosuccinimidyl)suberat	35
5.10 Analyse der rekombinanten Proteine durch Gelfiltration	36
6. Ergebnisse	37
6.1 Konstruktion von TRAIL-Varianten mit erhöhter Bioaktivität.....	37
6.1.1 Lösliches murines TRAIL ist selbst nach sekundärem Quervernetzen praktisch inaktiv	37
6.1.2 Die THD-Domäne von mTRAIL ist für die Rezeptorbindung nicht ausreichend	39
6.1.3 Die kovalente Stabilisierung der trimeren Struktur von mTRAIL vermittelt Rezeptorbindung und Crosslinking-abhängige Aktivität.....	42
6.1.4 Flag-TNC-hTRAIL besitzt eine höhere spezifische Bioaktivität als Flag-hTRAIL	49
6.2 Untersuchung proinflammatorischer Signalwege in TRAIL stimulierten Myelomzellen	53
6.2.1 Flag-hTNC-TRAIL induziert Apoptose, aber auch proinflammatorische Signalwege in Myelomzelllinien	53
6.2.2 Flag-TNC-hTRAIL induziert caspaseunabhängigen und caspasevermittelten Zelltod in Myelomzellen.....	59
7. Diskussion.....	62
7.1 Die spezifische Bioaktivität von löslichen trimeren Liganden der TNF-Familie wird durch ihre Fusion mit der TNC-Trimerisierungsdomäne verstärkt.....	62
7.2 TRAIL aktiviert im Multiplen Myelom proinflammatorische Signalwege.....	65
8. Literaturverzeichnis.....	68
9. Anhang	76
9.1 Die Protein- und Nukleotidsequenz des Fusionsproteins Flag-TNC-mTRAIL(99-291)	76
9.2 Die Protein- und Nukleotidsequenz des Fusionsproteins Flag-Linker-mTRAIL(99-291).....	78
9.3 Die Protein- und Nukleotidsequenz des Fusionsproteins Flag-mTRAIL(99-291)	80
9.4 Die Protein- und Nukleotidsequenz des Fusionsproteins Flag-TNC-hTRAIL(95-291)	82
9.6 Abkürzungsverzeichnis.....	84
9.7 Publikationen.....	88
9.8 Lebenslauf.....	89

1. Zusammenfassung

Lösliche humane TRAIL-Varianten (hTRAIL), die nur die "TNF homology domain" (THD) beinhalten, binden sowohl den TRAILR1 als auch den TRAILR2, stimulieren jedoch nur den TRAILR1. Nach sekundärem Quervernetzen des Liganden wird dann aber auch der TRAILR2 effektiv aktiviert. Entsprechende murine TRAIL-Varianten (mTRAIL) dagegen zeigen nur eine schwache Rezeptorbindung und sind selbst nach sekundärem Quervernetzen nur wenig aktiv. Interessanterweise kann ein Fusionsprotein aus der THD von mTRAIL und der Trimerisierungsdomäne von Tenascin-C (TNC), das wie mTRAIL selbst auch als Trimer vorliegt, effizient an TRAIL-Rezeptoren binden und nach sekundärem Quervernetzen den TRAILR2 gut stimulieren. Weiterhin kann eine mTRAIL-Variante, die neben der THD auch die Stammregion des Moleküls enthält, die die THD von der Transmembrandomäne trennt, nach sekundärem Quervernetzen Apoptose induzieren, jedoch nicht so effektiv wie das TNC-mTRAIL-Fusionsprotein. Die spezifische Bioaktivität der humanen TRAIL-Varianten wird gleichfalls, wenn auch weniger stark, durch Fusion mit der Tenascin-C-Trimerisierungsdomäne gesteigert. Die Fixierung des N-Terminus der THD, die hier durch die TNC-Domäne sonst jedoch durch die Stamm- oder Transmembrandomäne gewährleistet wird, könnte demnach für mTRAIL für eine gute Rezeptorbindung und effektive Apoptoseinduktion nötig sein. Dies deutet auf eine bisher nicht erkannte Rolle der Stammregion für die Aktivität dieser Liganden hin und bietet die Möglichkeit, rekombinante lösliche Liganden der TNF-Familie mit erhöhter Aktivität zu generieren. Die TRAIL-induzierte Apoptose kann für die Behandlung von Tumorzellen nützlich sein. Es wurde jedoch kürzlich gezeigt, dass TRAIL neben Apoptose auch proinflammatorische, d. h. potentiell tumorfördernde Signalwege, insbesondere in apoptose-resistenten Zellen induzieren kann. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern TRAIL solche Signalwege in Myelomzellen stimuliert. Oligomerisiertes TRAIL kann bei allen analysierten Zelllinien Caspasen aktivieren und Apoptose induzieren. Werden die Zelllinien mit dem pan-Caspaseinhibitor ZVAD behandelt, kann die Caspase-Aktivierung bei allen Zellen blockiert werden, die Apoptoseinduktion jedoch nur bei zwei Zelllinien. Im Gegensatz dazu schützt ZVAD drei andere Myelomzelllinien nur partiell vor der TRAIL-induzierten Apoptose. Dies zeigt, dass TRAIL in Myelomzellen auch caspaseunabhängigen Zelltod induzieren kann. TRAIL induziert in den

Myelomzellen auch proinflammatorische Signalwege wie den NFκB-, den JNK-, den p38- und den p42/44-Signalweg. Die Stimulation des JNK- und des p38-Signalwegs erwies sich hierbei in zelltypspezifischer Weise caspaseabhängig, die Aktivierung des NFκB- und p42/44-Signalwegs immer als caspaseunabhängig. Zusammenfassend geht aus diesen Ergebnissen hervor, dass zur Behandlung des multiplen Myeloms, TRAIL in Kombination mit anti-inflammatorisch wirkenden Mitteln eingesetzt werden sollte, insbesondere um mögliche proinflammatorische Nebenwirkungen durch TRAIL zu minimieren.

2. Summary

Variants of soluble human TRAIL (hTRAIL), encompassing solely the TNF-homology domain (THD), interact with TRAILR1 and TRAILR2, but they only stimulate TRAILR1 robustly. After crosslinking however, these ligands are also able to activate TRAILR2. Contrarily, the corresponding murine TRAIL variants poorly bind and activate their receptors even after crosslinking. Interestingly, a fusion protein consisting of the THD of mTRAIL and the trimerization domain of Tenascin-C (TNC) shows an effective receptor binding and TRAILR2 activation after crosslinking. A variant of mTRAIL that not only contains the THD, but also the stalk region, which separates the transmembrane-domain from the THD, does also induce apoptosis after crosslinking, but not as effective as the TNC-mTRAIL fusionprotein. The activity of soluble human TRAIL variants is also enhanced after fusion with TNC. It seems that especially for mTRAIL the spatial fixation of the THD by TNC is necessary for proper receptor binding and activation. This spatial fixation is otherwise ensured by the stalk region or the transmembrane-domain. So the stalk region has unanticipated functions for the activity of the TNF ligands. Moreover, there is now an option to generate soluble ligands of the TNF-family with improved activity.

TRAIL-induced apoptosis could be applied in the treatment of tumor cells. However, it was shown that TRAIL cannot only induce apoptosis, but also activates proinflammatory potentially tumor promoting pathways, especially in apoptosis resistant cells. Therefore, the ability of TRAIL to activate such pathways in myeloma cells was analyzed. Oligomerized TRAIL induces apoptosis and caspase activation in all analyzed myeloma cells. In experiments with the pan-caspase inhibitor ZVAD caspase activation could be blocked in all cell lines, but apoptosis could be blocked only in two cell lines. Three other myeloma cell lines were only marginally rescued from apoptosis. Therefore, TRAIL can also induce caspase independent cell death in myeloma cells. Beside apoptosis TRAIL also stimulates proinflammatory pathways like the NF κ B-, the JNK, the p38- and the p42/44- pathway. Thereby, the activation of the NF κ B- and p42/44-pathways is always caspase-dependent, but the induction of the p38- and JNK-pathways is cell type specifically caspase-dependent. Thus, taken together for myeloma therapy TRAIL should be used in combination with anti-proinflammatory drugs to avoid potential side effects related to the proinflammatory properties of TRAIL.

3. Einleitung

3.1 Die TNF-Ligandenfamilie und ihre Rezeptoren

3.1.1 Die TNF- Ligandenfamilie

Die TNF-Ligandenfamilie besteht aus bisher 19 identifizierten TypII Transmembranproteinen, die durch eine konservierte C-terminale Domäne, die „TNF homology domain“ (THD), charakterisiert sind. Die THD setzt sich aus 150 zum Teil konservierten aromatischen und hydrophoben Aminosäuren zusammen, wobei die Sequenzidentität unter den verschiedenen Mitgliedern 20 % - 30 % beträgt. Die THD ist auch für die Rezeptorbindung verantwortlich und vermittelt die Bildung von Trimeren. (Locksley et al. 2001; Bodmer et al. 2002). Zu den Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie gehören TNF, LT α , LT β , CD95L (APO-1L), CD27L, CD30L, OX40L, 4-1BBL, NGF, TRAIL (APO2L), TWEAK und RANKL. Die meisten dieser Liganden werden als Membranproteine exprimiert (Locksley et al. 2001; Bodmer et al. 2002). Jedoch können in einigen Fällen auch lösliche Liganden durch Metalloprotease-vermittelte Spaltung der membranständigen Form entstehen. Einige Metalloproteasen der ADAM („a disintegrin and metalloproteinase domain“)-Familie spalten zum Beispiel TNF und RANKL (Black et al. 1997; Lum et al. 1999), und Matrilysin CD95L (Powell et al. 1999). LT α dagegen wird entweder direkt als Homotrimer sekretiert oder es bildet einen membranständigen heterotrimeren Komplex mit LT β (Browning et al. 1995; Bodmer et al. 2002).

Die Liganden der TNF-Familie sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (Locksley et al. 2001; Bodmer et al. 2002). So vermitteln TNF, LT α , LT β und RANKL wichtige Signale für die Morphogenese sekundärer lymphatischer Organe (Fu and Chaplin 1999; Locksley et al. 2001; Bodmer et al. 2002). Die Aktivierung von Immunvorläuferzellen zu kompetenten Effektorzellen sind ebenso von verschiedenen Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie abhängig: BAFF und CD40L sind für die Entwicklung und Aktivierung von B-Lymphozyten (Vogel and Noell 1998; Mackay et al. 1999; Bodmer et al. 2002), 4-1BBL, OX40L und CD27L für T-Lymphozyten (Gravestain and Borst 1998; Bodmer et al. 2002) und CD40L und RANKL für dendritische Zellen wichtig (Anderson et al. 1997,

Bodmer et al. 2002). Proapoptotische Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie wie TNF, CD95L und TRAIL unterstützen die Funktion von zytotoxischen Zellen des Immunsystems und sind auch an der Homöostase des lymphoiden Kompartiments beteiligt, indem sie zum Beispiel den „activation-induced cell death“ von Immun-Effektorzellen induzieren (Krammer 2000; Bodmer et al. 2002).

3.1.2 Die TNF- Rezeptorfamilie

Bis heute umfasst die TNF-Rezeptorfamilie 29 Mitglieder (Bodmer et al. 2002). Die bekanntesten Mitglieder sind: TNFR1 (p60, CD120a), TNFR2 (p80, CD120b), CD95 (Apo1, Fas), LT β R, CD27, CD30, OX40, 41BB, DR3, DR6, DcR3, NGFR, die fünf TRAIL-Rezeptoren (TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4 und OPG) und RANK. Davon sind die meisten Typ1-Transmembranproteine (Locksley et al. 2001; Bodmer et al. 2002). Ausnahmen sind zum Beispiel TRAILR3, der durch ein C-terminales Glykolipid an der Membran verankert ist (Degli-Esposti et al. 1997), und OPG und DcR3, welche ausschließlich als lösliche Rezeptoren vorkommen (Emery et al. 1998; Bodmer et al. 2002). Lösliche Rezeptoren können auch durch proteolytische Prozessierung (zum Beispiel CD27, CD30, CD40, TNFR1 und TNFR2) oder durch alternatives Spleißen des Exons, das die Transmembrandomäne kodiert (zum Beispiel CD95 und 41BB), entstehen (Bodmer et al. 2002).

In der extrazellulären Domäne tragen die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie charakteristischerweise bis zu 6 Kopien einer konservierten cysteinreichen Domäne (CRD), von denen jede typischerweise drei Disulfidbrücken aufweist (Naismith and Sprang 1998; Locksley et al. 2001; Bodmer et al. 2002)

Da die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie keine intrinsischen katalytischen Eigenschaften besitzen, benötigen sie zytoplasmatische Adaptormoleküle, um ihre Funktion erfüllen zu können. Durch Sequenzvergleiche der intrazellulären Domänen von CD95 und TNFR1 konnte ein homologer Abschnitt von ca. 80 Aminosäuren identifiziert werden. Diese Region wurde als Todesdomäne (DD) bezeichnet, da sie essentiell an der apoptotischen Signaltransduktion beteiligt ist (Itoh and Nagata 1993; Tartaglia et al. 1993). Neben CD95 und TNFR1 besitzen auch TRAILR1, TRAILR2, DR3, DR6 und der NGFR eine Todesdomäne (Bodmer et al. 2002). Die Funktion der DD-Rezeptoren besteht vor allem in der über DD-Adaptorproteine vermittelte Übertragung apoptotischer Signale. Die TNF-Rezeptoren ohne DD, auch als Nicht-

Todesrezeptoren bezeichnet, nutzen die Mitglieder der TRAF-Familie als Adapterproteine (Locksley et al. 2001). Bei diesen Rezeptoren konnten keine Homologien im intrazellulären Bereich gefunden werden. Die Funktionen dieser Rezeptoren sind unterschiedlich.

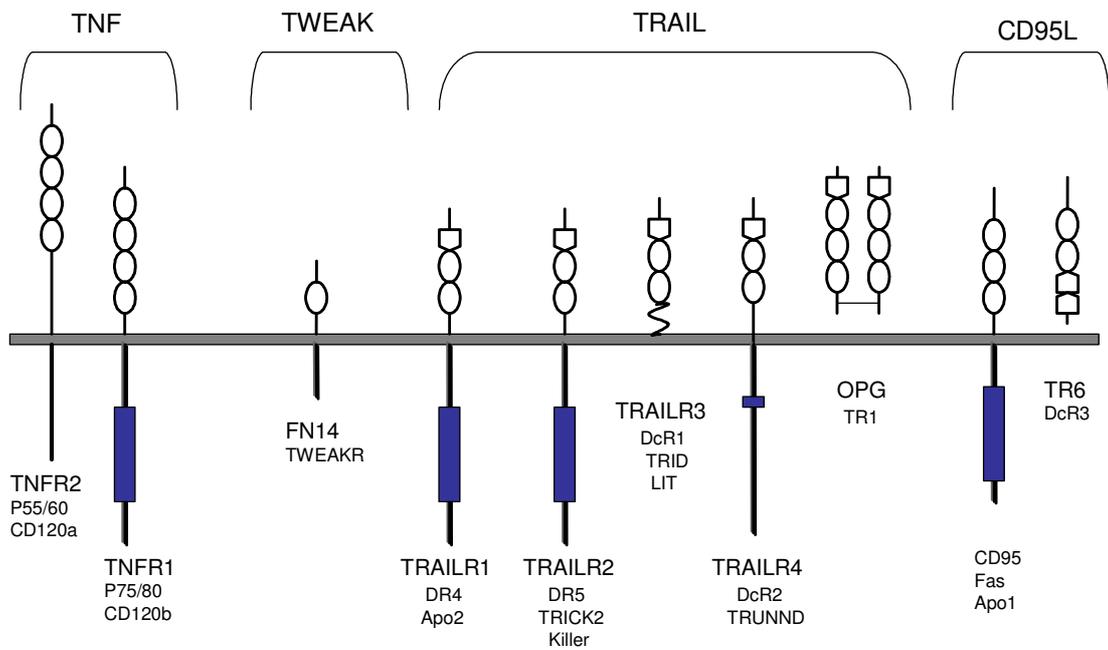


Abbildung 1: Die Interaktion einiger Mitglieder der TNF-Rezeptorsuperfamilie mit ihren korrespondierenden Liganden

3.2 Der „TNF-related apoptosis inducing Ligand“ (TRAIL) und sein Potential für die Tumorthherapie

3.2.1 Der „TNF-related apoptosis inducing Ligand“ (TRAIL)

TRAIL (Apo2L) wurde 1995 aufgrund seiner Sequenzhomologie zu CD95L (28% Identität) und TNF α (23% Identität) identifiziert (Wiley et al. 1995; Pitti et al. 1996; LeBlanc and Ashkenazi 2003). Dieses damals neue Zytokin erhielt große Aufmerksamkeit, da es bei einer großen Anzahl von Krebszellen Apoptose auslöst, nicht aber bei normalen Zellen (Walczak et al. 1999; Ashkenazi et al. 1999).

Humanes TRAIL wird als TypII-Transmembranprotein exprimiert und besteht aus 281 Aminosäuren mit einer kurzen N-terminalen zytoplasmatischen Domäne (17 Aminosäuren) und einer langen C-terminalen extrazellulären Rezeptorbindungsdomäne (Aminosäuren 114-281). Das humane TRAIL-Gen befindet sich auf Chromosom 3 an der Position 3q26. Das entsprechende Protein besitzt eine molekulare Masse von 32,5 kDa (Wiley et al. 1995; Pitti et al. 1996). Wie bei TNF α und CD95L kann der C-terminale Teil von TRAIL unter bestimmten Bedingungen durch eine Protease von der Membran abgespalten werden (Bodmer et al. 2002). In Lösung bildet lösliches TRAIL Homotrimere, welche an Position 230 durch einen Cysteinrest stabilisiert werden. Dieses ist mit einem divalenten Zinkion koordiniert. Das Zinkion ist für die Stabilität und zytotoxische Aktivität des TRAIL-Proteins nötig (Bodmer et al. 2000; Hymowitz et al. 2000). Lösliches, trimeres TRAIL induziert weder in humanen noch in Hepatozyten aus Javaneraffen eine signifikante Apoptose. Im Gegensatz dazu ist aggregiertes oder quervernetztes TRAIL für diese Zellen toxisch (Ashkenazi et al. 1999; Walczak et al. 1999; Lawrence et al. 2001; LeBlanc and Ashkenazi 2003).

Die TRAIL-mRNA wird konstitutiv in den meisten normalen menschlichen Geweben exprimiert, wobei die Proteinexpression auf die Immunzellen beschränkt zu sein scheint. Zu diesen zählen T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, dendritische Zellen und Neutrophile (Kelley and Ashkenazi 2004).

3.2.2 Die TRAIL-Todesrezeptoren: TRAILR1/DR4 und TRAILR2/DR5

Im Menschen sind fünf verschiedene TRAIL-Rezeptoren bekannt: TRAILR1 (DR4), TRAILR2 (DR5, APO2, Killer, TRICK2), TRAILR3 (DcR1, TRID, LID), TRAILR4 (DcR2, TRUNDD) und Osteoprotegerin (OPG) (Kelley and Ashkenazi 2004). Der erste TRAIL-

Rezeptor, der identifiziert wurde, war TRAILR1 (Pan et al. 1997). Er wurde anhand von Sequenzvergleichen zwischen „expressed Sequenz-Tags“ (ESTs) in öffentlichen und privaten Sequenz-Bibliotheken und bekannten Sequenzen anderer Todes-rezeptoren wie CD95 und TNFR1 identifiziert. Ein Teil seiner zytoplasmatischen Region zeigte eine signifikante Homologie zur „death domain (DD)“. Wie die anderen Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie besitzt TRAILR1 cysteinreiche Domänen (CRD) im extrazellulären Teil des Proteins, welche für die Bindung des entsprechenden Liganden benötigt werden (Pan et al. 1997).

Ungefähr zur gleichen Zeit wie TRAILR1 wurde auch TRAILR2 beschrieben (Walczak et al. 1997). TRAILR1 und TRAILR2 können beide bei Bindung von TRAIL Apoptose induzieren. Es existieren zwei alternative Spliceformen von TRAILR2, nämlich TRAILR2a und TRAILR2b. Diese unterscheiden sich in 23 Aminosäuren zwischen ihrer Transmembrandomäne und dem Beginn der ersten CRD. Funktionell sind keine Unterschiede zwischen den beiden Isoformen bekannt (Screaton et al. 1997; Kimberley and Screaton 2004).

Zwischen TRAILR2 und dem Status des Tumorsuppressorgens p53 gibt es einen Zusammenhang. Mutationen im Gen für den Transkriptionsfaktor p53 kommen bei über 50% aller humanen Krebsarten vor. Dieser Transkriptionsfaktor kontrolliert wichtige Stationen im Zellzyklus und kann über den mitochondrialen Weg Apoptose auslösen. Außerdem wird durch UV-Strahlung die Expression des TRAILR2 p53-abhängig verstärkt (Wu et al. 1997; Burns et al. 2001).

3.2.3 Die TRAIL-Decoy-Rezeptoren: TRAILR3/DcR1, TRAILR4/ DcR2 und Osteoprotegerin

Die Decoy-Rezeptoren TRAILR3 und TRAILR4 können beide TRAIL binden, aber keine Apoptose auslösen (Degli-Esposti 1999).

TRAILR3 ist mit einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an der Membran verankert und besitzt eine große Homologie zur extrazellulären Domäne von TRAILR1 und TRAILR2 (Degli-Esposti et al. 1997). Transkripte von TRAILR3 sind hauptsächlich auf peripheren Blutlymphozyten zu finden (Kimberley and Screaton 2004). Die Fähigkeit, intrazelluläre Signale weiterzuleiten, fehlt diesem Rezeptor, da er keine intrazelluläre Domäne besitzt. Eine mögliche Funktion als Decoy-Rezeptor konnte in Überexpressionsstudien gezeigt werden (Kimberley and Screaton 2004).

TRAILR4 wird in sehr vielen Geweben exprimiert. Ihm fehlen 52 der 76 Aminosäuren, welche die Todesdomäne kodieren (Degli-Esposti et al. 1997; Marsters et al. 1997; Kimberley and Screaton 2004). Deshalb kann auch dieser Rezeptor keine Apoptose induzieren. Wie TRAILR3 wirkt auch TRAILR4 als Decoy-Rezeptor. Bei Überexpression von TRAILR4 kommt es zur NF κ B-Aktivierung, was zur verstärkten Expression einiger antiapoptotischer Gene führt. Dies könnte auch ein Weg sein, Zellen vor TRAIL-induzierter Apoptose zu schützen (Degli-Esposti et al. 1997).

Der fünfte TRAIL-Rezeptor ist Osteoprotegerin (OPG), der einzige lösliche Rezeptor für TRAIL (Emery et al. 1998). OPG ist als Regulator der Entwicklung und Aktivierung von Osteoklasten bei der Knochenbildung bekannt. Dabei bindet der OPG-Ligand (auch RANKL genannt) an RANK und stimuliert die Osteoklastogenese (Kimberley and Screaton 2004). *In vitro* ist bei physiologischen Temperaturen (37°C) die Affinität von OPG für TRAIL deutlich schwächer als die von TRAILR1/R2/R3/R4. Bis jetzt ist noch unbekannt, ob die OPG-TRAIL-Interaktion physiologisch relevant ist oder nicht (Emery et al. 1998; Kimberley and Screaton 2004).

Da TRAIL eine wichtige Rolle in der körpereigenen Tumorbekämpfung spielt, kann der Verlust oder die funktionelle Inaktivierung von TRAILR1 und oder TRAILR2 einen Vorteil für das Tumorstadium bedeuten. Zum Beispiel wird der Verlust des Chromosomenabschnitts 8q21-22, der Locus von TRAILR1-4, oft bei Lungenkrebs beobachtet (Wistuba et al. 1999).

3.2.4 Die murinen TRAIL- Rezeptoren

Die Maus besitzt nur einen TRAIL-Todesrezeptor (mTRAIL-Rezeptor, mDR5, MK), das Homolog zum humanen TRAILR2. Wie die humanen TRAIL-Todesrezeptoren besitzt der mTRAIL-Rezeptor extrazelluläre CRDs, welche für die Ligandenbindung benötigt werden, und eine zytosolische DD, die wiederum der Apoptoseinduktion dient. Der murine TRAIL-Todesrezeptor ist dem TRAILR2 ähnlicher als dem TRAILR1 (79% gegen 76%) und bindet sowohl humanes als auch murines TRAIL. Wie auch der humane TRAILR2 kann auch er durch p53-Aktivierungen transkriptionell induziert werden (Wu et al. 1999). Kürzlich wurden zwei murine Decoy-Rezeptoren beschrieben (mDcTRAILR1 und mDcTRAILR2). Ob diese beiden murinen TRAIL-Rezeptoren *in vivo* als Decoy- Rezeptoren wirken, muss noch näher untersucht werden. Der mDcTRAILR1 bindet nur murines TRAIL, der mDcTRAILR2 dagegen humanes und murines TRAIL.

Da der mDcTRAILR2 sehr homolog zum mDcTRAILR1 ist, muss die unterschiedliche Binfefähigkeit der beiden Rezeptoren an unterschiedlichen Aminosäureresten in ihren CRDs liegen (Schneider et al. 2003).

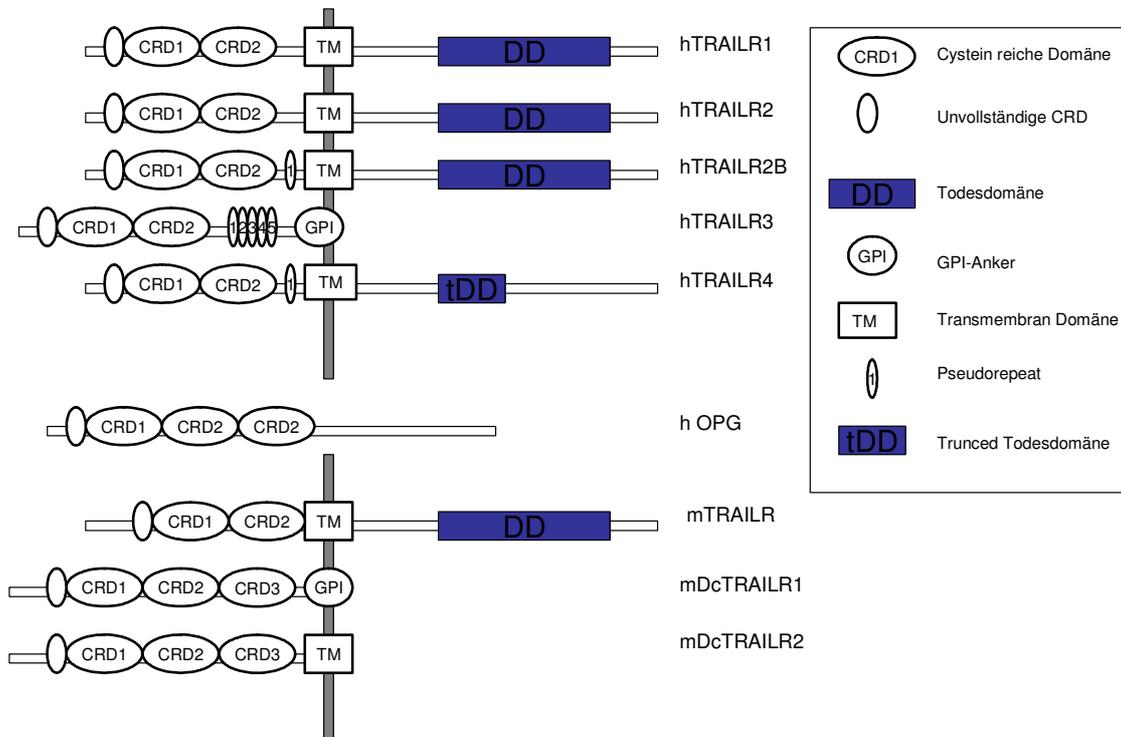


Abbildung 2: Der Aufbau der verschiedenen humanen und murinen TRAIL Rezeptoren

3.2.5 Lösliches rekombinantes TRAIL, Transmembran-TRAIL und aggregiertes TRAIL besitzen unterschiedliche Bioaktivitäten

TRAIL zieht ein besonderes Interesse auf sich, da rekombinantes trimeres lösliches TRAIL für viele Tumorzelllinien toxisch ist, nicht aber für die Mehrzahl normaler Zellen. Besonders wichtig ist, dass trimeres, lösliches TRAIL von Mäusen, Javaneraffen und Schimpansen gut vertragen wird und nicht mit starken Nebenwirkungen wie zum Beispiel Hepatotoxizität verbunden ist (Ashkenazi et al. 1999; Walczak et al. 1999). Bei nichttransformierten Zellen wird die Apoptoseinduktion durch lösliches TRAIL wahrscheinlich durch anti-apoptotische Moleküle (zum Beispiel FLIP, IAPs) oder die TRAIL-Decoy-Rezeptoren, welche bei Tumorzellen abwesend oder nur wenig aktiv

sind, verhindert (Almasan and Ashkenazi 2003). Bei sekundär aggregierten Komplexen von löslichen TRAIL-Trimeren oder bei Membran-TRAIL geht dieser „tumorselektive“ Effekt jedoch verloren (Almasan and Ashkenazi 2003). Zum Beispiel induzieren bakteriell produziertes, lösliches TRAIL, das aggregiert, und Membran-TRAIL starke Apoptose in humanen Hepatozyten und Lebererkrankungen bei Mäusen (Lawrence et al. 2001). Die unterschiedlichen Bioaktivitäten der verschiedenen TRAIL-Varianten sind ebenfalls bei primären Kulturen von normalen Keratinozyten, Endothelzellen oder Astrozyten zu beobachten. Diese sind resistent gegenüber löslichem trimerem TRAIL, können aber durch Membran-TRAIL oder aggregiertes lösliches TRAIL in die Apoptose gehen (Voelkel-Johnson et al. 2002; Almasan and Ashkenazi 2003). Demnach besitzt lösliches trimeres TRAIL eine deutlich schwächere Bioaktivität als Membran-TRAIL oder aggregiertes TRAIL. Dies ist wahrscheinlich eine Folge der differentiellen Aktivierung der TRAIL-Todesrezeptoren TRAILR1 und TRAILR2. Während lösliches, trimeres TRAIL in erster Linie TRAILR1 aktiviert, stimulieren Membran-TRAIL und aggregiertes, lösliches TRAIL sowohl TRAILR1 als auch TRAILR2 (Mühlenbeck et al. 2000; Wajant et al. 2001). Die toxischen Nebeneffekte dieser Reagenzien auf normale Zellen, wie z.B. Hepatozyten, können daher von einer starken Aktivierung von TRAILR2 herrühren, die bei dem „sicheren“ streng trimeren löslichen TRAIL nicht auftritt. Außerdem wird vermutet, dass aggregierte Präparationen von löslichem TRAIL bei der Induktion von supra-aggregierten TRAIL-Todesrezeptorenkomplexen effizienter sind als nicht-aggregierte lösliche TRAIL-Trimere. Deshalb können diese Varianten die Schutzmechanismen normaler Zellen überwinden und Apoptose auslösen (Almasan and Ashkenazi 2003). Um die Bioaktivität von löslichem trimerem TRAIL zu steigern, wurden verschiedene Methoden entwickelt. Einerseits können solche schwach aktiven, löslichen TRAIL-Trimere durch sekundäre Multimerisierung (z.B. durch sekundäres Quervernetzen mit einem spezifischen Antikörper) in eine aktivere Form überführt werden (Wajant et al. 2001; Almasan and Ashkenazi 2003). Andererseits wurde die Methode der „Zelloberflächenimmobilisierung“ entwickelt (Wajant et al. 2001; Samel et al. 2003). Hierfür werden trimere TRAIL-Fusionproteine mit einem Antikörperfragment, welches ein Zelloberflächenantigen bindet, hergestellt. Die Bindung dieser modifizierten Trimere an das Antigen, also die Immobilisation der Fusionsproteine an der Zelloberfläche, führt zu einer effizienten Aktivierung von TRAILR2, die sonst nur von aggregiertem TRAIL oder Membran-TRAIL ausgelöst wird. Die Methode der Zelloberflächenimmobilisierung gewährleistet so eine tumornahe und tumorselektive Aktivierung des TRAILR2 (Bremer et al. 2004; Bremer et al. 2005).

3.2.6 Die Bedeutung von TRAIL im Immunsystem

TRAIL wird von vielen Immunzellen in einer stimulationsabhängigen Weise exprimiert. Nach Stimulation mit LPS oder IFN β exprimieren Monozyten zum Beispiel lösliches TRAIL oder Membran-TRAIL und zeigen zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen (Halaas et al. 2000; Ehrlich et al. 2003). Nach Stimulation von dendritischen Zellen (DC) mit IFN β wird auch bei diesen Zellen die TRAIL-Expression induziert. Die Zytotoxizität dieser Zellen gegenüber Tumorzellen wird dadurch verstärkt (Liu et al. 2001). TRAIL ist zusammen mit CD95L und Perforin hauptsächlich für die zytotoxischen Effekte von T-Zellen verantwortlich. Nach der Stimulation mit TypI-Interferonen kommt es auch bei diesen Zellen zur TRAIL-Expression (Kayagaki et al. 1999).

Die erste *in vivo* Demonstration einer Rolle von TRAIL bei Virusinfektionen erfolgte 2001. Mäuse, die mit dem Encephalomyokarditis Virus (EMCV) infiziert wurden, zeigten einen höheren Virustiter und verstarben früher, wenn sie mit TRAIL-blockierenden Reagenzien behandelt wurden (Sato et al. 2001). TypI- und TypII-Interferone sind hierbei die Hauptmediatoren, indem sie die TRAIL-Expression auf Immunzellen induzieren und gleichzeitig TRAIL-resistente Zellen für TRAIL sensitivieren (Sato et al. 2001).

Vor einiger Zeit wurde gezeigt, dass TRAIL auch Autoimmunerkrankungen abschwächen kann. Charakteristisch für Autoimmunerkrankungen ist eine „fehlinterpretierte“ Erkennung von Eigenantigenen durch das Immunsystem. In diesem Zusammenhang sind autoreaktive T-Zellen besonders gefährlich. Sie greifen körpereigene Zellen an und lösen eine Immunantwort aus, ohne dass eine akute Infektion besteht. Studien mit TRAIL-blockierenden Antikörpern und TRAIL-defizienten Mäusen zeigten, dass die Blockade von TRAIL zur Verstärkung von Krankheits-syndromen bei Autoimmunerkrankungen führt. TRAIL verhindert die Ausbreitung der Krankheit durch Inhibition der autoreaktiven Immunantwort (Hilliard et al. 2001; Lamhamedi-Cherradi et al. 2003; Cretney et al. 2005).

Der erste Hinweis, dass TRAIL eine tumorinhibierende Wirkung besitzt, basierte darauf, dass lösliches rekombinantes TRAIL ein reduziertes Tumorstadium bei TRAIL-sensitiven Tumormodellen in SCID Mäusen bewirkt (Ashkenazi et al. 1999; Walczak et al. 1999). Sedger et al. zeigten später, dass ein Tumortransplantat eines B-Zell Lymphoms in Abwesenheit von TRAIL schneller wächst und mehr Lebermetastasen bildet (Sedger et al. 2002). Cretney et al. fanden ebenfalls ein erhöhtes Tumorstadium und erhöhte Metastasenbildung bei TRAIL-defizienten Mäusen oder

bei Mäusen, welche mit TRAIL-neutralisierenden Antikörpern behandelt wurden (Cretney et al. 2002; Seki et al. 2003).

Neben den oben beschriebenen antitumoralen Eigenschaften kann TRAIL insbesondere bei apoptoseresistenten Zellen auch die Fähigkeit besitzen, die Metastasenbildung zu unterstützen. Dies ist zum Beispiel bei Pankreastumoren, welche BclxL überexprimieren, der Fall. Hier induziert TRAIL einen Anstieg der Zahl und des Volumens der Metastasen in einem Tumormodell in Nacktmäusen. Dieser Effekt korreliert mit einer verstärkten Produktion von IL-8 und des „monozyte chemoattractant protein“ (MCP). Es ist daher wichtig, bei der Planung von Therapien zu berücksichtigen, dass TRAIL auch die Metastasierung unterstützen kann (Trauzold et al. 2006).

3.2.7 Der extrinsische und intrinsische Signalweg der Apoptose

Nach der Bindung von TRAIL an seine Todesrezeptoren kommt es zu deren Oligomerisierung und zur Generierung des apoptoseinduzierenden Signals in die Zelle. Ähnlich wie bei der CD95- und TNF-induzierten Apoptose, werden bei der TRAIL-induzierten Apoptose „cystein-abhängige, asparat-spezifische Proteasen“ (Caspasen) prozessiert (LeBlanc and Ashkenazi 2003; Debatin and Kramer 2004). Das „Fas-associated DD protein“ FADD ist sowohl am TRAILR1 als auch am TRAILR2 als Adapter für die Caspase-8-Rekrutierung nötig (LeBlanc and Ashkenazi 2003). FADD ist ein kleines Adapterprotein, welches aus 208 Aminosäuren besteht und zwei verwandte Protein-Protein-Interaktions-Domänen besitzt. Die DD-Domäne von FADD interagiert direkt mit der DD-Domäne von CD95, TRAILR1 und TRAILR2. Mit seiner zweiten Protein-Protein-Interaktions-Domäne, der „death effector domain“ (DED), rekrutiert FADD die Procaspase-8 in den DISC von TRAILR1 und TRAILR2. Der so entstandene Procaspase-8 aktivierende Rezeptorsignalkomplex wird als „death inducing signaling complex“ (DISC) bezeichnet (Walczak et al. 2006). Das „induced proximity“-Modell erklärt die Aktivierung der apikalen Caspasen mit Hilfe ihrer basalen Aktivität. Werden im DISC zwei Procaspase-8-Monomere in enge räumliche Nähe gebracht, ist deren niedrige basale Aktivität ausreichend, die benachbarte Procaspase proteolytisch zu spalten und so vollständig zu aktivieren (Salvesen and Dixit 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Procaspase-8 schon durch die Dimerisierung und die damit verbundene Konformationsänderung aktiviert wird (Boadright et al. 2003). Demnach

dient die interne proteolytische Spaltung nicht primär der Aktivierung selbst, sondern der Stabilisierung der aktiven Dimere (Boadright et al. 2003). Der DISC begünstigt die Dimerisierung der monomeren apikalen Caspasen, die unter physiologischen Bedingungen anders als die Effektorcaspasen keine Dimere bilden (Boadright et al. 2003). Die Rekrutierung der monomeren Procaspase-8 an den DISC gewährleistet über die Interaktion der DEDs eine hohe Konzentration von Procaspase-8 am DISC und so die Entstehung aktiver Dimere, die durch autoproteolytische Prozessierung zur reifen heterotetrameren Form des Enzyms umgesetzt werden. Die prozessierte heterotetramere Caspase-8 wird aus dem DISC freigesetzt und aktiviert dann Effektorcaspasen (Walczak et al. 2006). Diese spalten verschiedene zelluläre Substrate wie Poly-(ADP-ribose)-polymerase, Lamine oder Cytokeratine und vermitteln so den eigentlichen Zelltod (Walczak et al. 2006). Ein anderes Substrat der aktiven Caspase-8 ist das „BH3-only protein“ Bid, ein Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie, das den rezeptorvermittelten extrinsischen mit dem mitochondrialen intrinsischen Signalweg der Apoptose verbindet (Sprick and Walczak 2004). Nach der Spaltung von Bid durch die Caspase-8 entsteht „truncated Bid“ (tBid), das zum Mitochondrium transloziert und dort die Aggregation der proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bax und Bak bewirkt. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom c und anderer proapoptotischer Faktoren wie Smac/DIABLO aus dem Mitochondrium. Es bildet sich das Apoptosom, das aus ATP/dATP, „apoptosis-inducing factor 1“ (Apaf-1), Procaspase-9 und Cytochrom c besteht. Nach der Aktivierung der Procaspase-9 am Apoptosom kommt es zur Spaltung der Effektorcaspase-3, die anschließend die Apoptose einleitet (Sprick and Walczak 2004). Dieser Schritt kann durch intrazelluläre Inhibitoren wie XIAP, die an die Effektor-Caspasen binden, inhibiert werden. Die XIAP-Antagonisten Smac/DIABLO und HtrA2/Omi können nach ihrer Freisetzung aus dem Mitochondrium diese Inhibition aufheben (Sprick and Walczak 2004).

3.2.7.1 Regulationsmechanismen bei der TRAIL-induzierten Apoptose

Die Aktivierung der Procaspase-8 im TRAIL- und CD95-DISC kann durch verschiedene Isoformen des „cellular FLICE-like inhibitory Protein“ (c-FLIP) gehemmt werden (Hu et al. 1997; Irmeler et al. 1997; Griffith et al. 1998; Degli-Esposti 1999). Diese wurden 1997 beschrieben und besitzen eine große Sequenzhomologie zur Caspase-8 (Hu et al. 1997). Es konnten mehr als 10 Spleißvarianten von c-FLIP identifiziert werden, die für mindestens drei Isoformen kodieren: c-FLIP-Long (c-FLIP-L), c-FLIP-Short (c-FLIP-S) und c-FLIP-R (Djerbi et al. 2001; Golks et al. 2005). c-FLIP-L und c-FLIP-S sind die

am häufigsten exprimierten und daher am besten charakterisierten Formen. Ähnlich wie Caspase-8 besitzt c-FLIP-L zwei „death effector“ Domänen (DED) im N-terminalen Bereich und eine Caspase-8-Homologie-Domäne im C-Terminus. Trotz dieser großen Ähnlichkeit zur Caspase-8 besitzt c-FLIP-L wegen der Substitution eines Cysteins, das zur Ausbildung des aktiven Zentrums notwendig ist, keine Caspase-Aktivität (Hu et al. 1997). Im Gegensatz zu FLIP-L besitzt FLIP-S keine Caspase-Homologie-Domäne. Das Protein besteht daher im Wesentlichen aus zwei DEDs (Tschopp et al. 1998).

In Gegenwart von c-FLIP-L im TRAIL- und CD95-DISC wird die Procaspase-8 nur unvollständig prozessiert (Scaffidi et al. 1999). Im Gegensatz dazu bewirkt c-FLIP-S eine vollständige Blockierung der proteolytischen Prozessierung von Procaspase-8 am DISC (Krueger et al. 2001). Sowohl c-FLIP-S als auch c-FLIP-L sind demnach effektive Inhibitoren der Caspase-8-Aktivierung am DISC (Irmeler et al. 1997; Griffith et al. 1998; Degli-Esposti 1999).

Eine andere Klasse natürlicher Apoptoseinhibitoren stellen die „Inhibitors of apoptosis“ (IAPs) dar, die durch eine 70 Aminosäurereste große Zink-bindende Domäne charakterisiert sind. Diese Domäne wird als „Baculovirus IAP Repeat“ (BIR) bezeichnet und liegt entweder einzeln oder in bis zu drei Kopien vor. Die BIR-Domänen sind für die antiapoptotische Wirkung der IAPs nötig (Holcik 2006). Ein anderes wichtiges Merkmal vieler IAP ist die RING-Domäne im C-terminalen Bereich des Moleküls, die die Degradation verschiedener Zielmoleküle vermitteln kann. Die RING-Domäne besitzt dabei die Funktion einer E3-Ubiquitin-Ligase und vermittelt durch die Übertragung von Ubiquitin die proteosomale Degradation des Zielmoleküls. Zum Beispiel auto-ubiquitinieren sich die IAPs selbst als Antwort auf apoptotische Signale (Joazeiro and Weismann 2000). Das hinsichtlich seiner antiapoptotischen Wirkung am besten charakterisierte IAP-Molekül ist XIAP. Die antiapoptotischen Eigenschaften von XIAP beruhen auf der direkten Interaktion mit verschiedenen Caspasen (Deveraux et al. 1997; Deveraux et al. 1998). Funktionelle Strukturanalysen zeigten, dass die Interaktion von XIAP mit der Caspase-9 durch die BIR3-Domäne vermittelt wird (Srinivasula et al. 2001), die Inhibition der Caspase-3 und -7 jedoch durch die sogenannte Linkerregion zwischen der BIR1- und der BIR2-Domäne (Huang et al. 2001). Die Bindung von XIAP führt zu einer Blockade der katalytischen Spalte, was die Anlagerung und Prozessierung von Caspase-Substraten verhindert. Die Wirkungsweise von XIAP kann durch das aus dem Mitochondrium freigesetzte Molekül SMAC/DIABLO gehemmt werden. Dieses bindet an die BIR2- und BIR3-Domäne von XIAP und verhindert so die Interaktion von XIAP sowohl mit Caspase-9 als auch mit

Caspase-3 und -7. Dadurch wird der inhibitorische Effekt von XIAP aufgehoben (Chai et al. 2000; Liu et al. 2000).

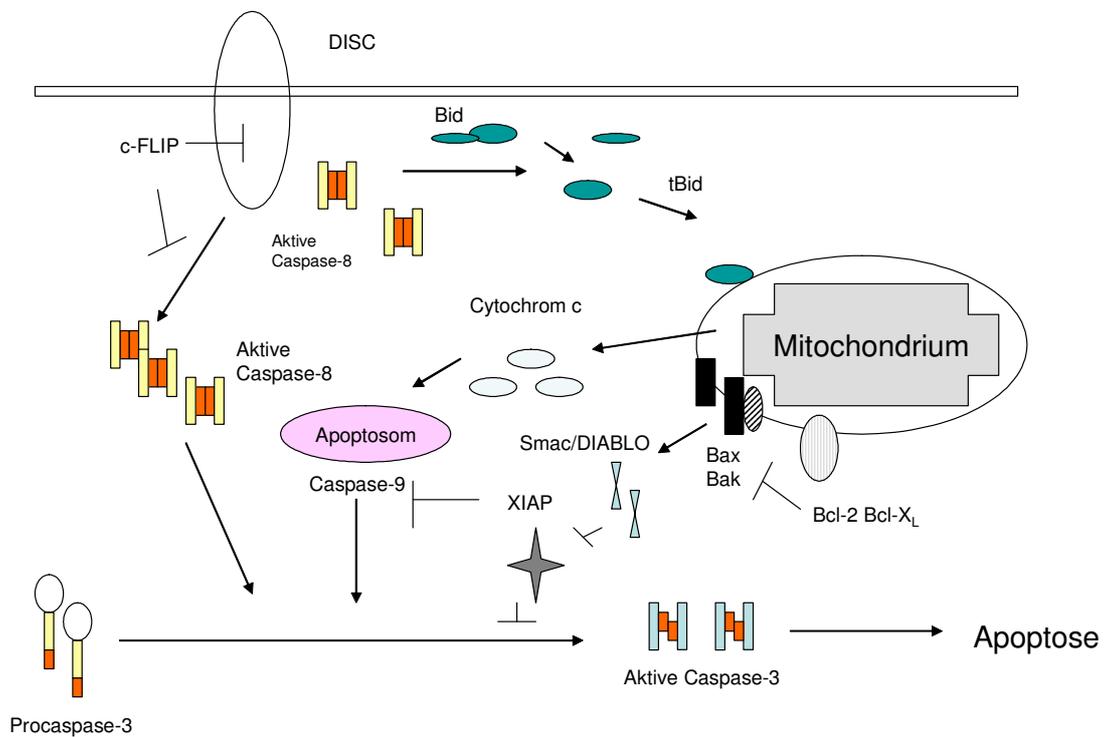


Abbildung 3: Die Verbindung von rezeptorvermitteltem und mitochondrialem Signalweg der Apoptose. Ligandeninduzierte Rezeptoroligomerisierung resultiert in der DISC-Bildung und in der Aktivierung von Caspase-8. Nach der Aktivierung der Initiator-Caspase werden die Caspase-3 aktiviert und das BH3-only Protein Bid gespalten. Bid gewährleistet in seiner „truncated“ Form den „Crosstalk“ zwischen den Todesrezeptoren und dem Mitochondrium. tBid vermittelt den mitochondrialen Signalweg und die Cytochrom c- Freisetzung aus dem Mitochondrium. Dies führt zur Bildung des Apoptosoms und der Caspase-9-Aktivierung. Caspase-9 wirkt ähnlich wie die an dem DISC aktivierten Caspasen und aktiviert Caspase-3. Die Aktivierung der Caspase-3 kann durch zelluläre Inhibitoren wie XIAP inhibiert werden. Ihre inhibitorische Funktion kann durch Smac/DIABLO, das aus dem Mitochondrium freigesetzt wird, blockiert werden.

3.2.8 Proinflammatorische Signalwege durch TRAIL

TRAIL ist nicht nur in der Lage, Apoptose zu induzieren, sondern auch nicht-apoptotische Signalwege zu aktivieren, wie zum Beispiel den NF κ B- Signalweg oder die MAP-Kinasenkaskaden. So kann TRAIL auch Proliferations-, Differenzierungs- und Aktivierungsprozesse induzieren (Wajant 2004; Wajant 2003). Die Stimulation solcher proinflammatorischen Signalwege durch TRAIL sind besonders bei apoptose-resistenten Zellen zu erkennen (Wajant 2004). Bei der Tumorentstehung kommt es häufig zu einer Apoptoseresistenz, entweder durch eine fehlregulierte Expression von antiapoptotischen Proteinen (zum Beispiel von Mitgliedern der Bcl2-Proteinfamilie, IAPs) oder weil die Expression proapoptotischer Proteine wie Bax, Bak oder Caspase-8 gehemmt wird. Demnach kann nicht nur die apoptoseinduzierende, sondern auch die proinflammatorische Wirkung von TRAIL für die Tumorbilogie von Bedeutung sein.

In diesem Zusammenhang ist besonders die NF κ B-stimulierende Wirkung von TRAIL von Interesse. Die Invasivität und Metastasierung aggressiver Tumore wird nämlich durch diesen entzündungsstimulierenden Signalweg gefördert. Tumorzellen regulieren dabei zusammen mit den Zellen des Tumorstromas und mit tumorinfiltrierenden Immunzellen die Produktion verschiedener protumoral wirkender Faktoren (zum Beispiel Matrixmetalloproteasen (MMPs), Chemokine, proangiogene Faktoren und Zytokine). Dadurch entsteht ein sich selbst erhaltendes Mikromilieu, welches zum Beispiel die Proliferation, Angiogenese und Migrationsfähigkeit des Tumors verstärkt (Coussens and Werb 2002; Dranoff 2004). Unter diesen Umständen werden häufig verschiedene MAP-Kinasekaskaden stimuliert und Transkriptionsfaktoren der NF κ B- und AP1-Familie aktiviert.

3.2.9 Das Multiple Myelom und TRAIL

Das Multiple Myelom, auch Plasmozytom oder Morbus Kahler genannt, ist eine klonale maligne Erkrankung der Antikörper-sezernierenden Plasmazellen. Bei der Entstehung des Multiplen Myeloms wandelt sich die normale Plasmazelle durch eine Reihe genetischer Veränderungen über das MGUS-Stadium („Monoklonale Gammopathie ungewisser Signifikanz“) zum Multiplen Myelom (Hideshima et al. 2004). Im Knochenmark akkumulieren die Myelomzellen und verdrängen dort die normale Hämatopoese

und führen zur Knochendestruktion. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Therapieansätze entwickelt, wie die Hochdosischemotherapie mit autologer Blutstammzelltransplantation oder die Behandlung mit Thalidomidderivaten und Proteasominhibitoren. Dennoch besteht für das Multiple Myelom kein kurativer Ansatz (Kyle and Rajkumar 2004). Die mittlere Überlebenszeit liegt trotz Therapie bei nur ungefähr 4 Jahren.

Es konnte gezeigt werden, dass das Knochenmarkmikromilieu eine wichtige Rolle für das maligne Wachstum des Multiplen Myeloms spielt. Durch die Wechselwirkung zwischen den Myelomzellen und den Knochenmarkstromazellen kommt es zur erhöhten Produktion von Wachstumsfaktoren. Dies unterstützt die Proliferation der Myelomzellen und schützt sie so vor der Apoptose (Chauhan et al. 1996). In diesem Zusammenhang ist der am besten charakterisierte Wachstumsfaktor Interleukin-6 (IL6). Einerseits induziert er den STAT3-Signalweg und trägt so zur Pathogenese des Multiplen Myeloms bei (Hilbert et al. 1995). Andererseits aber können Myelomzellen in Gegenwart von Zellen des Knochenmark-„Mikroenvironments“ durch IL6/STAT3-unabhängige Signalwege, wie zum Beispiel den NFκB-, den Ras/MAPK- oder den PI3K/Akt-Signalweg, vor der Apoptose geschützt werden (Chatterjee et al. 2002).

Bisher wurde in erster Linie die apoptoseinduzierende Wirkung von TRAIL auf das multiple Myelom untersucht. Die Sensitivität verschiedener Myelomzelllinien für TRAIL variiert stark, wobei primäre Myelomzellen nur partiell TRAIL-sensitiv sind (Mitsiades et al. 2001). Durch verschiedene Chemotherapeutika kann die Sensitivität von Myelomzellen gegenüber TRAIL verstärkt werden (Mitsiades et al. 2001; Mitsiades et al. 2002). Einige dieser Substanzen sind zum Beispiel Doxorubicin, NFκB-Inhibitoren oder Proteasominhibitoren, die entweder p53-vermittelt die TRAILR2-Expression induzieren oder den NFκB-Signalweg inhibieren, und so die Myelomzellen für die Apoptose sensitivieren. Bei der Behandlung des multiplen Myeloms mit TRAIL ist die Tatsache besonders bedeutsam, dass normale B-Zellen sowohl gegen TRAIL als auch gegen eine Kombinationstherapie von TRAIL und den oben beschriebenen Therapeutika resistent sind (Mitsiades et al. 2001; Mitsiades et al. 2002).

3.3 Ziel der Arbeit

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass inaktive oder schwach aktive lösliche trimere Liganden der TNF-Ligandenfamilie durch sekundäres Quervernetzen in stark aktive Moleküle umgewandelt werden können. Lösliches murines TRAIL (mTRAIL) ist jedoch im Gegensatz zu humanem TRAIL selbst nach sekundärem Quervernetzen nur sehr schwach aktiv. In dieser Arbeit wurde daher versucht, die Fähigkeit des murinen Liganden, seine korrespondierenden Rezeptoren zu binden und zu aktivieren, zu verbessern. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Aktivierung proinflammatorischer Signalwege beim multiplen Myelom durch TRAIL untersucht werden.

4. Material

4.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Anti-Flag mAk M2-Agarose	Sigma, Deisenhofen
APS	AppliChem, Darmstadt
BSA	Sigma, Deisenhofen
Cyclohexamid	Sigma, Deisenhofen
1kb DNA-Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
DMSO	Roth, Karlsruhe
ECL-Kit	Amersham, Braunschweig
Essigsäure	J. T. Baker, Leipzig
Ethanol	J. T. Baker, Leipzig
Flag-Peptid	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA, Pasching
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Methanol	J. T. Baker, Leipzig
Milchpulver	Sigma, Deisenhofen
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid)	Sigma, Deisenhofen
Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schuell, Dassel
Natriumthiosulfat	Fluka , Schweiz
Penincillin/Streptomycin	PAA, Pasching
Pepton	Roth, Karlsruhe
Phosphataseinhibitor I und II	Sigma, Deisenhofen
Prestained Protein Marker (Broad Range)	New England Biolabs, Frankfurt am Main

Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
RPMI 1640-Medium	PAA, Pasching
Silbernitrat	Fluka, Schwitzerland
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA, Pasching
TWEEN-20	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
z-VAD-fmk	Bachem, Heidelberg

4.2 Antikörper und Antiseren

Anti-BID, Kaninchen polyklonal	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Caspase-8, Maus monoklonal	Schulze-Osthoff, Universität Düsseldorf
Anti-Caspase-9, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-Caspase-3, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-I κ B α , Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-phospho-I κ B α , Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly MA, USA
Anti-Kaninchen-HRP, Ziege polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup Dänemark
Anti-Kaninchen HRP, Ziege polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly MA, USA
Anti-Flag, Maus monoklonal	Sigma, Deisenhofen
Anti –Maus IgG (whole molecule) R-	Sigma, Deisenhofen
Phycoerythrin, Ziege polyklonal	

Anti-Maus-HRP, Kaninchen polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup Dänemark
Anti-Rabbit-HRP, Ziege polyklona	Dako-Cytomation, Glostrup Dänemark
Anit-phospho-JNK, Kaninchen,polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-JNK, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anit-P38, Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-phospho-P38, Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly MA, USA
Anti-P42/44, Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly MA, USA
Anti-phospho-P42/44, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly MA, USA
Anti-Tubulin, Maus monoklonal	Dunn Labortechnik, Ansbach
Anti-TRAILR1/2-PE	R&D-Systems, Wiesbaden
Anti-TRAIL3/4	Tina Wachter, Abteilung für Dermatologie, Universitätsklinikum, Würzburg
Biotin/Streptavidin-PE	Tina Wachter, Abteilung für Dermatologie, Universitätsklinikum, Würzburg

4.3 Plasmide

Alle Expressionsplasmide, die für die Fusionsproteine kodieren, wurden basierend auf dem Plasmid PS435 (Pascal Schneider, Univeristiy of Lausanne, Epalignes, Switzerland) konstruiert. Das Plasmid PS435 ist eine Modifikation des pCR3-Plasmids (Invitrogen, Karlsruhe), das für einen aminoterminal Flag-getaggen TRAILR2 mit einem Immunglobulin-Signalpeptid kodiert (Flag-TRAILR2-pCR3). Alle aus diesem Vektor hervorgegangenen Konstrukte besitzen ebenfalls ein Immunglobulin-Signalpeptid an ihrem aminoterminalen Ende.

4.4 Eukaryotische Zelllinien

Die humane Nierenzelllinie HEK293, die humane Keratinozytenzelllinie KB und die murinen Fibroblasten L929 waren in der Arbeitsgruppe vorhanden. Die Myelomzelllinien AMO1, KMS-12-BM, INA6, MOLP8 und RPMI8226 wurden von der Abteilung von Hematologie aus der Inneren Medizin II von der Universitätsklinik Würzburg zur Verfügung gestellt.

4.5 Medien für Bakterien

LB-Medium	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 1 l ddH ₂ O, Ampicillin (100 µg/ml)
LB/Ampicillin-Platten	1 l LB-Medium, 15 g Agar, Ampicillin (100 µg/ml)

4.6 Prokaryontische Zellen

One Shot[®] Top10 chemically competent *E. Coli* Invitrogen, Karlsruhe

Genotyp:

F-*mcrA*Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*)Φ80/*lacZ*ΔM15Δ*lacX74recA1 araD139*Δ(*ara-leu*)7697*galUgaIKrpsL*(Str^R) *end A1 nupG*

4.7 Fusionsproteine

Das Plasmid Flag-TNC-TRAILR2-pCR3 und die Fusionsproteine Flag-TNC-hTRAIL(95-291), Flag-mTRAIL(99-291), Flag-TNC-mTRAIL(99-291) und Flag-Linker-mTRAIL(99-291) wurden wie unter 5.2.5 beschrieben kloniert. Die Gensequenzen der vier Fusionsproteine sind im Anhang angegeben. Flag-hTRAIL(95-291) wurde von Mitarbeitern

vom Institut für Zellbiologie und Immunologie in Stuttgart kloniert. Die Fusionsproteine Flag-mTRAIL(43-291), Flag-hCD95L(137-281), Flag-hCD95L(S1), Flag-mCD95L(137-279), Flag-mCD95L(WX1), Flag-m/hCD95L und Flag-Linker-mCD95L wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe kloniert.

4.8 Lösungen und Puffer

Blotpuffer	0,025 M Tris; 0,192 M Glycin; 20% (v/v) Methanol; pH 8,3
Kristallviolettlösung	0,5% Kristallviolett; 20% Methanol
Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,05 M Tris; 0,38 M Glycin; 0,004 M SDS; pH 8,3
MTT-Lysispuffer	50% Dimethylformamid; 15% SDS; pH 4,7
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	0,02 M Na-Phosphat; 0,7% NaCl; pH 7,2
PBS-T	1 x PBS; 0,05% Tween-20
PBS-T-MLK	0,02 M Tris; 8% NaCl; pH 7,6; 0,05% Tween-20; 5% Magermilch
Puffer zur Zellyse	0,03 M Tris-HCL; pH7,5; 1% Triton X-100, 10% Glycerol; 0,120 M NaCl
Probenpuffer (SDS-PAGE, 4fach)	8% SDS; 0,1 M DTT; 40% Glycerol, 0,2M Tris; Bromphenolblau; pH 8,0
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	0,5 M Tris; 0,015 M SDS; pH 6,8
50fach TAE-Puffer	2 M Tris ; 1 M Essigsäure; 0,1 M EDTA, pH 8,3
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M Tris ; 0,015 M SDS ; pH 8,8
Tris gepufferte Saline (TBS)	0,02 M Tris ; 8% NaCl ; pH 7,6
TBS-T	0,02 M Tris; 8% NaCl; pH 7,6, 0,05% Tween-20
TBS-T MLK	1x TBS; 0,05% Tween-20; 5% Magermilch

4.9 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

mTRAIL-F341-EcoR1 5' CCG GAA TTC ACC TTT CAG GAC ACC ATT TCT
ACA G 3'

mTRAIL-R923-XbaI 5' TGC TCT AGA TTA GTT AAT TAA AAA GGC TCC
AAA G 3'

PCR3TR2-BamHI-F-TNC 5' G GTG CCA CGC GGA TCC GAT TAC AAA GAC GAT
GAC GAT AAA GAT ATC GCC TGT GGC TGT GCG GC

PCR3TR2-EcoRI-R-TNC 5' G AGC AGA CTC GAA TTC ACC GCG GCC GCC
AGA CCC ACC TC

4.10 Enzyme

<i>EcoRI</i> (GAATTC)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>XbaI</i> (TCTAGA)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>BamHI</i> (GGATCC)	Fermentas; St. Leon-Rot
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim

5. Methoden

5.1 Klonierung der Fusionsproteine

5.1.1 Polymerase Chain Reaktion (PCR)

Die PCR wurde mit dem Gerät „Primus, MWG-Biotech“ in 50 µl Ansätzen durchgeführt. Es wurden 2 ng DNA, 10 ng jedes Oligonukleotides, 1 µl dNTPs (10 mM), 5 µl Reaktionspuffer und 1 µl DNA-Polymerase (3,5 U/µl) eingesetzt. Die Amplifikation wurde in 30 Zyklen unter folgenden Parametern durchgeführt:

Vorgeheizter Deckel (110 °C)

Denaturierung: 94 °C (3 min)

30 Zyklen

Denaturierung: 94 °C (30 sec)

Anlagerung: 52 °C (30 sec)

Elongation: 72 °C (1 min 30 sec)

Elongation: 72 °C (7 min)

Das PCR-Produkt wurde über präparative Gelelektrophorese (1%iges Agarose-Gel; 0,5 g Agarose; 50 ml 1fach TAE-Puffer) mit dem Nucleo Spin Extract II Kit nach Angabe des Herstellers (Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt.

5.1.2 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung der DNA

Es wurden 5 µg Plasmid-DNA bzw. das aufgereinigte PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* (Fermentas; St. Leon-Rot) und *XbaI* bzw. *BamHI* (Fermentas; St. Leon-Rot) und dem dazugehörigen Puffer (Puffer 2; New England Biolabs, Frankfurt am Main) für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach 4 h Inkubation erfolgte die Dephosphorylierung des Vektors mit Hilfe des Enzyms CIAP (Fermentas; St. Leon-Rot) für eine halbe Stunde bei 37 °C. Der verdaute und dephosphorylierte Vektor wurde über präparative Gelelektrophorese (1%iges Agarose-Gel; 0,5 g Agarose; 50 ml 1fach TAE-

Puffer) und das verdaute PCR-Produkt direkt mit dem Nucleo Spin Extract II Kit nach Angabe des Herstellers (Machery-Nagel, Düren) aufgereinigt.

5.1.3 Ligation und Transformation der DNA in One Shot^R Top10 chemisch kompetente *E. coli*

Die Ligation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur mit Hilfe der T4-Ligase (Fermentas; St. Leon-Rot; Deutschland) nach Angabe des Herstellers. Für die Transformation der Ligationsansätze wurden 100 µl Top10 chemisch kompetente *E. coli* nach Auftauen auf Eis mit 10 µl des Ligationsansatzes versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 45 sec bei 42°C. Nach Abkühlen (2 min auf Eis) wurden die Ansätze mit 100 µl LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf LB-Amp Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien durch Plasmid-Isolation (Mini-prep; siehe 5.1.4) und anschließenden Kontrollverdau auf positive Klone hin untersucht.

5.1.4 Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte unter Benutzung des NukleoBond Kits der Firma Macherey Nagel, Düren, Deutschland nach Protokoll des Herstellers. Ebenfalls wurde das Pure YieldTM Plasmid Midiprep System von Promega, Mannheim, Deutschland verwendet.

5.1.5 Klonierungsstrategien der TRAIL-Fusionsproteine

Als Ausgangskonstrukte für das Fusionsprotein Flag-mTRAIL(99-291) wurde der Vektor Flag-TRAILR2-pCR3 verwendet. Dieses Konstrukt lag bereits vor.

Als Ausgangskonstrukt für die Fusionsproteine Flag-TNC-mTRAIL(99-291) und Flag-TNC-hTRAIL(95-291) wurde der Vektor Flag-TNC-TRAILR2-pCR3 verwendet. Um diesen Vektor zu erhalten, wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI der Flag-Tag aus dem Vektor Flag-TRAILR2-pCR3 herausgeschnitten. Durch PCR wurde das Flag-TNC-Fragment (TNC: Aminosäure 110-139 von Hühner Tenascin-C (TNC))

mit den unter 4.9 beschriebenen Primern amplifiziert. Das Flag-TNC-Fragment wurde mit dem geschnittenen Vektor ligiert.

Als Ausgangskonstrukt für das Konstrukt Flag-Linker-mTRAIL(99-291) wurde das Fusionsprotein Flag-Linker-mFasL verwendet. Dieses Konstrukt wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe kloniert.

Klonierung des Konstrukts Flag-mTRAIL(99-291)

Zunächst wurde das mTRAIL-Fragment durch PCR mit den unter 4.9 beschriebenen Primern amplifiziert. Als Template wurde das Fusionsprotein Flag-mTRAIL(43-291) verwendet. Das PCR-Produkt wurde mit den Enzymen *EcoRI* und *XbaI* verdaut. Parallel wurde der Vektor Flag-TRAILR2-pCR3 ebenfalls mit *EcoRI* und *XbaI* verdaut und das TRAILR2-Fragment herausgeschnitten und durch das mTRAIL-Fragment ersetzt.

Klonierung des Fusionsproteins Flag-TNC-mTRAIL(99-291)

Der Vektor Flag-TNC-TRAILR2-pCR3 wurde mit *EcoRI* und *XbaI* verdaut und TRAILR2 herausgeschnitten. Parallel wurde Flag-mTRAIL(99-291) ebenso mit *EcoRI* und *XbaI* verdaut und das mTRAIL(99-291)-Fragment isoliert. Der verdaute Vektor wurde mit dem mTRAIL-Fragment ligiert.

Klonierung des Konstrukts Flag-Linker-mTRAIL(99-291)

Der Vektor Flag-linker-mFasL wurde mit *EcoRI* und *XbaI* verdaut und mFasL herausgeschnitten. Parallel wurde Flag-TNC-mTRAIL(99-291) ebenso mit *EcoRI* und *XbaI* verdaut und das mTRAIL(99-291)-Fragment isoliert. Der verdaute Vektor wurde mit dem mTRAIL-Fragment ligiert.

Klonierung des Konstrukts Flag-TNC-hTRAIL(95-291)

Der Vektor Flag-TNC-TRAILR2-pCR3 wurde mit *EcoRI* und *XbaI* verdaut und TRAILR2 herausgeschnitten. Parallel wurde Flag-hTRAIL(95-291) ebenso mit *EcoRI* und *XbaI* verdaut und das hTRAIL(95-291)-Fragment isoliert. Der verdaute Vektor wurde mit dem hTRAIL-Fragment(95-291) ligiert.

5.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Unter Standardbedingungen (5% CO₂, 37°C) wurden alle Zelllinien in RPMI 1640 Medium (PAA, Pasching) mit 10% FCS (PAA, Pasching) kultiviert. Adhärenz Zellen wurden zum Ernten bei 37°C mit Trypsin (0,025%)/EDTA (10 mM) abgelöst. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

5.3 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die Plasmide, die für verschiedenen TRAIL-Varianten kodieren, wurden in HEK293-Zellen durch Elektroporation transfiziert. Dazu wurden 40x10⁶ HEK293-Zellen in 1 ml RPMI-Medium (10% FCS) resuspendiert und mit 40 µg Plasmid DNA elektroporiert (4 mm Küvette, 250V, 1800µF, maximaler Widerstand). Die elektroporierten Zellen wurden in 15 cm Zellkulturschalen in RPMI-Medium mit 10% FCS ausplattiert und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und durch RPMI-Medium mit niedriger Serumkonzentration (0,5% FCS) ersetzt. Nach 3-4 Tagen wurden die Überstände gesammelt. Die Proteinkonzentration wurde im SDS-PAGE anhand eines Proteinstandards ermittelt.

5.4 Aufreinigung der Fusionsproteine

Die einzelnen TRAIL-Varianten wurden durch M2-Agarose Affinitätschromatographie (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) nach Angabe des Herstellers aufgereinigt. Das Volumen der Säule richtete sich dabei nach der Proteinkonzentration der rekombinanten Proteine (1 ml M2-Agerose bindet 600 µg Protein). Die gebundenen

Proteine wurden mit 100 µg/ml Flag-Peptid eluiert und anschließend gegen PBS dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels SDS-PAGE anhand eines Proteinstandard bestimmt.

5.5 Herstellung der Zelllysate

Die Zelllysate zur Western Blot Analyse für phospho-spezifische Antikörper wurden mit 4x Ladepuffer (8% SDS, 0,1 Dithiothreitol, 40% Glycerol, 0,2 M Tris pH 8,0) hergestellt. Kurz vor Versuchsbeginn wurden die Phosphataseinhibitoren I und II (Sigma, Deisenhofen) zum Ladepuffer hinzugegeben. Die Zellen wurden zusammen mit kaltem PBS in ein 15 ml Falcon überführt. Nach Zentrifugation (2200 rpm, 3 min, 4°C) wurde das Pellet einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend direkt 150 µl/20x 10⁶ Zellen in 4x Ladepuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 10 Sekunden sonifiziert, bei 95°C für 5 Minuten erhitzt und schließlich bei 13000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert.

Die Zelllysate für die nicht phospho-spezifischen Antikörper wurden in Triton X-100 Lysispuffer zusammen mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim) hergestellt. Dazu wurde das gewaschene Pellet 150 µl/ 20x 10⁶ Zellen in Triton X-100 Lysispuffer (0,03 M Tris-HCL pH 7,4, 0,120 M NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton X-100) resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zwei sequentiellen Zentrifugationen (10000 rpm, 5 Minuten 4°C und 14000 20 Minuten 4°C) wurde der Überstand mit 4x Ladepuffer vereinigt und im Western Blot analysiert.

5.6 Western-Blot

5.6.1 SDS-Page

Die Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Um das Trenngel herzustellen, wurde eine Trennlösung (0,374 M Tris pH 8,8, 0,0035 M SDS, 0,1% APS) mit verschiedenen Konzentrationen Acrylamid (10%, 12%, 13%) verwendet. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von TEMED (0,1%) gestartet. Daraufhin wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet (6% Polyacrylamid in 0,123 M Tris pH 6,8, 0,00375 M SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED). Vor der Auspolymerisierung wurde

der Kamm eingesetzt. Anschließend wurden der Kamm entfernt und die Proteinproben auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 90 Minuten bei 90 bis 130 Volt.

5.6.2 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose

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

5.6.3 Immundetektion

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt: Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran zunächst für eine bis drei Stunden bei Raumtemperatur in Blockpuffer (PBST-MLK oder TBST-MLK) geschwenkt und dann entweder über Nacht bei 4°C oder bei Raumtemperatur für zwei Stunden mit dem ersten Antikörper (eingesetzte Konzentration nach Angabe des Herstellers) in PBST oder TBST inkubiert. Nach dem Waschen der Membran (3x 5 Minuten mit PBST bzw. TBST) erfolgte bei Raumtemperatur eine einstündige Inkubation mit einem zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörper (eingesetzte Konzentration nach Angabe des Herstellers) in PBST oder TBST-MLK. Anschließend wurde die Membran erneut, wie oben beschrieben, gewaschen und die Nachweisreaktion unter Verwendung des ECL-Systems durchgeführt.

5.6.4 Silberfärbung

250 ng der aufgereinigten Fusionsproteine wurden in einer 16%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei wurden die Proteine mit reduzierendem und nicht-reduzierendem

Laemmli Probenpuffer versehen. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel zweimal für je 30 min in einer Fixierlösung inkubiert (40% Methanol, 12% Essigsäure) und anschließend zweimal für je 20 min in 30% Ethanol gewaschen. Danach wurde das Gel für eine Minute in 0,02% w/v Natrium-Thiosulfat und nach drei Waschsritten (30 Sekunden in ddH₂O) für 20 Minuten in der Färbelösung (0,2% w/v Silbernitrat, 1:333 Formaldehyd) inkubiert. Nun wurde das Gel wieder in ddH₂O (3x für eine Minute) gewaschen und schließlich die Entwicklerlösung zugegeben (6% w/v Natriumcarbonat, 1:500 Formaldehyd, 0,0004% Natriumthiosulfat). Wenn das Signal die gewünschte Intensität besaß wurde die Entwicklerlösung verworfen und die Reaktion mit 5% Essigsäure gestoppt.

5.7 Zytotoxizitätsassay

Die adhärenenten Zelllinien KB und L929 (2×10^4 /Well) wurden in einer 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die zytotoxischen Reagenzien (Flag-mTRAIL, Flag-hTRAIL, Flag-TNC-mTRAIL, Flag-TNC-hTRAIL, Flag-Linker-mTRAIL) entweder in sequentiellen Verdünnungen oder in konstanten Konzentrationen in An- und Abwesenheit des Anti-Flag mAb M2 Antikörpers (3 µg/ml) zugegeben. In einigen Experimenten wurden die Zellen zusätzlich für eine Stunde mit CHX vorstimuliert. Die Bestimmung der Anzahl der lebenden Zellen wurde nach weiteren 16 Stunden mittels Kristallviolett-Färbung ermittelt. Dazu wurden der Überstand zunächst verworfen und die Zellen für 15 Minuten in 50 µl Kristallviolett-Lösung (0,5% Kristallviolett, 20% Methanol) inkubiert. Danach wurden die 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten mehrmals mit Wasser gewaschen und für eine Stunde an der Luft getrocknet. Schließlich wurde das Kristallviolett in 200 µl Methanol pro Well gelöst und die Platten im ELISA-Reader (Anthos Lucy 2) bei 595 nm analysiert.

Der Zytotoxizitätsassay der Suspensionszellen (Jurkat, Multiple Myelomzellen) erfolgte durch eine MTT-Färbung. Hierfür wurden 6×10^4 /Well der Jurkat-Zellen und 9×10^4 /Well der Myelom-Zellen in einer 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach Stimulation wurde nach 16 Stunden 10 µl der MTT-Lösung (10 mg/ml) in jedes Well gegeben und die Zellen für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellyse mit 90 µl/Well MTT-Lysispuffer (1 Teil Dimethylformamid, 1 Teil H₂O, 15%

SDS, pH 4,7 mit Essigsäure) für weitere 16 Stunden durchgeführt. Die Mikrotiterplatten wurden daraufhin im ELISA-Reader bei 570 nm analysiert.

5.8 FACS-Färbungen

Für die FACS Bindungsstudien wurden 1×10^5 Zellen für 30 Minuten bei 4°C mit den entsprechenden Konzentrationen der verschiedenen TRAIL-Varianten und mit dem Ligand Flag-hCD40L als Negativkontrolle inkubiert und anschließend dreimal mit PBS-BSA (PBS, 0,5% BSA) gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 5 µg/ml anti-Flag mAb M2 (Sigma; Deisenhofen) für 30 min inkubiert und danach wieder dreimal mit PBS-BSA gewaschen. Nach einer weiteren 30 min Inkubation mit einem PE-gelabelten anti-Maus-Antikörper wurden die zellgebundenen Fusionsprotein-Antikörperkomplexe nach erneutem Waschen im FACS (BD FACS Calibur) detektiert.

Um die Expression der TRAIL-Todesrezeptoren bei den Myelomzellen zu bestimmen, wurden die verschiedenen Zelllinien mit den direkt PE-gelabeten für die verschiedenen TRAILR1/R2 spezifischen Antikörpern (R&D-Systems) und den passenden Kontrollantikörpern für 30 min inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS-BSA gewaschen und anschließend die zellgebundenen Antikörper im FACS detektiert. Für den Nachweis der TRAIL-Decoy-Rezeptoren wurden die Myelomzellen mit den für die Rezeptoren spezifischen monoklonalen Antikörpern und den entsprechenden Kontrollantikörpern für 30 min inkubiert und anschließend dreimal mit PBS-BSA (PBS, 0,5% BSA) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit Biotin/Streptavidin-PE inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die verbliebenen gebundenen Antikörper im FACS nachgewiesen.

5.9 Crosslinken mit *Bis(sulfosuccinimidyl)suberat*

200 ng der verschiedenen TRAIL- Varianten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des chemischen Crosslinkingreagenzes, Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS³), für 30 Minuten in einem totalen Volumen von 40 µl inkubiert. Die Crosslink-Reaktion wurde durch 2 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 gestoppt und anschließend wurden die

behandelten Proteine in einer SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt und anhand eines anti-Flag Western Blots analysiert.

5.10 Analyse der rekombinanten Proteine durch Gelfiltration

Für die Gelfiltrationsanalysen wurden die aufgereinigten TRAIL-Varianten entweder auf eine BioSep-SEC-S2000 (300 x 7,8) Säule oder auf eine BioSep-SEC-S3000 (300 x 7,8) Säule (Phenomenex, Aschaffenburg) gegeben. Die Säulen wurden mit PBS equilibriert und die Proteine in 0,5 ml/min aus den Säulen eluiert.

6. Ergebnisse

6.1 Konstruktion von TRAIL-Varianten mit erhöhter Bioaktivität

6.1.1 Lösliches murines TRAIL ist selbst nach sekundärem Quervernetzen praktisch inaktiv

Die Liganden der TNF-Familie werden als trimere TypII-Transmembranproteine exprimiert. Durch proteolytische Prozessierung können jedoch auch trimere lösliche Proteine entstehen (Locksley et al. 2001; Bodmer et al 2002). Während dieses „shedding“ bei einigen TNF-Liganden für ihre physiologische Funktion wichtig ist, werden andere Liganden der TNF-Familie durch die proteolytische Prozessierung inaktiv. Lösliche Formen von TNF, CD95L, TRAIL und CD40L zum Beispiel können mit TNFR2, CD95, TRAILR2 sowie CD40 noch interagieren, diese Rezeptoren jedoch nicht mehr aktivieren (Grell et al 1995; Schneider et al. 1998; Wajant et al. 2001). Solche inaktiven oder schwach aktiven Liganden können jedoch in hoch aktive Proteine überführt werden, indem ihre Avidität künstlich erhöht wird. Dies kann zum Beispiel erreicht werden, indem lösliche TNF-Liganden, die mit einem Flag-Tag versehen wurden, mit einem Flag-spezifischen Antikörper quervernetzt werden (Wajant et al. 2001; Almasan and Ashkenazi 2003; Holler et al. 2003).

Die „TNF homology domain (THD)“ ist für die Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie charakteristisch. Sie ist für die Bildung von Trimeren und für die Rezeptorbindung nötig. Normalerweise bindet ein trimere Ligand der TNF-Familie drei Moleküle seines korrespondierenden Rezeptors (Bodmer et al. 2002; Locksley et al. 2001). Diese Interaktion ist jedoch nicht immer ausreichend für eine gute Rezeptoraktivierung. Faktoren wie zum Beispiel die Affinität und Avidität der Ligand-Rezeptor-Interaktion spielen hierbei auch eine Rolle.

In dieser Arbeit wurden zunächst lösliche Varianten des humanen (Flag-hTRAIL(95-291)) und murinen (Flag-mTRAIL(99-291)) TRAIL-Moleküls kloniert, welche nur die THD-Domäne und einen Flag-Tag besitzen (Abb. 4). Anschließend wurden Flag-hTRAIL(95-291) und Flag-mTRAIL(99-291) transient in HEK293-Zellen produziert und durch Affinitätschromatographie mit anti-Flag mAb M2-Agarose gereinigt.

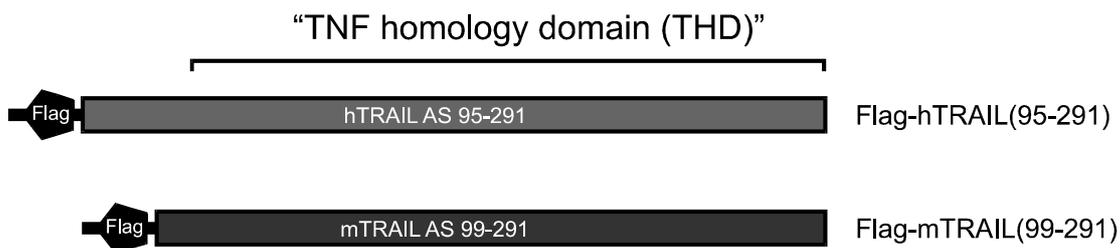


Abbildung 4: Struktur von Flag-hTRAIL(95-291) und Flag-mTRAIL(99-291); Flag = Flag-Epitop (DYKDDDDK)

Zunächst wurde die zytotoxische Aktivität von Flag-hTRAIL(95-291) und Flag-mTRAIL(99-291) auf KB-Zellen (humaner Ursprung) und L929-Zellen (muriner Ursprung) untersucht. Auf L929-Zellen induzierten sogar 1000 ng/ml dieser Moleküle weniger als 25% Apoptose. Wurden die beiden Liganden jedoch mit einem Flag-spezifischen Antikörper quervernetzt, induzierten sie auf L929-Zellen Zelltod, Flag-hTRAIL(95-291) bis zu einer Konzentration von 1 ng/ml, Flag-mTRAIL(99-291) dagegen nur mit 50 ng/ml. Im Gegensatz zu den L929-Zellen kann Flag-hTRAIL(95-291) auf KB-Zellen noch bis zu einer Konzentration von 10 ng/ml Apoptose induzieren. Quervernetzt man Flag-hTRAIL(95-291) mit einem anti-Flag-Antikörper, wird seine Aktivität noch weiter verstärkt. Auch die mTRAIL-Variante kann bei hohen Konzentrationen auf KB-Zellen nach sekundärem Quervernetzen Apoptose auslösen (Abb.5).

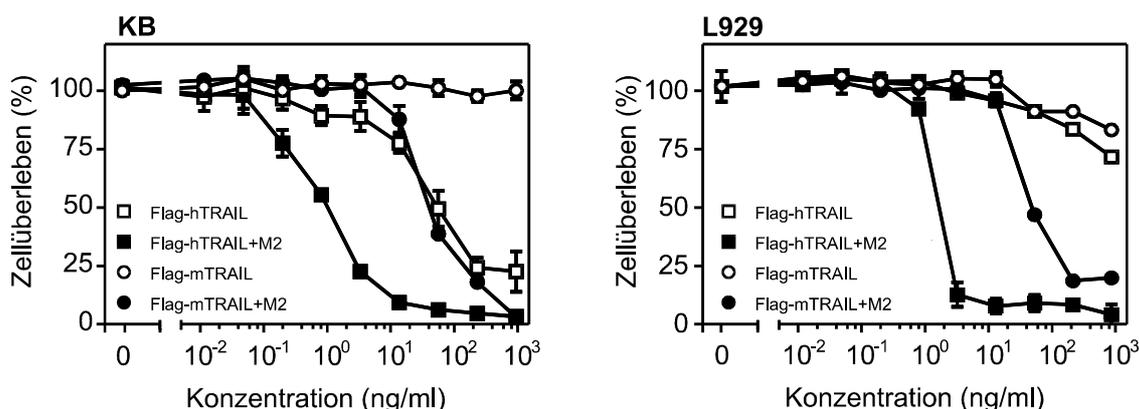


Abbildung 5: KB-Zellen und L929-Zellen wurden auf 96-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 2,5 µg/ml CHX für Apoptose sensitiviert und dann mit verschiedenen Konzentrationen von Flag-hTRAIL(95-291) und Flag-mTRAIL(99-291) in An- und Abwesenheit von 3 µg/ml anti-Flag mAb M2 in Dreifachwerten stimuliert. Die Vitalität wurde durch Kristallviolett färbung bestimmt.

Durch dieses Experiment wurde deutlich, dass nicht-quervernetztes Flag-hTRAIL(95-291) auf KB- und L929-Zellen unterschiedliche zytotoxische Aktivität besitzt. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass TRAILR2 von löslichem trimeren TRAIL nach sekundärem Quervernetzen viel besser aktiviert werden kann als ohne Quervernetzen. Im Gegensatz dazu kann der TRAILR1 von quervernetztem und nicht-quervernetztem TRAIL gleich gut aktiviert werden (Mühlenbeck et al. 2000; Wajant et al. 2001). Deshalb sind nicht-quervernetzte TRAIL-Trimere fähig, auf KB-Zellen, die sowohl TRAILR1 als auch TRAILR2 exprimieren, über TRAILR1 Apoptose auszulösen. Im Gegensatz dazu ist die durch TRAILR1 ausgelöste Apoptose bei der murinen L929-Zelllinie nicht relevant, da bei Mäusen nur ein zum TRAILR2 homologer Todesrezeptor existiert (Wu et al. 1999; Schneider et al 2003). Im Einklang mit diesen Befunden steht, dass auf humanen Jurkat-Zellen, die nur TRAILR2 exprimieren, nicht-quervernetztes Flag-hTRAIL(95-291) praktisch inaktiv ist (Abb. 6).

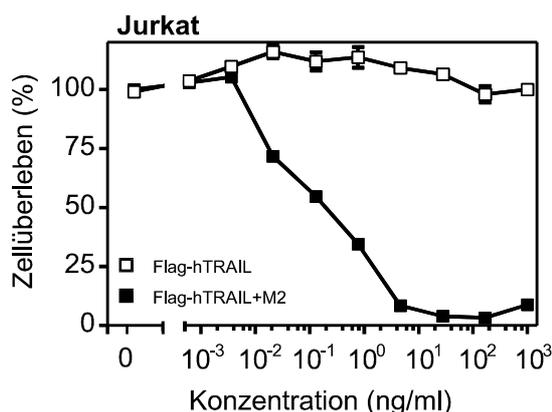


Abbildung 6: Jurkat-Zellen wurden auf 96-Well-Platten ausgesät und mit der angegebenen Konzentration von Flag-hTRAIL(95-291) in An- und Abwesenheit von anti-Flag mAb M2 in Dreifachwerten stimuliert. Die Vitalität wurde mit dem MTT-Assay bestimmt.

6.1.2 Die THD-Domäne von mTRAIL ist für die Rezeptorbindung nicht ausreichend

In den nächsten Versuchen wurde in FACS-Analysen die Fähigkeit von Flag-hTRAIL(95-291) und Flag-mTRAIL(99-291), an ihre korrespondierende zellgebundene Rezeptoren zu binden, untersucht. Dazu wurden KB- und L929-Zellen mit steigenden Konzentrationen der TRAIL-Varianten auf Eis inkubiert. Nachdem alle ungebundenen

Moleküle durch mehrere Waschschriffe entfernt wurden, wurden die verbleibenden zellgebundenen Liganden mit einem anti-Flag mAb M2 und einem PE-markierten sekundären Antikörper detektiert. Flag-hTRAIL(95-291) konnte an die humanen und an die murinen TRAIL-Rezeptoren bis zu einer Konzentration von 40 ng/ml und 600 ng/ml binden. Im Gegensatz dazu war murines TRAIL auf L929-Zellen nur schwach und auf KB-Zellen gar nicht in der Lage, an den Rezeptor zu binden (Abb. 7). Die Bindungsunfähigkeit des murinen Liganden änderte sich auch nicht, wenn er vor der FACS-Färbung mit dem M2-Antikörper vorinkubiert wurde.

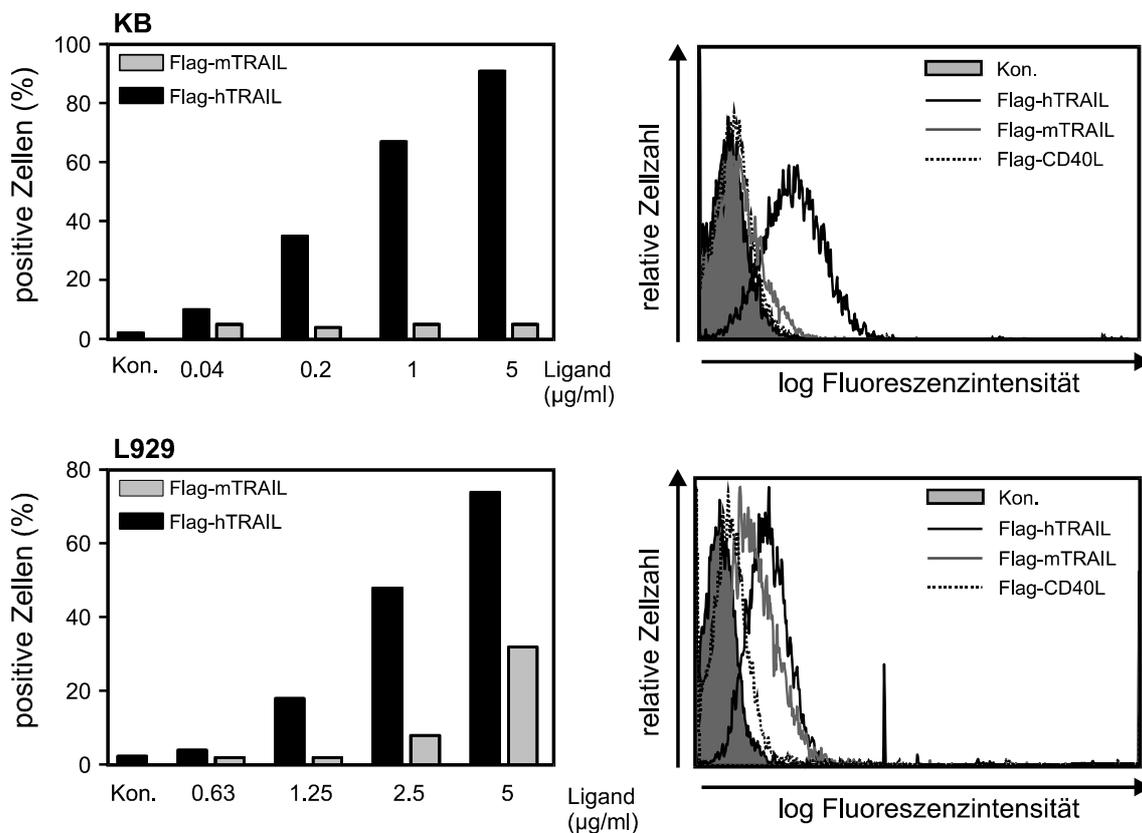


Abbildung 7: KB-Zellen und L929-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Flag-hTRAIL(95-291) und Flag-mTRAIL(99-291) auf Eis inkubiert. Nach mehreren Waschschriffen wurden die gebundenen Liganden in FACS-Analysen mit einem anti-Flag mAb M2-Antikörper und einem PE-gelabelten anti-Maus IgG-Sekundär-Antikörper detektiert. Eine lösliche, N-terminal Flag-getaggte Variante von humanem CD40L wurde als Kontrolle benutzt. Links wird die Prozentzahl der positiv „getageten“ Zellen gezeigt, rechts ein Histogramm von den Proben, die mit der höchsten Ligandenkonzentration behandelt wurden.

Eine mögliche Erklärung, warum Flag-mTRAIL(99-291) nur schwach mit seinen korrespondierenden Rezeptoren interagieren kann, ist, dass seine THD-Domäne für eine hinreichende Trimerisierung nicht ausreichend ist. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden die verschiedenen rekombinanten Liganden mittels chemischen Crosslinkens und Gelfiltration analysiert. Wurde Flag-hTRAIL(95-291) mit steigenden Konzentrationen des homobifunktionalen Crosslinkers BS³ behandelt, bildeten sich Dimere und Trimere. Chemisches Crosslinken des murinen Liganden führte gleichfalls zur Bildung von Dimeren und Trimeren mit einer ähnlichen BS³-Dosisabhängigkeit (Abb. 8).

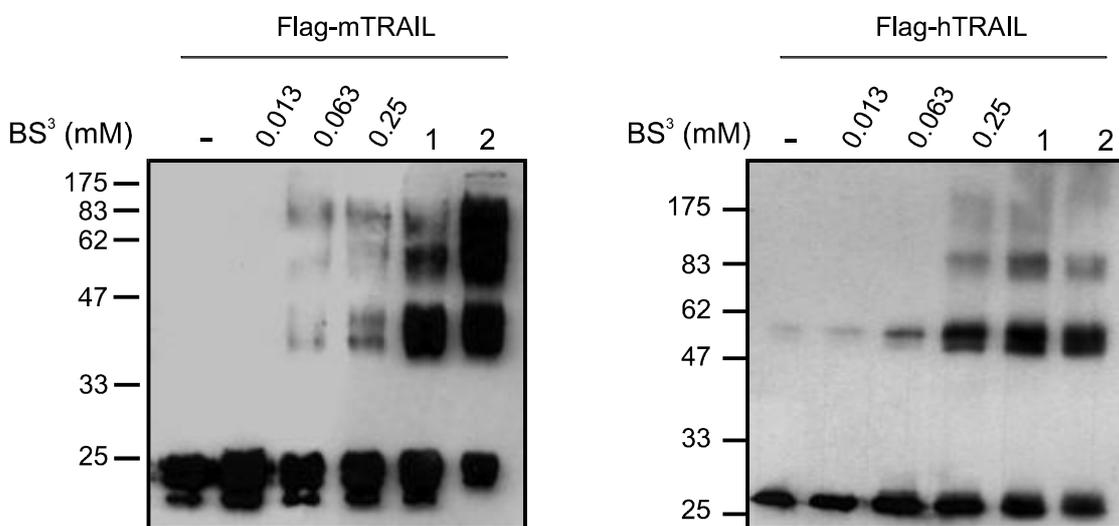


Abbildung 8: Die Proteine wurden mit steigenden Konzentrationen des chemischen Crosslinkers BS³ auf Eis inkubiert und nach Abstoppen der Reaktion unter reduzierenden Bedingungen im Western Blot analysiert. Um die Proteine zu detektieren, wurde ein anti-Flag mAb M2-Antikörper verwendet.

Da in den Crosslinking-Experimenten kein Unterschied in der Fähigkeit des murinen und humanen Liganden, Trimere zu bilden, gezeigt werden konnte, wurden Gelfiltrationsstudien durchgeführt, um den humanen und murinen Liganden genauer zu charakterisieren. Sowohl bei Flag-mTRAIL(99-291) (Abb. 9, Peak 1) als auch bei Flag-hTRAIL(95-291) (Abb. 9, Peak 1) ergab sich nach der Gelfiltration ein hochmolekularer Peak, der inaktive TRAIL-Aggregate enthält. Außerdem waren Flag-mTRAIL(99-291) in einem zweiten Peak bei einer molekularen Masse von 75-90 kDa (Abb. 9, Peak 2, 3) und Flag-hTRAIL(95-291) bei einer molekularen Masse von 125 kDa (Abb. 9, Peak 2) zu finden, was auf eine trimere Organisation der Moleküle schließen lässt. Flag-

mTRAIL(99-291) wurde zusätzlich in einem Peak bei einer molekularen Masse von 35 kDa gefunden, was einem monomeren Protein entspricht (Abb. 9, Peak 4). Es geht demnach aus diesen Analysen hervor, dass sowohl Flag-hTRAIL(95-291) als auch Flag-mTRAIL(99-291) Trimere bilden (Abb.9).

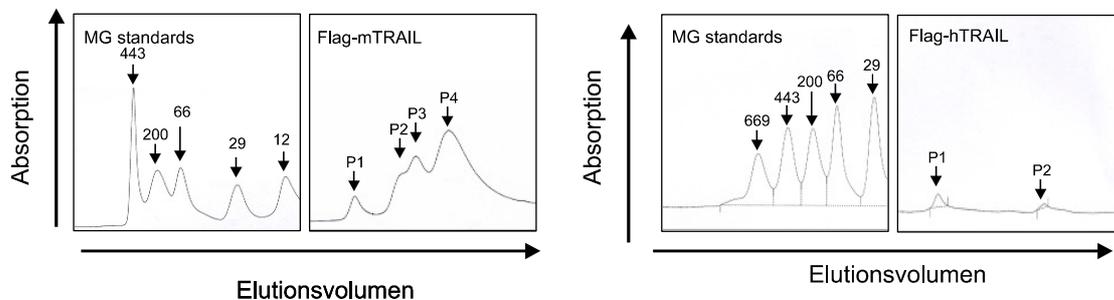


Abbildung 9: Flag-mTRAIL(99-291) und Flag-hTRAIL(95-291) wurden durch Gel-filtrationschromatographie analysiert. Dazu wurden eine BioSep-SEC-S3000 und eine BioSep-SEC-2000 Säule verwendet. Als Marker für die molekularen Massen wurden Thyroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa), β -Amylase (200 kDa), Serum Albumin (66 kDa), Carbonanhydrase (29 kDa) und Cytochrom c (12,4 kDa) verwendet.

6.1.3 Die kovalente Stabilisierung der trimeren Struktur von mTRAIL vermittelt Rezeptorbindung und Crosslinking-abhängige Aktivität

Bis jetzt geht aus den Ergebnissen hervor, dass Flag-mTRAIL(99-291) genauso wie Flag-hTRAIL(95-291) Trimere bildet. Die Fähigkeit der THD, Trimere zu bilden, ist jedoch für mTRAIL allein wohl nicht ausreichend, eine gute Rezeptorbindung zu gewährleisten. Um zu untersuchen, ob zusätzliche Strukturen außerhalb der THD nötig sind, eine erfolgreiche Rezeptorbindung zu vermitteln, wurde Flag-mTRAIL(43-291), eine lösliche Variante von mTRAIL, die die Stammregion besitzt, kloniert (Abb. 10) und in HEK293-Zellen transient produziert. Die Stammregion trennt die THD-Domäne von TRAIL von seiner Transmembrandomäne. Im Vergleich zu Flag-hTRAIL(95-291) besitzt Flag-mTRAIL(43-291) jedoch noch immer nur eine schwache zytotoxische Aktivität, wenn auch etwas mehr als mTRAIL(99-291) (Abb. 11d). Auch Membran-mTRAIL induziert bei KB-Zellen Apoptose (Abb. 11e). Um die Bedeutung der Stammregion bei den Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie für die Apoptoseinduktion und Rezeptorbindung genauer zu untersuchen, wurden zusätzlich verschiedene Varianten von CD95L konstruiert (Abb. 10). In vorangehenden Versuchen konnte gezeigt werden,

dass auch trimerer löslicher muriner CD95L weder an seinen Rezeptor binden noch Apoptose auslösen kann (Berg et al 2007).

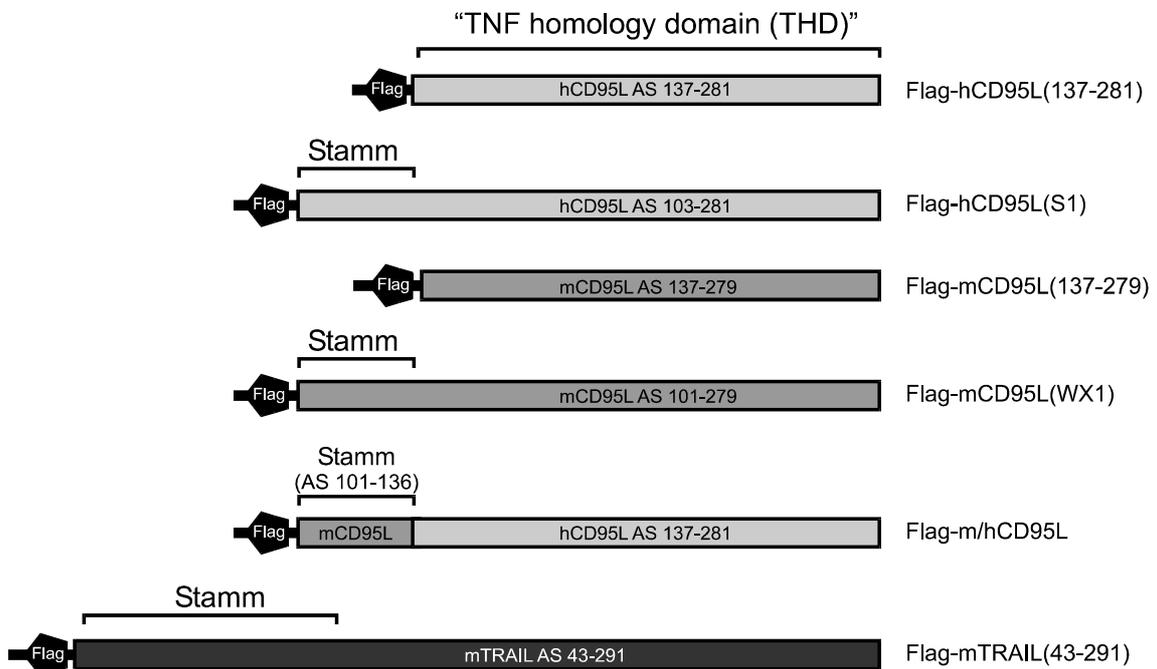


Abbildung 10: Struktur der verschiedenen TRAIL- und CD95L-Varianten mit Stammregion (Region zwischen der Transmembrandomäne und der THD).

Die Gruppe von Nagata konnte jedoch zeigen, dass eine Variante des mCD95L(101-279; WX1), die die Stammregion besitzt, biologisch aktiv ist. Desweiteren ist Flag-mCD95L (WX1) auch ohne sekundäres Quervernetzen aktiv (Abb. 11a) und bildet 50% Oligomere an Stelle von Trimeren (Suda et al. 1996; Berg et al. 2007). Die humane Flag-getaggte Variante von WX1, S1 genannt, zeigt ebenso eine signifikante Aktivität, die jedoch durch sekundäres Quervernetzen noch deutlich verstärkt werden kann (Abb. 11b). So war die spezifische Aktivität von quervernetztem Flag-hCD95L(S1) 100-fach schwächer, verglichen mit dem quervernetztem Flag-hCD95L(137-281). Desweiteren zeigte ein chimerer Ligand, der die Stammregion des mC95L und die THD des hCD95L besitzt, eine signifikante Crosslinking-unabhängige Fähigkeit, CD95 zu stimulieren (Abb. 11c).

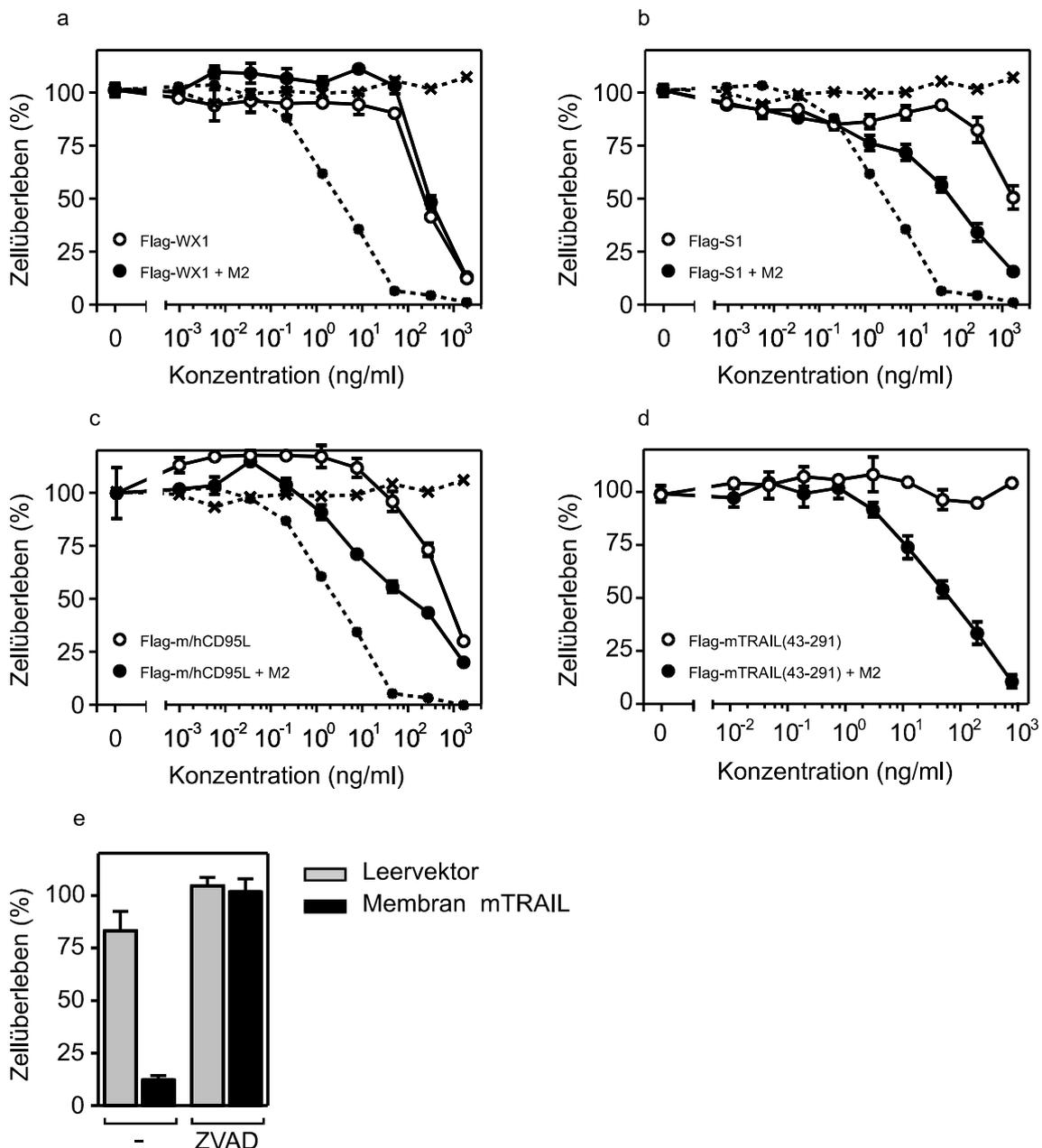


Abbildung 11: KB-Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den entsprechenden Konzentrationen von M2-quervernetzten und nicht-quervernetzten Liganden in Gegenwart von 2,5 µg/ml CHX stimuliert: (a) Flag-mCD95L (WX1), (b) Flag-hCD95L (S1), (c) Flag-m/hCD95L, (d) Flag-mTRAIL(43-291). Die Vitalität wurde durch Kristallviolett färbung bestimmt. Der zytotoxische Effekt von Flag-hCD95L(137-281) und M2-quervernetzten Flag-hCD95L(137-281) wurde als Vergleich parallel durchgeführt (gestrichelte Linie). (e) KB-Zellen, die mit 2,5 µg/ml CHX sensitiviert wurden, wurden mit einer 1:5 Verdünnung von Membran-mTRAIL Lysat stimuliert. Nach 18 Stunden wurde die Vitalität durch Kristallviolett färbung bestimmt. Um zu zeigen, dass Membran-mTRAIL Caspase-vermittelt Apoptose induziert, wurde der Caspase-Inhibitor Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone (ZVAD) (20 µM) hinzugegeben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Stammregion bei manchen Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie, zum Beispiel beim murinen CD95L, die Fähigkeit besitzt, sekundär aggregierte Trimere zu bilden. Die unterschiedliche Bioaktivität von Varianten eines löslichen Liganden mit und ohne Stammregion kann dadurch erklärt werden, dass Aminosäuren außerhalb der THD-Domäne nötig sind, den nötigen Kontakt mit ihren entsprechenden Rezeptoren herzustellen. Eine andere Erklärung könnte jedoch auch sein, dass die THD eines solchen Liganden schon alle strukturellen Informationen für die Rezeptorbindung latent besitzt, jedoch zusätzlich Fixierung und Stabilisierung der trimeren Struktur nötig ist, um biologisch aktiv zu werden.

Um zu untersuchen, ob die schwache Bioaktivität von mTRAIL ohne Stammregion auf unzureichender Stabilität und Fixierung der THD-Domäne beruht, wurde ein Fusionsprotein dieses Liganden konstruiert. Die Flexibilität des N-Terminus wurde dabei durch die Fusion mit einer kleinen Protein-Domäne von Hühner Tenascin-C (TNC), welche kovalent gebundene Trimer bildet, eingeschränkt. Die Tenascin-C Trimerisierungsdomäne besteht aus ca. 30 Aminosäuren (Kammerer et al. 1998) (Abb. 12).

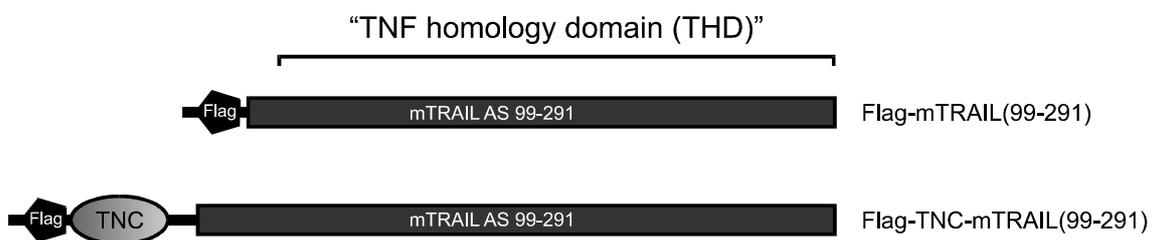


Abbildung 12: Struktur von Flag-mTRAIL(99-291) und Flag-TNC-mTRAIL(99-291); TNC = Trimerisierungsdomäne von Hühner Tenascin-C (Aminosäure 110-139).

In Gelfiltrationsstudien ergab sich für Flag-TNC-mTRAIL(99-291) ein Peak (Abb.13 c Peak1) bei 85 kDa, was für eine trimere Organisation des Liganden spricht. Wie schon in Abbildung 9 beschrieben, geht aus den Gelfiltrationsstudien hervor, dass auch Flag-mTRAIL(99-291) Trimere bildet. Desweiteren zeigte sich auch in SDS-PAGE-Analysen und Silberfärbung unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen (Abb. 13b) und Crosslinking-Experimenten (Abb.13c), dass das TNC-mTRAIL-Fusionsprotein Trimere bildet, aber keine sekundären Aggregate. Die THD von mTRAIL bildet demnach Trimere, unabhängig von der Anwesenheit einer TNC-Domäne.

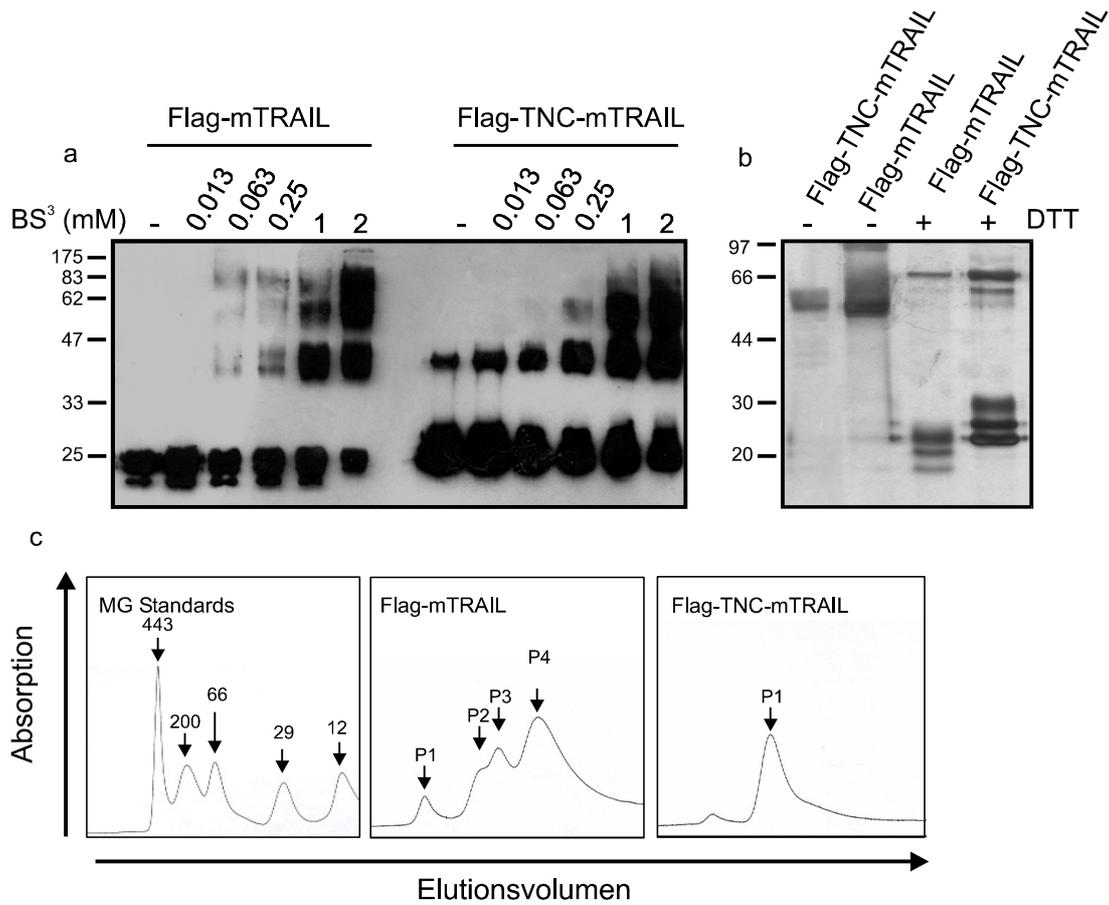


Abbildung 13: Flag-TNC-mTRAIL(99-291) und Flag-mTRAIL(99-291) wurden in HEK293-Zellen produziert und durch eine M2-Affinitätschromatographie aufgereinigt. (a) Die Liganden wurden mit steigenden Konzentrationen des chemischen Crosslinkers BS³ auf Eis inkubiert und nach Abstoppen der Reaktion unter reduzierenden Bedingungen im Western Blot analysiert. Um die Proteine zu detektieren, wurde ein anti-Flag mAb M2-Antikörper verwendet. (b) Die gereinigten Liganden wurden unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen in SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. (c) Außerdem wurden Gelfiltrationsanalysen durchgeführt, wofür eine BioSep-Sec-S2000 Säule verwendet wurde. Als Marker wurden Thyroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa), β -Amylase (200 kDa), Serum Albumin (66 kDa), Carbon Anhydrase (29 kDa) und Cytochrom c (12,4 kDa) verwendet.

Hinsichtlich ihrer funktionellen Fähigkeiten unterscheiden sich jedoch die mTRAIL-Ligand-Varianten mit und ohne TNC-Domäne stark. Wie in Abbildung 5 und 7 gezeigt, kann Flag-mTRAIL(99-291) selbst nach Quervernetzen nur schwach mit seinem Rezeptor interagieren und kaum Apoptose auslösen. Im Gegensatz dazu zeigt Flag-TNC-mTRAIL(99-291) eine effektive Rezeptorbindung und nach sekundärem Quervernetzen eine signifikante Apoptoseinduktion bei KB- und L929-Zellen (Abb. 14, 15).

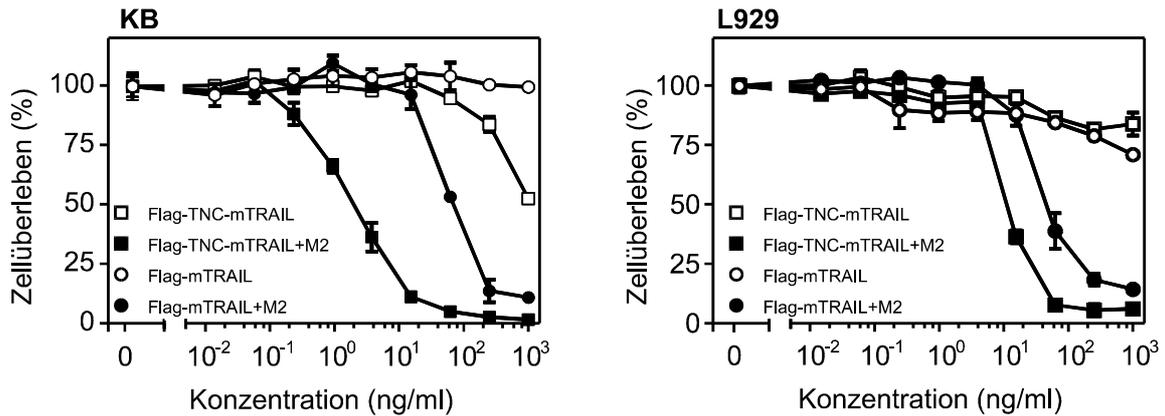


Abbildung 14: KB- und L929-Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 2,5 µg/ml CHX sensitiviert und mit der entsprechenden Menge Flag-TNC-mTRAIL(99-291) und Flag-mTRAIL(99-291) in An- und Abwesenheit von M2 in Dreifachwerten stimuliert. Nach 18 Stunden wurde die Vitalität durch Kristallviolett-färbung bestimmt.

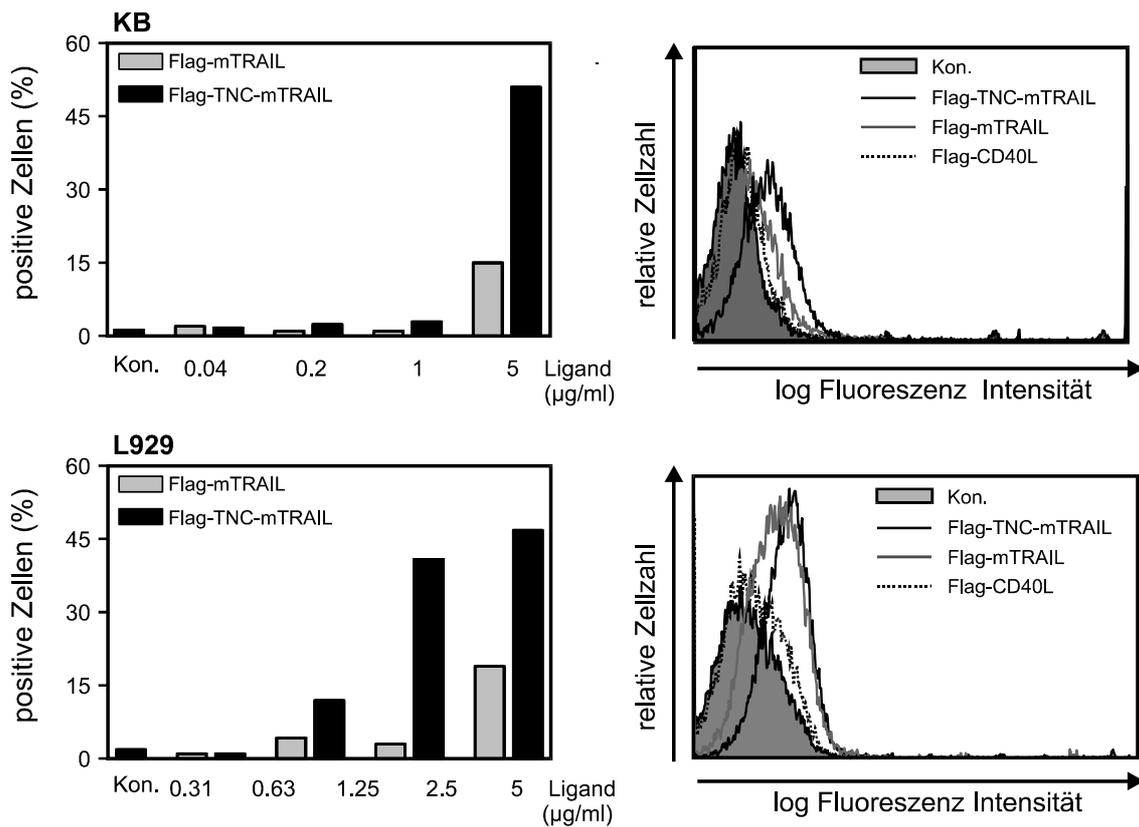


Abbildung 15: KB-Zellen und L929-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Flag-mTRAIL(99-291) und Flag-TNC-mTRAIL(99-291) auf Eis inkubiert. Nach mehreren Waschschriffen wurden die zellgebundenen Liganden durch FACS-Färbung mit einem anti-Flag mAb M2-Antikörper und einem PE-gelabelten anti Maus IgG-Sekundärantikörper detektiert.

Es besteht nun die Möglichkeit, dass die TNC-mTRAIL-Variante nur deswegen besser an seine Rezeptoren binden und effektiver Apoptose induzieren kann als die TNC-freie mTRAIL-Variante, weil die Position seines Flag-Epitops relativ zur THD weiter entfernt ist als bei Flag-mTRAIL(99-291). Um dies auszuschließen, wurde die mTRAIL-Variante Flag-L-mTRAIL(99-291) konstruiert. Bei dieser ist das Flag-Epitop von der THD des Moleküls durch einen „Linker“, der die gleiche Länge wie die TNC-Domäne besitzt, getrennt. Es zeigte sich, dass diese Variante auch nach sekundärem Quervernetzen nur eine schwache Fähigkeit besitzt, Apoptose zu induzieren (Abb. 16). Die Position des Flag-Tags relativ zur THD-Domäne hat daher offensichtlich keine Relevanz für die Aktivität vom rekombinanten TRAIL.

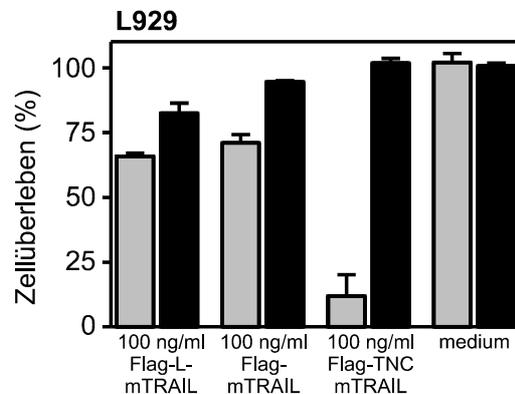


Abbildung 16: L929-Zellen wurden mit der angegebenen Konzentration an Flag-Linker-, Flag- und Flag-TNC-mTRAIL(99-291) in An- (graue Balken) und Abwesenheit (schwarze Balken) des anti-Flag mAb M2-Antikörpers in Dreifachweten über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden mit 2,5 µg/ml CHX vorinkubiert. Die Vitalität wurde durch Kristallviolett-färbung ermittelt.

6.1.4 Flag-TNC-hTRAIL besitzt eine höhere spezifische Bioaktivität als Flag-hTRAIL

Um zu testen, ob die Rezeptorbindung und zytotoxische Aktivität von Flag-hTRAIL(95-291) durch die Fusion mit der TNC-Domäne auch verbessert wird, wurde von diesem Liganden auch die entsprechende TNC-Variante konstruiert (Abb. 17).

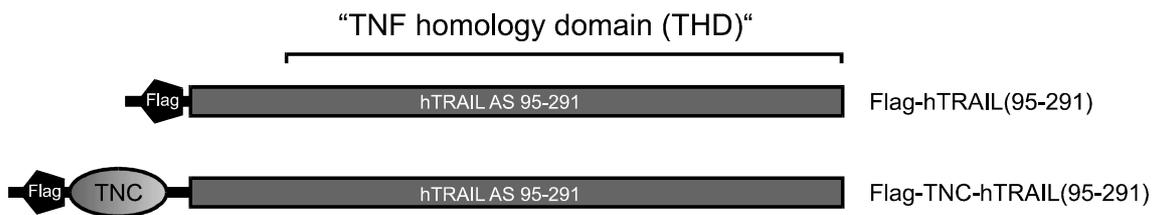


Abbildung 17: Struktur von Flag-hTRAIL(95-291) und Flag-TNC-hTRAIL(95-291); TNC = Trimerisierungsdomäne von Hühner Tenascin-C (Aminosäure 110-139).

Im SDS-PAGE und Silbergel unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen (Abb. 18b) und im Crosslinking Experiment mit BS³ (Abb. 18a) konnte gezeigt werden, dass Flag-TNC-hTRAIL(95-291) genauso wie Flag-hTRAIL(95-291) Trimere bildet. Dieser Befund konnte auch in Gelfiltrationsanalysen bestätigt werden. Es ergaben sich bei Flag-TNC-hTRAIL(95-291) und Flag-hTRAIL(95-291) zwei Peaks, von denen der Erste (Abb. 18c; Peak 1) hochmolekulare inaktive Aggregate enthält. Der Zweite (Abb. 18c; Peak 2) war bei einer molekularen Masse von 125 kDa zu finden, was auf eine trimere Organisation der Moleküle schließen lässt. Demnach ergibt sich hier für die TNC-hTRAIL-Variante dasselbe Ergebnis wie für die TNC-mTRAIL-Variante. Die THD-Domäne von hTRAIL bildet Trimere und keine Aggregate, unabhängig von der Anwesenheit der TNC-Domäne.

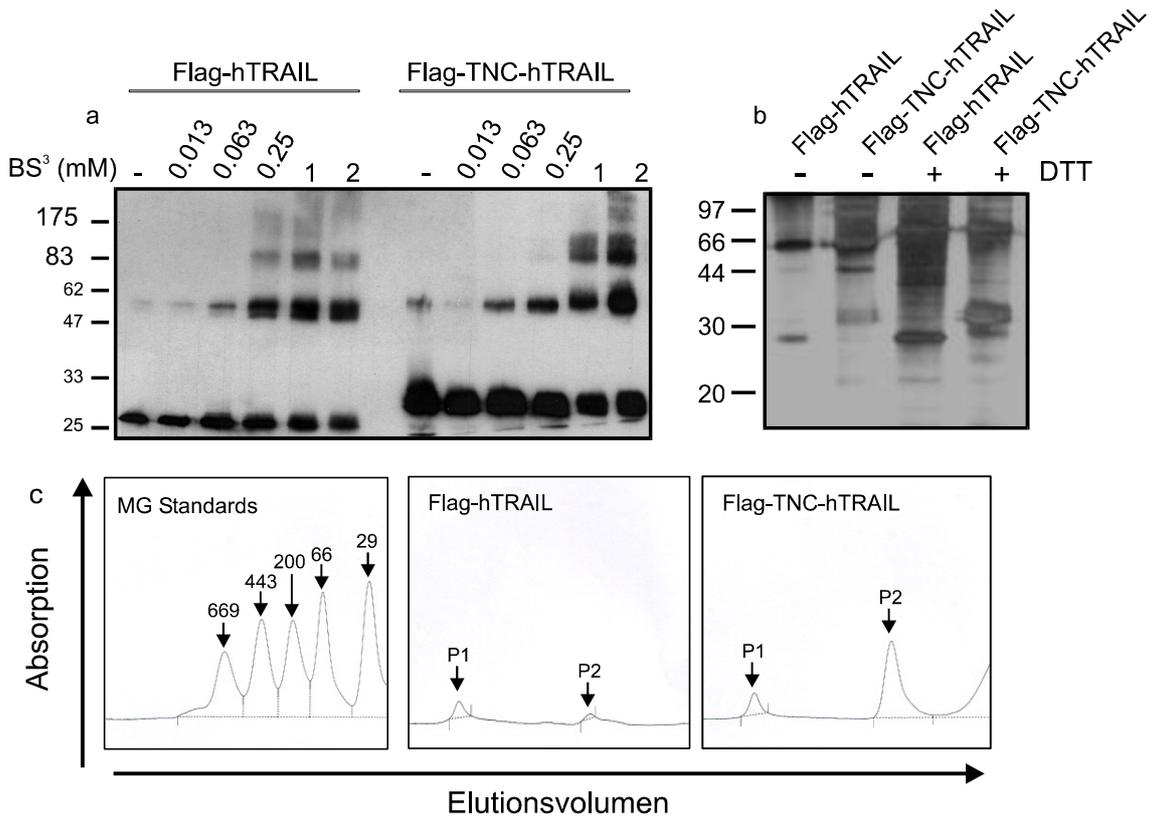


Abbildung 18: Flag-TNC-hTRAIL(95-291) und hTRAIL(95-291) wurden in HEK293-Zellen produziert und durch M2-Affinitätschromatographie aufgereinigt. (a) Die Liganden wurden mit steigenden Konzentrationen des chemischen Crosslinkers BS³ auf Eis inkubiert und nach Abstoppen der Reaktion unter reduzierenden Bedingungen im Western Blot analysiert. Um die Proteine zu detektieren, wurde ein anti-Flag mAb M2-Antikörper verwendet. (b) Die gereinigten Liganden wurden unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen in SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. (c) Außerdem wurden Gelfiltrationsanalysen durchgeführt, wofür eine BioSep-Sec-S3000 Säule verwendet wurde. Als Marker der molekularen Masse wurde Thyroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa), β -Amylase (200 kDa), Serum Albumin (66 kDa), Carbon Anhydrase (29 kDa) und Cytochrom c (12,4 kDa) verwendet..

Wie auch die mTRAIL-Liganden-Varianten mit und ohne TNC-Domäne unterscheiden sich auch Flag-TNC-hTRAIL(95-291) und Flag-hTRAIL(95-291) hinsichtlich ihrer funktionellen Fähigkeiten. So konnte das TNC-hTRAIL-Fusionsprotein deutlich besser als der entsprechende Ligand ohne TNC-Domäne an die zellständigen TRAIL-Rezeptoren von KB- und L929-Zellen binden (Abb. 19). Auch bei der Apoptoseinduktion zeigte Flag-TNC-hTRAIL(95-291) eine deutlich höhere spezifische Bioaktivität als der TNC-freie Ligand. Wurde Flag-TNC-hTRAIL(95-291) quervernetzt, konnte seine Aktivität noch weiter gesteigert werden. So induzierte nun Flag-TNC-hTRAIL(95-291) auf KB- und L929-Zellen 100-200-fach besser Apoptose als Flag-hTRAIL(95-291)

(Abb. 20). Trotz seiner hohen spezifischen Bioaktivität ist nur quervernetztes Flag-TNC-hTRAIL(95-291) in der Lage den TRAILR2 zu aktivieren. Dies konnte an Jurkat-Zellen gezeigt werden, die nur den TRAILR2 exprimieren. (Abb.21).

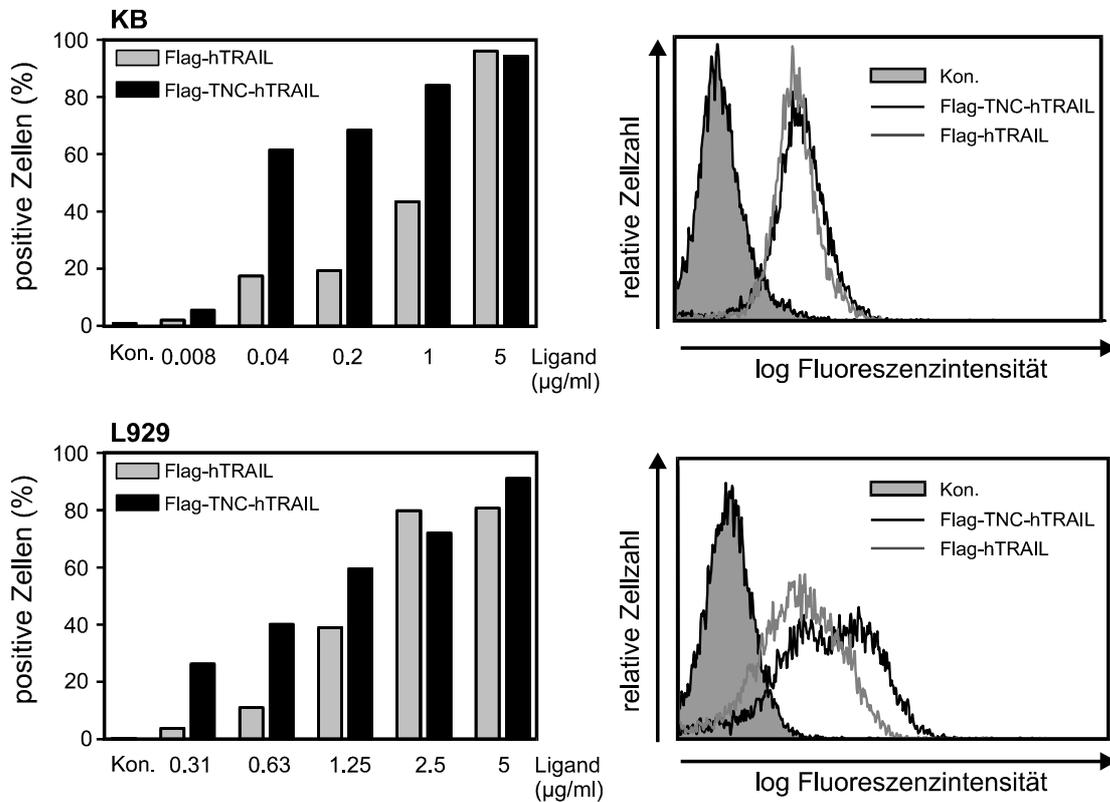


Abbildung 19: Die verschiedenen Zelllinien wurden mit den entsprechenden Konzentrationen von Flag-TNC-hTRAIL(95-291) und Flag-hTRAIL(95-291) auf Eis inkubiert. Nach mehreren Waschschrinen wurden die gebundenen Proteine durch FACS-Analysen mit einem anti-Flag mAb M2 und einem PE-gelabelten anti Maus IgG-Antikörper detektiert.

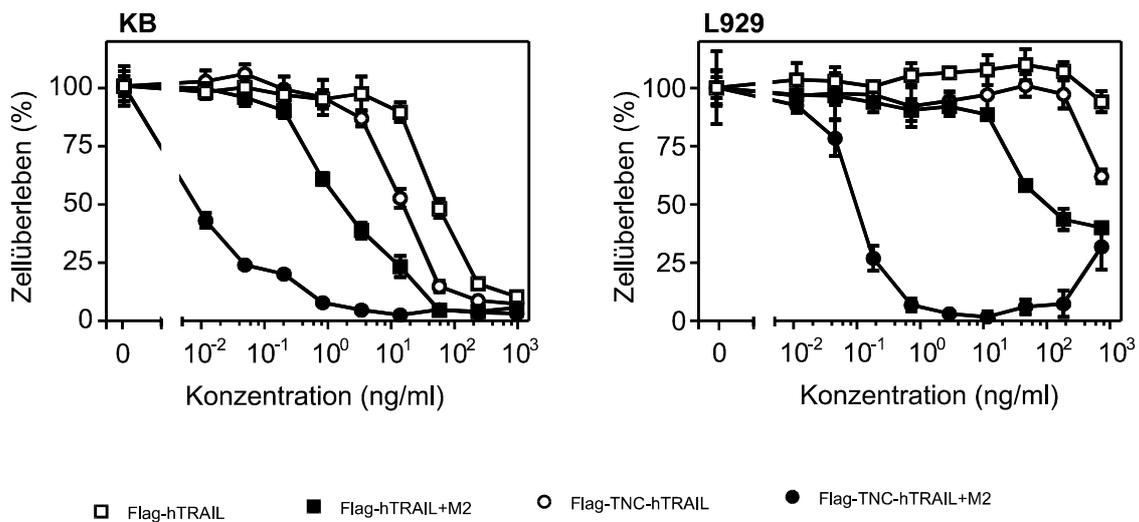


Abbildung 20: KB- und L929-Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 2,5 µg/ml CHX sensitiviert und 18 Stunden mit der entsprechenden Menge von Flag-hTRAIL(95-291) und Flag-TNC-hTRAIL(95-291) in An- und Abwesenheit von M2 in Dreifachwerten stimuliert. Die Vitalität wurde durch Kristallviolett-färbung bestimmt.

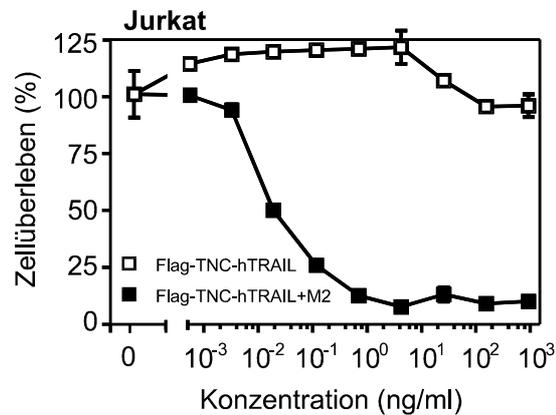


Abbildung 21: Jurkat-Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 18 Stunden mit der angegebenen Menge von Flag-TNC-hTRAIL(95-291) in An- und Abwesenheit von M2 in Dreifachwerten stimuliert. Die Vitalität wurde durch den MTT-Assay bestimmt.

6.2 Untersuchung proinflammatorischer Signalwege in TRAIL stimulierten Myelomzellen

6.2.1 Flag-TNC-hTRAIL induziert Apoptose, aber auch proinflammatorische Signalwege in Myelomzelllinien

Im ersten Teil meiner Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Flag-TNC-hTRAIL-Fusionsprotein sehr effektiv an seinen Rezeptor binden und Apoptose induzieren kann. TRAIL kann jedoch über seine Todesrezeptoren nicht nur Apoptose auslösen, sondern auch proinflammatorische Signalwege wie z.B. den NFκB- und JNK-Signalweg aktivieren (Wajant 2004), was insbesondere in apoptoseresistenten Zellen die Aufrechterhaltung eines protumoralen und entzündungsstimulierenden Mikromilieus des Tumors unterstützen kann (Wajant et al 2004). Somit können sich bei der Anwendung von TRAIL als Therapeutikum limitierende Bedingungen ergeben. In letzter Zeit wird TRAIL als neues Therapeutikum für die Behandlung des Multiplen Myeloms diskutiert. Da über die proinflammatorischen Signalwege durch TRAIL beim Multiplen Myelom noch nicht viel bekannt ist, sollte nun die Wirkung von Flag-TNC-hTRAIL auf die Apoptoseinduktion und die Aktivierung von proinflammatorischen Signalwegen, wie den JNK- oder NFκB-Signalweg, bei diesen Zellen untersucht werden.

Zunächst wurden die fünf Myelomzelllinien AMO1, KMS-12BM, MOLP8, INA6 und RPMI8226 hinsichtlich der Expression der vier TRAIL-Rezeptoren untersucht. Alle fünf Myelomzelllinien zeigten eine unterschiedlich starke Expression der beiden TRAIL-Todesrezeptoren und eine signifikante Expression des „Decoy-Rezeptors“ TRAILR4. TRAILR3 war kaum nachzuweisen (Abb. 22).

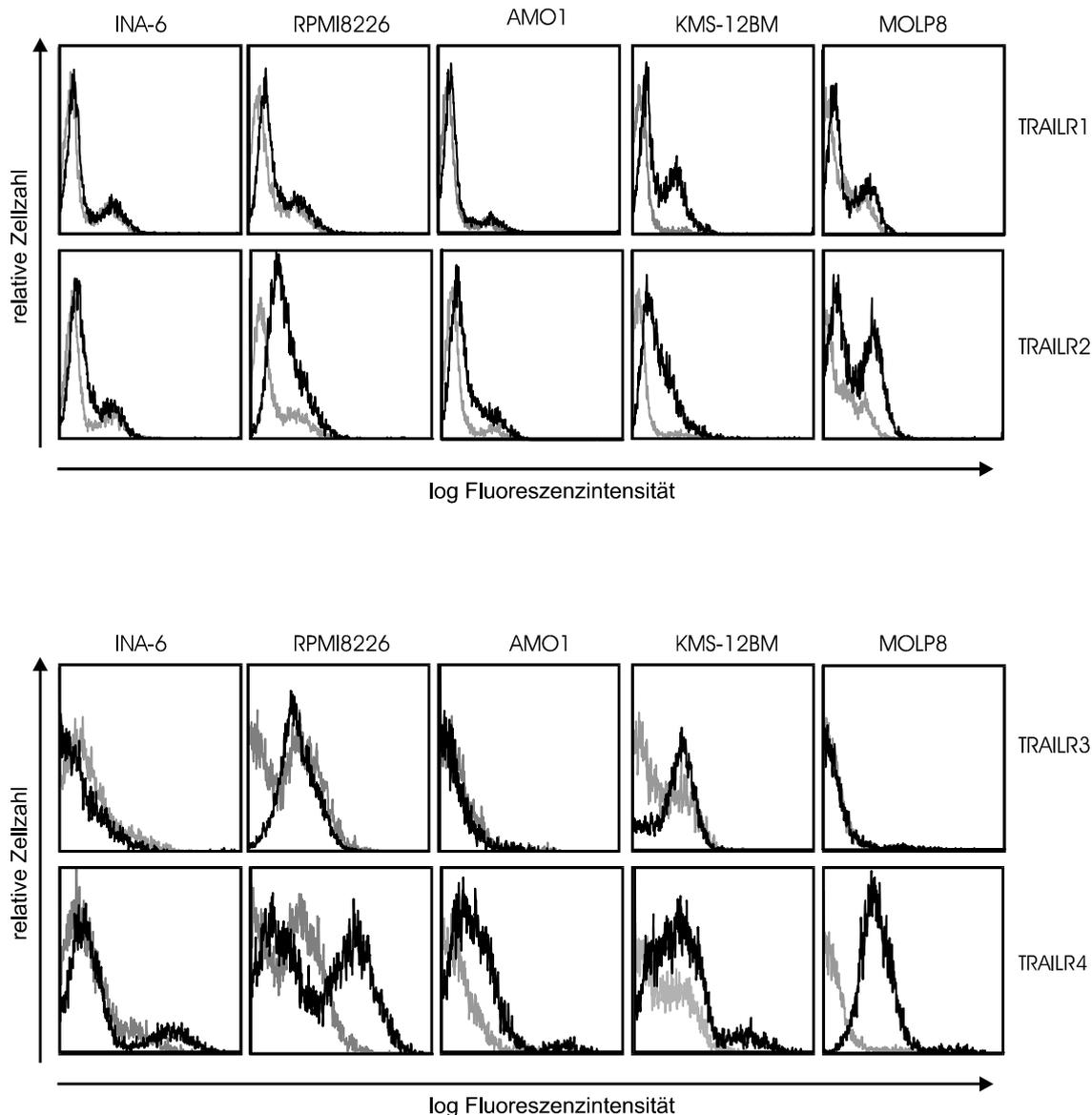
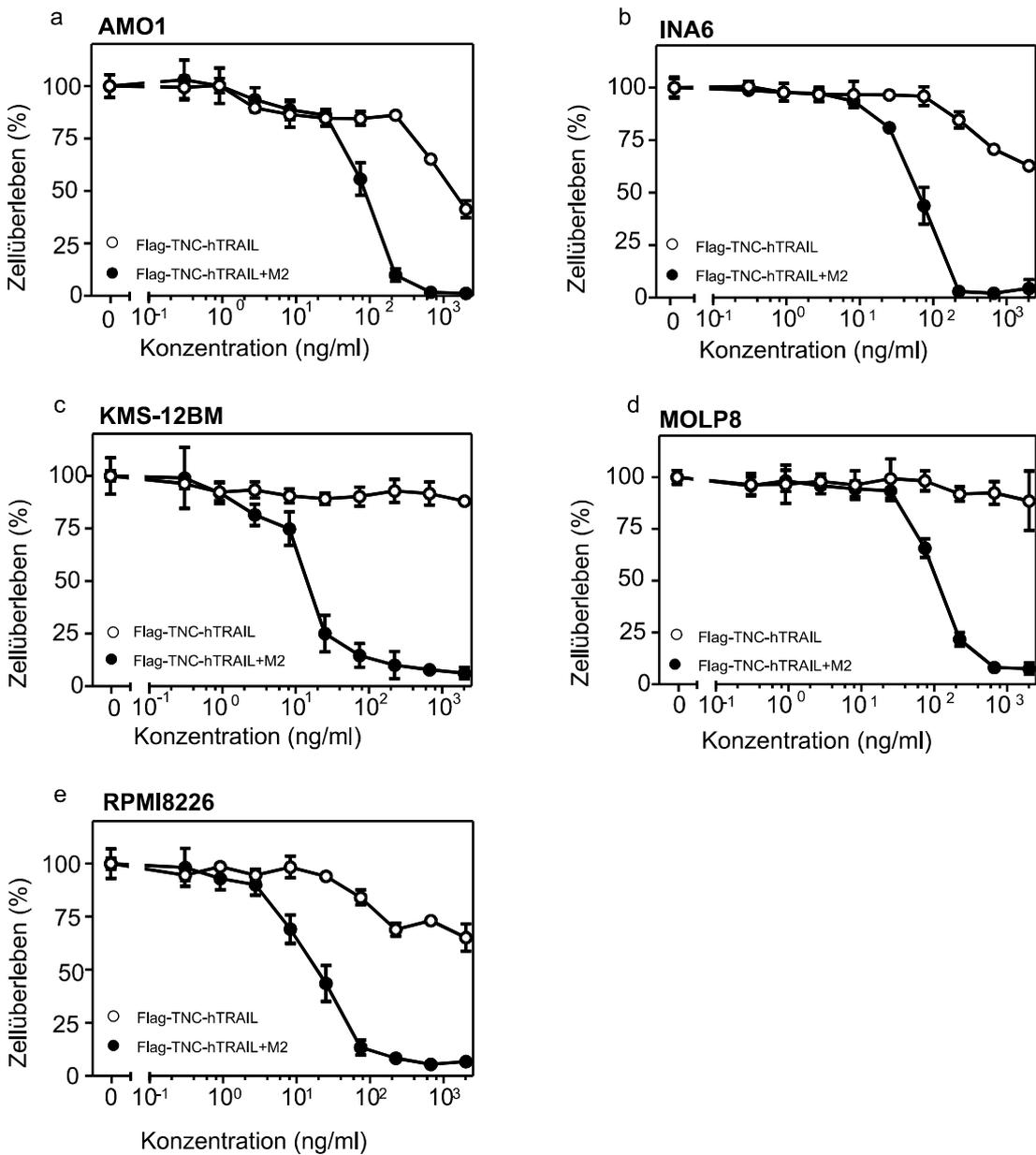


Abbildung 22: Die Myelomzelllinien wurden mit monoklonalen, PE-markierten, für die TRAILR1 und TRAILR2 spezifischen Antikörpern (schwarz) und den entsprechenden Kontrollantikörpern (grau) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die gebundenen Antikörper im FACS nachgewiesen. Für den Nachweis von TRAILR3 und TRAILR4 wurden die Myelomzelllinien mit monoklonalen gegen die beiden Decoy-Rezeptoren spezifischen Antikörpern (schwarz) und den entsprechenden Kontrollantikörpern (grau) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die gebundenen Antikörper mit PE-markierten Sekundärantikörpern im FACS nachgewiesen.

In Einklang mit der Expression der TRAIL-Todesrezeptoren stand auch, dass bei allen fünf Myelomzelllinien Flag-TNC-hTRAIL nach sekundärem Quervernetzen fast vollständig Apoptose induzieren konnte. Es wurden jedoch vergleichsweise hohe Konzentrationen dieses Ligands dafür benötigt. So erhielt man für die Apoptose-

induktion bei den Myelomzellen ED_{50} -Werte zwischen 20 und 100 ng/ml (Abb. 23a-e), wobei bekannte TRAIL-sensitive Jurkat- oder KB-Zellen ED_{50} -Werte von 1 und 0,01 ng/ml aufwiesen (Abb. 23f-g). Ohne Quervernetzen war Flag-TNC-hTRAIL jedoch weit weniger toxisch. Da das Quervernetzen von löslichem trimere TRAIL für die Aktivierung des TRAILR2 nötig ist, TRAILR1 jedoch auch durch nicht-quervernetztes lösliches trimere TRAIL stimuliert wird (Mühlenbeck et al. 2000; Wajant et al. 2001), deutet diese Ergebnisse darauf hin, dass die analysierten Myelomzelllinien vorzugsweise durch den TRAILR2 Apoptose induzieren (Abb. 23a-e).



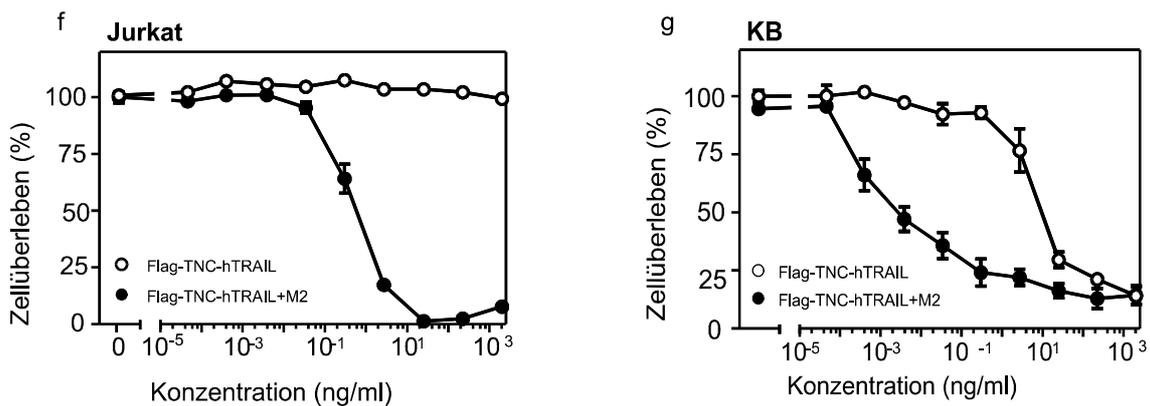


Abbildung 23: Die verschiedenen Myelomzellen (a-e) wurden auf 96-Well-Platten ausgesät und mit den entsprechenden Konzentrationen von Flag-TNC-hTRAIL für ca. 18 Stunden in An- und Abwesenheit von 3 $\mu\text{g/ml}$ anti-Flag mAb M2 in Dreifachwerten inkubiert. Die Vitalität wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. Der zytotoxische Effekt von Flag-TNC-hTRAIL auf KB- und Jurkat-Zellen wurde als Vergleich parallel durchgeführt (f-g). Die Vitalität wurde bei den Jurkat-Zellen mit dem MTT-Assay, bei den KB-Zellen durch Kristallviolett-färbung bestimmt.

Weiter konnte gezeigt werden, dass die durch oligomerisiertes Flag-TNC-hTRAIL induzierte Apoptose von einer deutlichen Prozessierung der verschiedenen Caspasen und Caspasesubstrate, wie zum Beispiel BID, begleitet ist (Abb. 24).

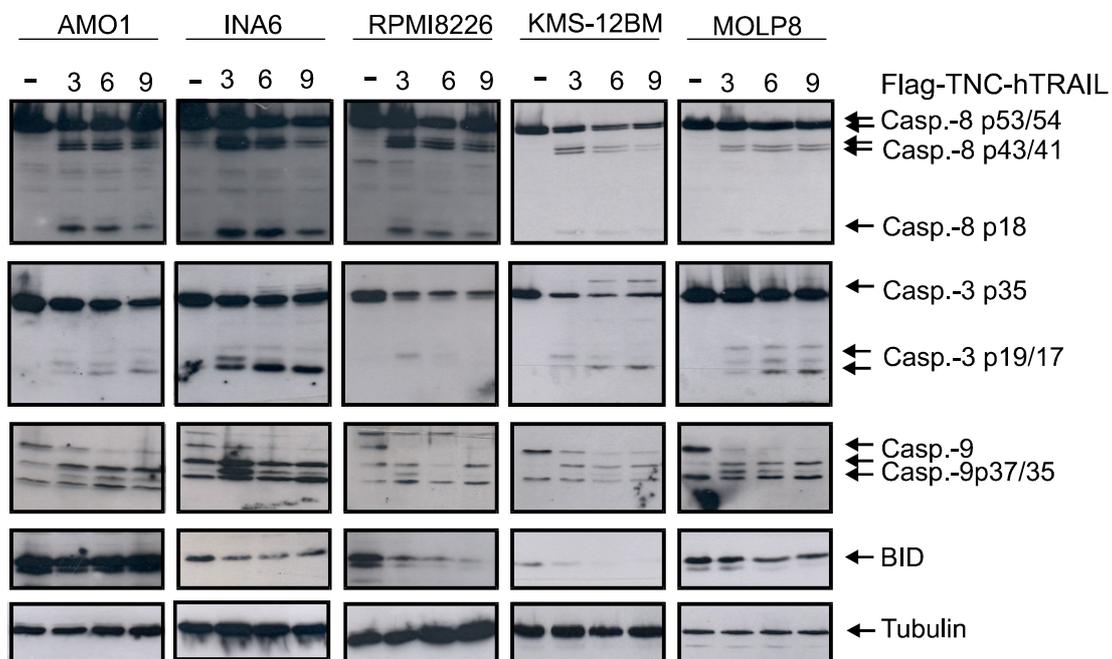


Abbildung 24: Die verschiedenen Myelomzellen wurden mit 400 ng/ml Flag-TNC-hTRAIL (mit 3 $\mu\text{g/ml}$ M2 quervernetzt) stimuliert, nach den entsprechenden Zeiten geerntet und im Lysispuffer lysiert. Die Proben wurden anschließend im Western Blot bezüglich der oben angegebenen Proteine analysiert.

Um nun die Aktivierung des NF κ B-Signalwegs und der MAP-Kinasen durch oligomerisiertes Flag-TNC-hTRAIL zu untersuchen, wurden Zelllysate von stimulierten Myelomzellen im Western Blot bezüglich der Phosphorylierung von JNK, p38, p42/44 und I κ B α analysiert. Die Phosphorylierung dieser Proteine ist ein Zeichen für die Aktivierung des JNK-, p38-, p42/44- und NF κ B-Signalwegs. Nach 3-5 Stunden konnte bei allen untersuchten Zellen die Aktivierung des p38- und JNK- Signalweges gezeigt werden. Bei INA6- und KMS-12BM-Zellen erfolgte die Stimulation des p42/p44-Signalwegs nach ähnlicher Zeitkinetik. Im Gegensatz dazu war die Zeitinematik der I κ B α -Phosphorylierung, was ein Indikator für die NF κ B-Aktivierung ist, in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich (Abb 25).

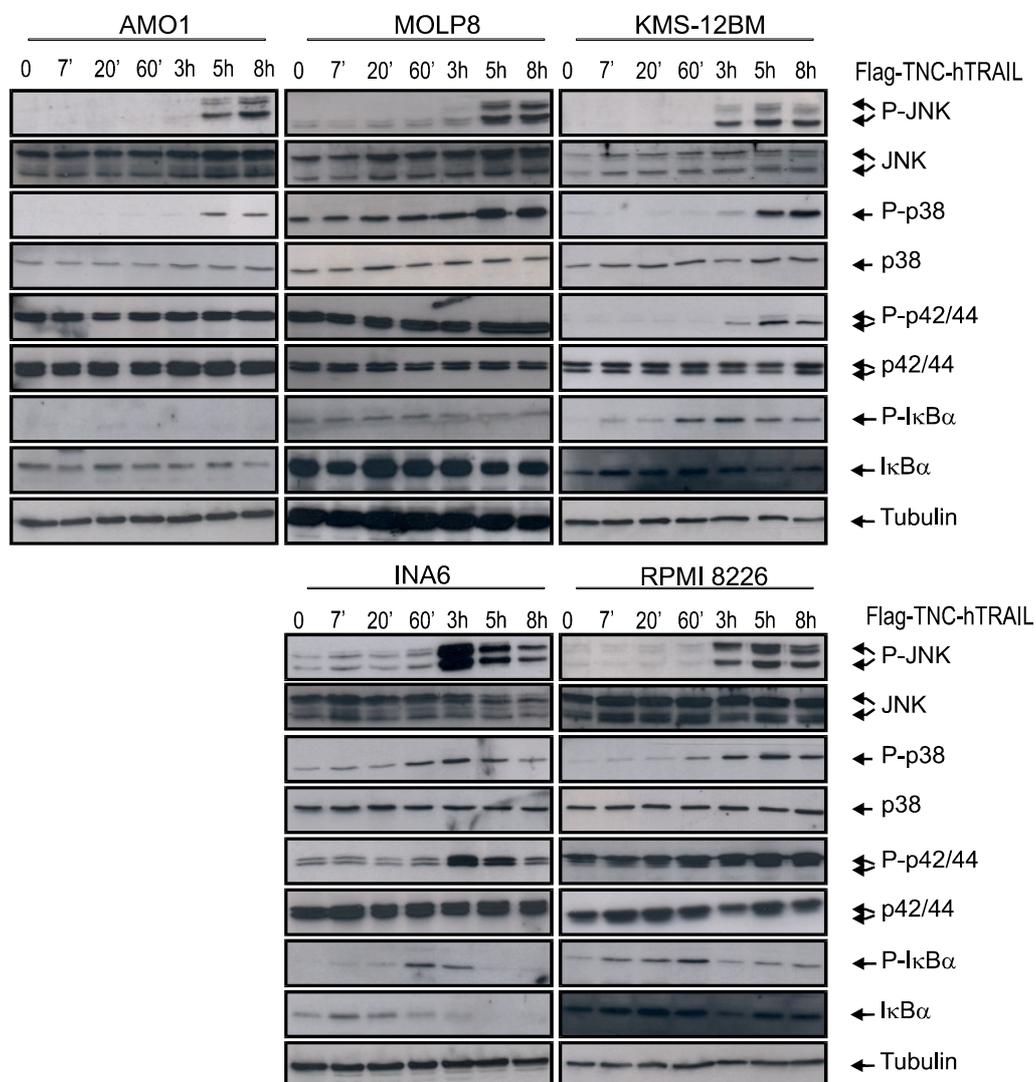


Abbildung 25: Die verschiedenen Myelomzelllinien wurden für die angegebenen Zeiten mit 400 ng/ml Flag-TNC-hTRAIL (mit 3 μ g/ml M2 quervernetzt) stimuliert, direkt in Laemmli-Probenpuffer, der mit einem Proteaseinhibitorcocktail versetzt worden ist, lysiert und im Western Blot bezüglich der angegebenen Proteine untersucht.

Nachdem nun gezeigt worden ist, dass die MAP-Kinasen und der NF κ B-Signalweg in der Mehrzahl der untersuchten Myelomzelllinien aktiviert werden, sollte jetzt untersucht werden, ob diese proinflammatorischen Signalwege auch in primären Myelomzellen stimuliert werden. Freundlicherweise isolierte Thorsten Stühmern CD138⁺-Zellen aus dem Knochenmark von Myelompatienten und stimulierte diese Zellen am nächsten Tag mit oligomerisiertem Flag-TNC-hTRAIL. Die weiteren Analysen wurden anschließend selbst durchgeführt. Da aus den Patienten nur sehr wenige primäre Zellen isoliert werden konnten, konnte von einer Primärzellprobe meist nur die Aktivierung von einem oder zwei Signalwegen analysiert werden. Die Lysate von insgesamt neun primären Myelomzellproben wurden im Western Blot bezüglich der Phosphorylierung von p38 und p42/44 analysiert. Dabei zeigten vier von sechs Primärzellproben eine deutliche Aktivierung des p38-Signalwegs. In drei von vier Proben wurde eine leichte Induktion des p42/44-Signalwegs festgestellt (Abb.26).

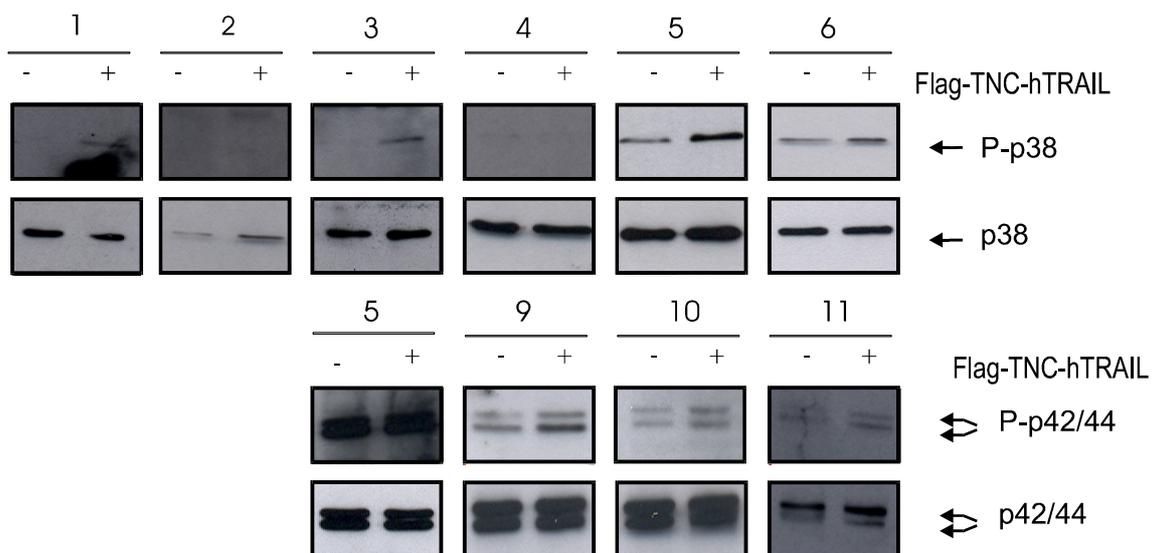


Abbildung 26: Thorsten Stühmer isolierte und stimulierte die primären Zellen mit 400 ng/ml Flag-TNC-hTRAIL (mit 3 μ g/ml anti Flag-M2 quervernetzt) für 6 Stunden. Das eingefrorene Pellet wurde mit Laemmli-Probenpuffer, der mit einem Proteaseinhibitorcocktail versetzt worden ist, lysiert und im Western Blot bezüglich der angegebenen Proteine untersucht.

6.2.2 In Myelomzellen induziert Flag-TNC-hTRAIL caspasevermittelten und caspaseunabhängigen Zelltod

Abhängig vom Zelltyp und Signalweg können Caspasen einen inhibierenden, aber auch stimulierenden Einfluss auf die Aktivierung der MAP-Kinasen und des NF κ B-Signalwegs besitzen. Deshalb sollte als nächstes analysiert werden, wie die Inhibition von Caspasen die Flag-TNC-hTRAIL-induzierte proinflammatorische Signaltransduktion beeinflusst. Dafür wurden die Zellen mit dem pan-Caspaseinhibitor ZVAD inkubiert und anschließend mit oligomerisiertem Flag-TNC-hTRAIL stimuliert. Jedoch hatte ZVAD bei den fünf analysierten Myelomzelllinien einen unterschiedlichen Effekt auf die TRAIL-induzierte Apoptose. Während die Myelomzelllinien AMO1 und MOLP8 durch ZVAD praktisch vollständig vor der TRAIL-induzierten Apoptose geschützt waren, konnte für die Myelomzelllinien INA6, RPMI8226 und KMS-12BM nur ein geringer protektiver Effekt von ZVAD gezeigt werden (Abb. 27).

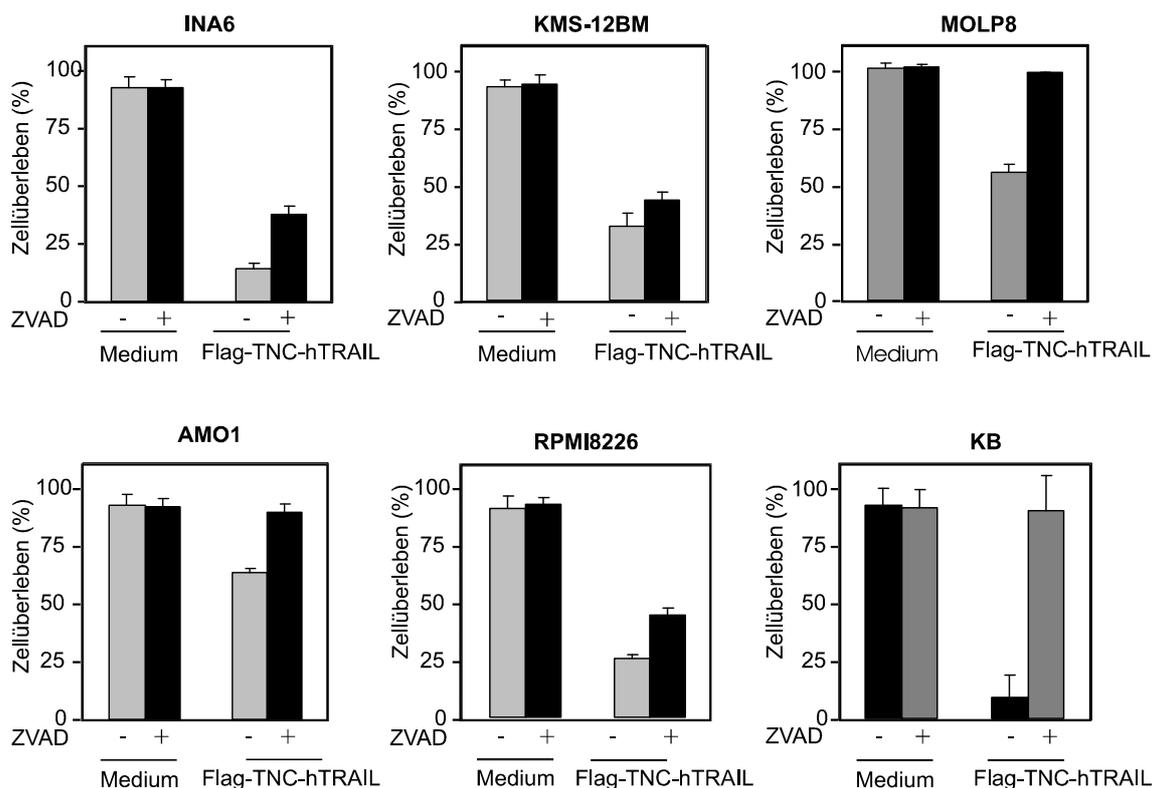


Abbildung 27: Die fünf Myelomzelllinien wurden auf einer 96-Well Platte ausgesät und mit 500 ng/ml Flag-TNC-hTRAIL (mit 3 μ g/ml anti-Flag M2 quervernetzt) für ca 18 Stunden in An- und Abwesenheit von 100 μ M ZVAD inkubiert. Anschließend wurde die Apoptoserate mit dem MTT-Assay gemessen. KB-Zellen dienten hier als Kontrolle. Die KB-Zellen wurden nur mit 20 μ M ZVAD behandelt.

Der nur partielle Schutz durch ZVAD in den KMS-12BM-, INA6- und RPMI8226-Zellen ist hierbei wohl nicht auf eine unzureichende Caspaseinhibition zurückzuführen, denn es konnte in diesen Zellen nach ZVAD-Behandlung (100 μ M) im Western Blot keine Caspaseprozessierung mehr nachgewiesen werden (Abb.28). Des weiteren erwiesen sich weit niedrigere Konzentrationen von ZVAD (20 μ M) in der Keratinozytenzelllinie KB als ausreichend, um die Apoptoseinduktion vollständig zu verhindern (Abb. 27). Dies zeigt, dass TRAIL bei Myelomzellen nicht nur caspaseabhängigen, sondern auch caspaseunabhängigen Zelltod vermitteln kann.

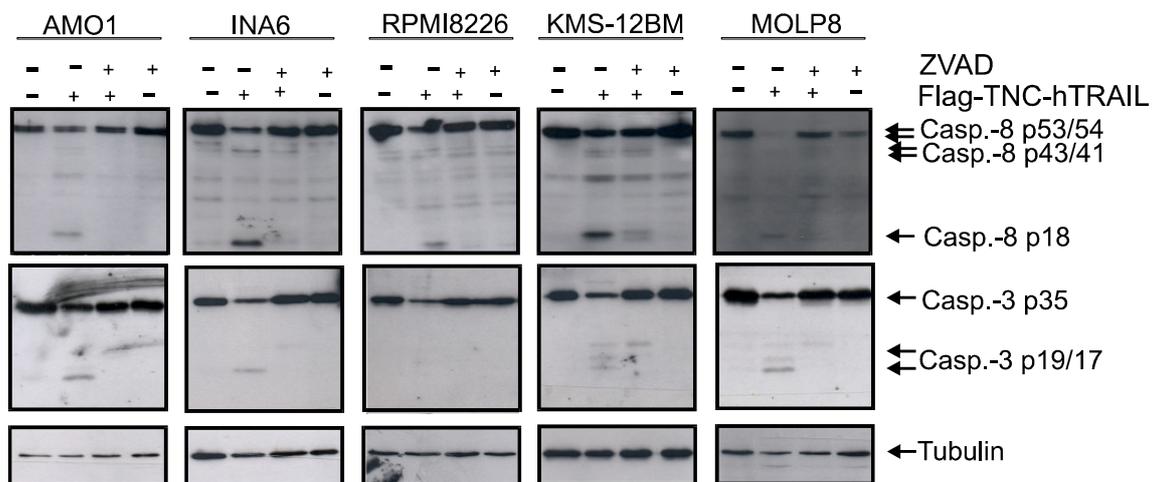


Abbildung 28: Die verschiedenen Myelomzelllinien wurden für 6 Stunden mit 400 ng/ml Flag-TNC-hTRAIL (mit 3 μ g/ml M2 quervernetzt) in An- und Abwesenheit von 100 μ M ZVAD inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und im Western Blot auf die angegebenen Proteine hin untersucht.

Bezüglich der Aktivierung proinflammatorischer Signalwege zeigte sich, dass die Aktivierung des JNK- und p38-Signalwegs abhängig vom Zelltyp entweder caspaseabhängig oder caspaseunabhängig erfolgt. So erwies sich in AMO1-Zellen die Stimulation des JNK- und p38-Signalwegs als caspaseabhängig in INA6- und KMS-12BM-Zellen jedoch als caspaseunabhängig. Bemerkenswerterweise war die Aktivierung des JNK- und p38-Signalwegs in MOLP8- und RPMI8226-Zellen differentiell von Caspasen abhängig. Die Stimulation des p42/44- und NF κ B-Signalwegs war dagegen stets caspaseunabhängig (Abb.29).

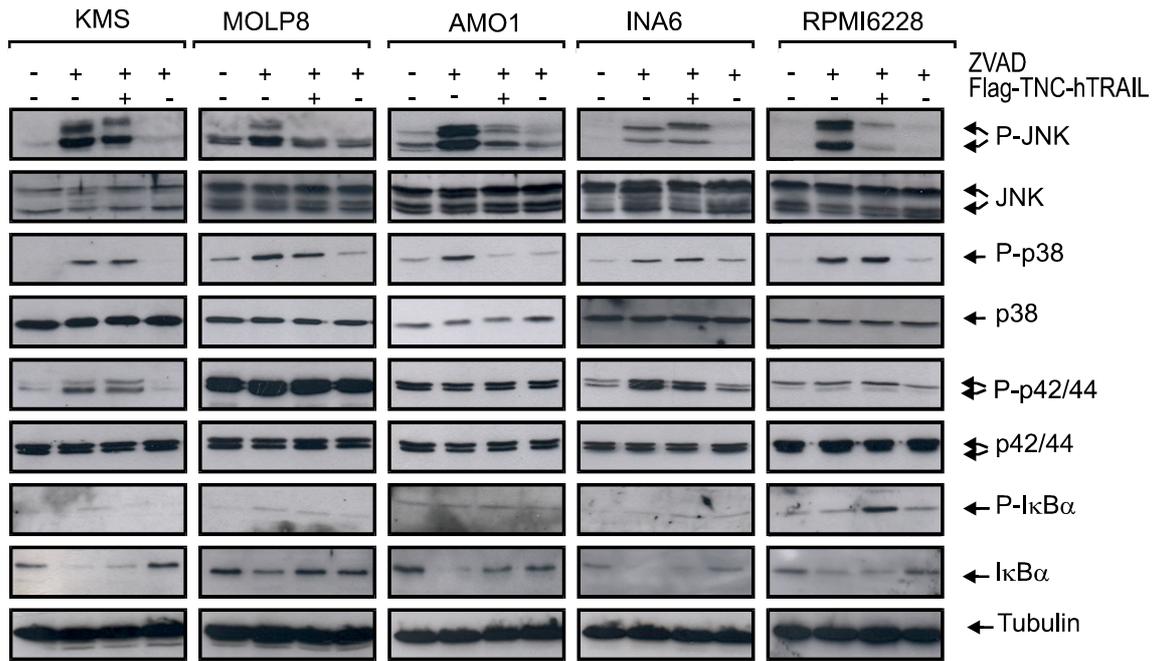


Abbildung 29: Die verschiedenen Myelomzellen wurden für 6 Stunden mit 400 ng/ml Flag-TNC-hTRAIL (mit 3 µg/ml M2 quervernetzt) in An- und Abwesenheit von 100 µM ZVAD inkubiert und direkt in Laemmli-Probenpuffer, der vorher mit einem Phosphataseinhibitorcocktail versetzt worden ist, lysiert. Im Western Blot wurden die Proben analysiert.

7. Diskussion

7.1 Durch die Fusion mit der TNC-Trimerisierungsdomäne wird die spezifische Bioaktivität von löslichen trimeren Liganden der TNF-Familie verstärkt.

Die Liganden der TNF-Familie besitzen charakteristischer Weise eine konservierte trimere, für die Rezeptorbindung wichtige Proteindomäne, die „TNF homology domain (THD)“, und werden meist als TypII-Transmembranproteine synthetisiert. Die membranständigen TNF-Liganden können durch alternatives Spleißen und proteolytische Prozessierung in lösliche trimere Proteine, die die THD enthalten, übergehen (Locksley et al. 2001; Bodmer et al. 2002). Während sowohl membranständige Liganden als auch lösliche trimere Liganden mit hoher Affinität an ihre korrespondierenden Rezeptoren binden, kann die Bindung des löslichen trimeren Liganden rezeptoraktivierend, aber auch wirkungslos sein (Grell et al. 1995; Schneider et al. 1998; Wajant et al. 2001). Interessanterweise kann ein und derselbe lösliche Ligand seine Rezeptoren sehr unterschiedlich aktivieren. Zum Beispiel stimulieren sowohl lösliches als auch Membran-TRAIL den TRAILR1, jedoch nur Membran-TRAIL den TRAILR2 (Mühlenbeck et al. 2000; Wajant et al. 2001). Jedoch können lösliche trimere Liganden der TNF-Familie durch sekundäre Multimerisierung in aktivere Formen umgewandelt werden, indem künstlich ihre Avidität verstärkt wird. So aktivieren zum Beispiel lösliche, Flag-getaggte Formen von TNF, CD95L, TRAIL und CD40L ihre entsprechenden Rezeptoren stark, nachdem sie über ihren Flag-tag mit einem Flag-spezifischen mAb M2 Antikörper quervernetzt wurden (Wajant et al. 2001; Almasan and Ashkenazi 2003; Holler et al. 2003). Ebenso besitzen unspezifisch aggregierte Varianten der TNF-Liganden, die durch die Produktion in *E. coli* erhalten wurden, eine hohe Bioaktivität.

In dieser Arbeit wurde die zytotoxische Aktivität von löslichem murinem TRAIL und löslichem humanem TRAIL verglichen. Es zeigte sich, dass sich die spezifische Bioaktivität der beiden Liganden-Trimere nach sekundärem Quervernetzen auf murinen und humanen Zellen deutlich steigern ließ. Ohne Quervernetzen konnten murines und humanes TRAIL auf murinen Zellen kaum Apoptose induzieren (Abb.5). Diese Beobachtung lässt sich damit erklären, dass im Gegensatz zum Menschen, bei

dem TRAIL zwei verschiedene TRAIL-Todesrezeptoren aktivieren kann, in der Maus nur ein TRAIL-Todesrezeptor (mTRAILR2) existiert (Wu et al. 1999; Schneider et al. 2003). Wie in der Einleitung beschrieben, unterscheiden sich die beiden humanen TRAIL-Todesrezeptoren in ihrer Aktivierbarkeit hinsichtlich aggregierter, nicht-aggregierter, immobilisierter oder quervernetzter TRAIL-Varianten (Mühlenbeck et al. 2000; Wajant et al. 2001). Aus den oben beschriebenen Befunden geht hervor, dass sich der mTRAILR2 hinsichtlich seiner Aktivierungseigenschaften wie der humane TRAILR2 zu verhalten scheint. Obwohl sich die Aktivität der humanen und murinen TRAIL-Variante nach sekundärem Quervernetzen deutlich steigern ließ, war die Aktivität des murinen TRAIL jedoch immer noch deutlich geringer als die des humanen TRAIL (Abb. 5). Diese Tatsache stimmt auch damit überein, dass in FACS-Experimenten die murine TRAIL-Variante viel schlechter die entsprechenden Rezeptoren binden konnte als humanes TRAIL (Abb. 7). Da die beiden TRAIL-Varianten ähnlich effizient Trimere bilden, wie in chemischen Crosslinking- und Gelfiltrationsstudien gezeigt werden konnte (Abb. 8, 9), weisen die unterschiedlichen Bioaktivitäten der murinen und humanen TRAIL-Varianten wohl darauf hin, dass, anders als bisher vermutet, die Bildung von trimeren Proteinen allein für mTRAIL nicht unbedingt ausreichend ist, eine effiziente Ligand-Rezeptor-Interaktion zu gewährleisten. Diese Beobachtung konnte auch beim löslichen murinen CD95L (mCD95L), der nur die THD besitzt, gemacht werden (Berg et al. 2007). So bildete mCD95L zwar Trimere, konnte jedoch im Gegensatz zum löslichen humanen CD95L weder an den humanen noch an den murinen CD95 binden und war auch nach sekundärem Quervernetzen inaktiv (Berg et al. 2007). Um zu untersuchen, ob bei den murinen CD95L- und TRAIL-Varianten andere Strukturen außerhalb der THD nötig sind, um eine effektive Rezeptorbindung zu gewährleisten, wurden in diesem Zusammenhang murine CD95L- und TRAIL-Varianten konstruiert, die neben der THD zusätzlich die Stammregion besitzen, die die THD von der Transmembrandomäne trennt. Die murine Variante von CD95L mit Stammregion konnte gut an seinen Rezeptor binden, besaß auch ohne Quervernetzen eine hohe zytotoxische Aktivität und eine Tendenz, zu aggregieren. Ein solches Verhalten konnte auch für den humanen CD95L und murines TRAIL mit Stammregion gezeigt werden, wenn auch weniger stark ausgeprägt (Abb. 11). Dieser Befund eröffnet die Möglichkeit, dass die Stammregion mancher Liganden der TNF-Ligandenfamilie eine Rolle bei der Rezeptorbindung und Rezeptoraktivierung spielt oder aber, dass die Stammregion zur Stabilisierung des Proteins nach seiner Rezeptorbindung beiträgt. Tatsächlich besteht der Unterschied zwischen löslichem

trimerem TRAIL und CD95L und ihren membrangebundenen Formen darin, dass der N-Terminus der THD bei den löslichen Varianten praktisch frei vorliegt, während der N-Terminus der THD bei membrangebundenen Molekülen durch die Transmembrandomäne und/oder die Stammregion fixiert ist.

In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Fusion von mTRAIL mit der ca. 30 Aminosäuren langen Trimerisierungsdomäne des Matrixproteins Tenascin-C (TNC) diesem Liganden die Fähigkeit verleiht, an seinen Rezeptor zu binden und effektiv Apoptose zu induzieren. (Abb. 14, 15). Desweiteren lagert sich das TNC-Fusionsprotein wie auch mTRAIL selbst in Trimere zusammen und bildet, anders als mCD95L mit der Stammregion keine Aggregate (Abb. 13). Wie humanes trimeres TRAIL aktiviert das murine TNC-Fusionsprotein den humanen TRAILR2 und mTRAILR2 nur schwach, kann dies jedoch sehr effizient nach sekundärem Quervernetzen. Genauso wie hier für murines TRAIL beschrieben, verbesserte sich auch die Rezeptorbindung und nach sekundärem Quervernetzen die zytotoxische Aktivität des humanen TNC-Fusionsproteins (Abb 19,20). Der Befund, dass die Fusion mit der TNC-Trimerisierungsdomäne die Rezeptorbindung und zytotoxische Aktivität mancher löslicher trimerer Liganden der TNF-Ligandenfamilie deutlich verbessern kann, macht es wahrscheinlich, dass die räumliche Fixierung der THD durch die TNC-Trimerisierungsdomäne, die sonst durch die Stammregion oder die Membranständigkeit gewährleistet ist, aber bei löslichen trimeren TRAIL-Varianten fehlt oder eingeschränkt ist, für die Rezeptorbindung wichtig ist. Es ist somit unwahrscheinlich, dass Aminosäurereste der Stammregion direkt an der Rezeptorbindung beteiligt sind. Die Notwendigkeit der räumlichen Fixierung der THD der löslichen Liganden kann jedoch von Ligand zu Ligand variieren. Humanes lösliches trimeres TRAIL ist zum Beispiel auch ohne zusätzliche räumliche Fixierung in der Lage, nach sekundärem Quervernetzen seine Rezeptoren zu aktivieren und Apoptose auszulösen. Seine Aktivität wird durch die Fusion mit TNC lediglich verstärkt.

Durch die Fusion mit der TNC-Trimerisierungsdomäne können somit lösliche, nicht-aggregierte Liganden der TNF-Familie mit erhöhter Aktivität generiert werden.

Außerdem zeigen die dargelegten Ergebnisse, dass die Maus anders als der Mensch wohl keinen TRAIL-Todesrezeptor besitzt, der schon durch lösliches, nicht-quervernetztes trimeres TRAIL effektiv aktiviert werden kann. Diese Beobachtung ist besonders wichtig, wenn in murinen Tiermodellen mögliche Nebenwirkungen von verschiedenen TRAIL-Varianten diskutiert werden sollen.

7.2 TRAIL aktiviert im Multiplen Myelom proinflammatorische Signalwege

In früheren Studien wurde gezeigt, dass TRAIL bei Myelomzellen Apoptose induziert (Lincz et al. 2001; Mitsiades et al 2001). Deshalb wird TRAIL als neues Medikament in der Myelomtherapie diskutiert. Bei der Behandlung des multiplen Myeloms mit TRAIL müssen jedoch verschiedene Gesichtspunkte berücksichtigt werden. Zum einen sollte TRAIL normales Gewebe außerhalb des Tumors möglichst nicht schädigen, und es sollte daher auch ausgeschlossen werden, dass TRAIL proinflammatorische Signalwege in den Tumorzellen stimuliert.

Streng trimere TRAIL-Varianten zeigen bei systemischer Applikation nur sehr geringe Nebenwirkungen (Duiker et al. 2006). Interessanterweise kann die Aktivität solcher „sicheren“ TRAIL-Varianten bei vielen Zellen nach sekundärem Quervernetzen deutlich gesteigert werden (Wajant et al. 2001). Eine Erklärung dafür ist, dass aggregiertes TRAIL TRAILR1 und TRAILR2 aktiviert, während nicht-aggregiertes lösliches TRAIL nur TRAILR1 aktivieren kann (Mühlenbeck et al. 2000; Wajant et al. 2001). So konnte auch in dieser Arbeit an Myelomzellen gezeigt werden, dass Flag-TNC-hTRAIL nach Oligomerisierung 20-500 fach effektiver Apoptose induzierte (Abb.23). Dies lässt darauf schließen, dass bei diesen Zellen primär TRAILR2 Apoptose induziert. Solche oligomerisierten TRAIL-Varianten können jedoch toxische Nebeneffekte auf normale Zellen, wie z.B Hepatozyten, besitzen (Lawrence et al. 2001). Dies könnte zum einen von einer starken Aktivierung von TRAILR2 herrühren, die bei dem „sicheren“, löslichen TRAIL nicht auftritt. Zu anderem wird vermutet, dass aggregierte Präparationen von löslichem TRAIL bei der Induktion von supra-aggregierten TRAIL-Todesrezeptorenkomplexen effizienter sind als nicht-aggregierte lösliche TRAIL-Trimere. Deshalb können diese Varianten die Schutzmechanismen normaler Zellen überwinden und bei diesen Apoptose auslösen (Almasan and Ashkenazi 2003). Um eine effektive Myelom-Behandlung zu gewährleisten und die Nebenwirkungen der aktiveren oligomerisierten TRAIL-Trimere zu umgehen, sollte ein Therapieansatz entwickelt werden, bei dem TRAILR2 nur in den Tumorzellen aktiviert wird. Vor kurzem konnte tatsächlich gezeigt werden, dass Fusionsproteine aus einem tumorspezifischen „single chain“ Fragment und TRAIL den TRAILR2 auf antigen-negativen Zellen nur schwach aktivieren, nach Bindung an das entsprechende Zielantigen jedoch sehr effektiv. Dadurch wird die lokale Aktivierung von TRAILR2 gewährleistet. (Wajant et al.

2001; Bremer et al. 2004; Bremer et al. 2005; Stieglmeier et al. 2007). Da TRAILR1 jedoch auch durch lösliches trimeres TRAIL aktiviert werden kann, können mögliche TRAILR1-vermittelte Nebenwirkungen solcher TRAIL-Fusionsproteine umgangen werden, wenn diese durch Punktmutationen für den TRAILR2 spezifisch gemacht werden. Tatsächlich wurden solche TRAILR2-spezifischen TRAIL-Varianten auch schon konstruiert. (MacFarlane et al 2005; van der Sloot et al 2006). Solche Therapieansätze sind besonders vor dem Hintergrund wichtig, dass TRAIL häufig in Kombination mit Chemotherapeutika eingesetzt werden soll, welche nicht nur Tumorzellen, sondern auch normale Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose sensitivieren können.

Obwohl bis jetzt TRAIL vor allem vor dem Hintergrund untersucht worden ist, Apoptose zu induzieren, konnte vor kurzem gezeigt werden, dass TRAIL auch den NF κ B-Signalweg und die MAP-Kinasen aktiviert. Die proinflammatorischen Signalwege durch TRAIL sind besonders bei apoptoseresistenten Zellen bedeutend, da bei apoptotischen Zellen der NF κ B-Signalweg und die Proteintranslation blockiert sind. So konnte vor kurzem gezeigt werden, dass TRAIL die Metastasierung von Bcl-xL geschützten Pankreas-Tumorzellen verstärkt und die Invasivität von apoptoseresistenten Cholangiocarcinoma Zellen unterstützt (Ishimura et al. 2006; Trauzold et al. 2006).

Bis jetzt wurden die proinflammatorischen, potentiell protumoralen Effekte von TRAIL in Multiplen Myelomzellen noch nicht untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRAIL in Multiplen Myelomzellen proinflammatorische Signalwege wie den NF κ B-Signalweg und die MAP-Kinasen stimuliert (Abb.25, 26). Außerdem konnte oligomerisiertes TRAIL bei allen untersuchten Myelom-Zelllinien innerhalb von 24 Stunden fast vollständig Apoptose auslösen (Abb. 23, 24). Wurden die Zellen mit dem pan-Caspaseinhibitor ZVAD behandelt, konnte die Caspaseprozessierung bei allen untersuchten Myelomzelllinien vollständig blockiert werden (Abb. 28), während die Apoptoseinduktion bei drei von fünf Zelllinien durch ZVAD nur partiell gehemmt werden konnte (Abb. 27). Dies deutet darauf hin, dass TRAIL in multiplen Myelomzellen auch caspaseunabhängig Zelltod auslösen kann. Ob es sich hierbei um Nekrose handelt, muss in weiteren Experimenten noch untersucht werden. Zum Beispiel könnte diese Frage durch die Analyse nekrotischer Faktoren wie die PARP1-Aktivierung oder die Produktion von Radikalen geklärt werden. Experimente mit dem pan-Caspaseinhibitor ZVAD zeigten desweiteren, dass die Stimulation des NF κ B- und p42/44- Signalwegs stets caspaseunabhängig war, die Aktivierung des JNK- und p38-Signalwegs jedoch je nach Zelltyp caspaseunabhängig oder caspaseabhängig erfolgte (Abb 29). Dieser

Befund legt den Schluss nahe, dass die Aktivierung der verschiedenen proinflammatorischen Signalwege durch TRAIL kein „Epiphänomen“ der Apoptoseinduktion ist, sondern unabhängig von dieser erfolgt. Hinsichtlich der pathophysiologischen Relevanz der proinflammatorischen Signalwege durch TRAIL sind zwei Szenarien denkbar. Zum einen können TRAIL-sensitive Myelomzellen in einer frühen Phase proinflammatorische Moleküle produzieren, die in einer parakrinen Art und Weise das Tumorpotential von resistenten Zellen in der Nachbarschaft fördern. Zum anderen könnten TRAIL-stimulierte resistente Myelomzellen ein höheres metastatisches Potential erlangen oder die Entwicklung eines „Tumormikroenvironment“ begünstigen, was Metastasierung und Invasion der Tumorzellen ermöglicht. Demnach ergibt sich die Notwendigkeit, TRAIL-Kombinationstherapien zu entwickeln, die nicht nur eine effektive Apoptoseinduktion in Myelomzellen ermöglichen, sondern auch die durch TRAIL-stimulierten proinflammatorischen Signalwege blockieren.

8. Literaturverzeichnis

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

Anderson, D M; Maraskovsky, E; Billingsley, W L; Dougall, W C; Tometsko, M E; Roux, E R; Teepe, M C; DuBose, R F; Cosman, D ; Galibert, L (1997). "*A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function.*" *Nature* **390**: 175-179.

Ashkenazi, A; Pai, R C ; Fong, S; Leung, S; Lawrence, D; 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**: 155-162.

Berg, D; Lehne, M; Müller, N; Siegmund, D; Münkkel, S; Sebald, W; Pfizenmaier, K, Wajant, H (2007). "*Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L.*" *Cell Death Differ.* **14**: 2021–2034

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

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

Bodmer, J-L; 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**: 20632-20637.

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

Bremer, E; Kuijlen, J; Samplonius, D ; Walczak, H; de Leij, L; Helfrich, W (2004). "*Target Cell-Restricted and -Enhanced Apoptosis Induction by a scFv:sTRAIL Fusion Protein with Specificity for the Pancarcinoma-Associated Antigen EGP2.*" *Int J Cancer* **109**: 281-290.

Bremer, E; Samplonius, D F; van Genne, L; Dijkstra, M H; Kroesen, B J; de Leij, L F M H; Helfrich, W (2005). "*Simultaneous Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling and Enhanced Activation of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis -inducing ligand (TRAIL) Receptor-mediated Apoptosis Induction by an scFv: sTRAIL fusion protein with specificity for human EGFR.*" *J Biol Chem* **280**: 10025-10033.

Browning, J L; Dougas, I; Ngam-ek, A; Bourdon, P R; Ehrenfels, B N; Miatkowski, K; (1995). "Characterization of Surface Lymphotoxin Forms." *J of Immunol* **154**: 33-46.

Burns, T F; Bernhard, E J; El-Deiry, W S (2001). "Tissue specific expression of p53 target genes suggests a key role for KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis in vivo." *Oncogene* **20**: 4601-4612.

Chai, J; Du, C; Kyin, S; Wang, X; Shi, Y (2000). "Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO." *Nature* **406**: 855-862.

Chatterjee, M; Hönemann, D; Lentzsch, S; Bommert, K; Sers, C; Herrmann, P; Mathas, S; Dörken, B; Bargou, R C (2002). "In the presence of bone marrow stroma cells human multiple myeloma cells become independent of the IL-6/gp130/STAT3 pathway." *Blood* **100**: 3311-3318.

Chauhan, D; Uchiyama, H; Akbarali, Y; Urashima, M ; Yamamoto, K-I; Libermann, T A; Anderson, K C (1996). "Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF- κ B." *Blood* **87**: 1104-1112.

Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." *Nature* **420**: 860-867

Cretney, E., J McQualter, J L; Kayagaki, N; Yagita, H; Bernard, C C A; Grewal, I S; Ashkenazi, A; Smyth, M J (2005). "TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice." *Immunol Cell Biol* **83**: 511-519.

Cretney, E; Takeda, K; Yagita, H; Glaccum, M; Peschon, J J; Smyth, M J (2002). "Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice." *J Immunol* **168**: 1356-1361.

Debatin, K. M. and P. H. Krammer (2004). "Death receptors on chemotherapy and cancer." *Oncogene* **23**: 2950-2966.

Degli-Esposti, M. (1999). "To die or not to die-the quest of the TRAIL receptors." *J Leuk Biol* **65**: 535-542.

Degli-Esposti, M; Dougall, W C; Smolak, P J; Waugh, J Y; Smith, C A; Goodwin, R G (1997). "The Novel Receptor TRAIL-R4 Induces NF- κ B and Protects against TRAIL-Mediated Apoptosis, yet Retains an Incomplete Death Domain." *Immunity* **7**: 813-820.

Degli-Esposti, M A; Smolak, P J; Walczak, H; Waugh, J; Huang, C-P; DuBose, R F; Goodwin, R G; Smith, C A (1997). "Cloning and Characterization of TRAIL-R3, a Novel Member of the Emerging TRAIL Receptor Family." *J Exp Med* **186**: 1165-1170.

Deveraux, Q L; Roy, N; Stennicke, H R; Van Arsdale, T; Srinivasula, S M; Alnemri, E S; Salvesen, G S; Reed, J C (1998). "IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases." *EMBO* **17**: 2215-2223.
Deveraux, Q L; Takahashi, R; Salvesen, G S; Reed, J C (1997). "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases." *Nature* **388**: 300-304.

- Djerbi, M; Darreh-Shori, T; Zhivotovsky, B; Grandien, A. (2001). "Characterization of the Human FLICE-Inhibitory Protein Locus and Comparison of the Anti-Apoptotic Activity of Four Different FLIP Isoforms." *Scand J Immunol* **54**: 180-1.
- Dranoff, G. (2004). "Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy." *nat Rev Cancer* **4**: 11-22.
- Duiker, E W; Mom, C H; de Jong, S; Willemse, P H B; Gietema, J A; von der Zee, A G J; de Vries, E G E (2006). "The clinical trail of TRAIL." *Eur J Cancer* **14**: 2233-2240.
- Ehrlich, S C; Infante-Duarte, C; Seeger, B; Zipp, F (2003). "Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells and monocytes." *Cytokine* **24**: 244-253.
- Emery, J G; McDonnell, P; Burcke, M B; Deen, K C; Lyn, S; Silverman, C; Dul, E; Appelbaum, E R; Eichmann, 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**: 14363-14367.
- Fu, Y. X. and D. D. Chaplin (1999). "Development and maturation of secondary lymphoid tissues." *Ann Rev Immun* **17**: 399-433.
- Golks, A; Brenner, D; Fritsch, C; Krammer, P H; Lavrik, I N (2005). "c-FLIP_R, a new regulator of death receptor-induced apoptosis." *J Biol Chem* **280**: 1407-14513.
- Gravestain, L. A. and J. Borst (1998). "Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system." *Semin Immunol* **10**: 423-434.
- Grell, M; Douni, E; Wajant, H; Löhden, 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**: 793-802.
- Griffith, T S; Chin, W A; Jackson, G C; Lynch, D H; Kubin, M Z (1998). "Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells." *J Immunol* **161**: 2833-2840.
- Halaas, O R; Vik, R; Ashksenazi, A; Espevik, T. (2000). "Lipopolysaccharide induces expression of Apo2 Ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages." *Scand J Immunol* **51**: 244-250.
- Hideshima, T; Bergsagel, P L; Kuehl, W M; Anderson, K C (2004). "Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications." *Blood* **104**: 607-618.
- Hilbert, D M; Kopf, M; Mock, B A ; Köhler, G; Rudikoff, S (1995). "Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms." *J Exp Med* **182**: 243-248.
- Hilliard, B; Wilmen, A; Seidel, C; Liu, T-S T; Göke, R; Chen, Y (2001). "Roles of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *J Immunol* **166**: 1314-1319.
- Holcik, M;(2006). "Inhibitor of Apoptosis Proteins". *Apoptosis and Cancer Therapy* **1**:405-426

Holler, N; Tardivel, A; Kovacsovics-Bankowski, M; Hertig, S; Gaide, O; Martinon, F; Tinel, A; Deperthes, D; Calderara, S; Schuthess, T; Engel, J; Schneider, P; Tschopp, J (2003). "Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex." *Mol Cell Biol* **23**: 1428-1440.

Hu, S; Vincenz, C; Ni, J; Gentz, R; Dixit, M V (1997). "I-FLICE, a Novel inhibitor of Tumor Necrosis Factor Receptor-1-and CD-95-induced Apoptosis." *J Biol Chem* **272**: 17255-17257.

Huang, Y; Park, Y C; Rich, R L; Segal, D; Myszk, D G; Hao, W (2001). "Structural basis of caspase inhibition by XIAP. Differential roles of the linker versus the BIR domain." *Cell* **104**: 781-790.

Hymowitz, S G; O'Connell, M P; Ultsch, M H; Hurst, A; Totpal, K; Ashkenazi, A; de Vos, A M; Kelley, R F (2000). "A Unique Zinc-Binding Site Revealed by a High-Resolution X-ray Structure of Homotrimeric Apo2L/TRAIL." *Biochem* **36**: 633-640.

Irmeler, M; Thome, M; Hahne, M; Schneider, P; Hofmann, K; Steiner, V; Bodmer, J-L; Schröter, M; Burns, K; Mattmann, C; Rimoldi, D; French, L; Tschopp, J (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." *Nature* **388**: 190.

Ishimura, N; Isomoto, H; Bronk, F S; Gores, G J (2006). "Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**: 2021-2034.

Itoh, N. and S. Nagata (1993). "A Novel Protein Domain required for apoptosis." *J Biol Chem* **268**: 10932-10937.

Joazeiro, C. A. and A. M. Weismann (2000). "RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity." *Cell* **102**: 549-552.

Kammerer, R A; Schuthess, T; Landwehr, R; Lustig, A; Fischer, D; Engel, J (1998). "Tenascin-C hexabranhion assembly is a sequential two-step process initiated by coiled-coil alpha-helices". *J Biol Chem* **273** 10602-10608

Kayagaki, N; Yamaguchi, N; Nakayama, M; Eto, H; Okumura, K; Yagita, H (1999). "Type I interferons (IFNs) Regulate Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Expression on Human T Cells: A Novel Mechanism for the Antitumor Effects of Type I IFNs." *J Exp Med* **189**:1451-1460.

Kelley, S. and A. Ashkenazi (2004). "Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL." *Curr Opin Pharmacol* **4**: 333-339.

Kimberley, F. C. and G. R. Screaton (2004). "Following a TRAIL: Update on a ligand and its five receptors." *Cell Res* **14**: 359-372.

Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." *Nature* **407**: 789-795.

Krueger, A; Schmitz, I; Baumann, S; Krammer, P H; 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**: 20633-20640.

Kyle, R. A. and S. V. Rajkumar (2004). "Multiple myeloma." *N Engl J Med* **351**: 1860-1873.

Lamhamedi-Cherradi, S E; Zheng, S-J; Maguschak, K A; Peschon, J J; Chen, Y H (2003). "Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in *TRAIL*^{-/-} mice." *Nat Immunol* **4**: 255-260.

Lawrence, D; Shahrokh, Z; Marsters, S; Achiles, D S; 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**: 383-385.

LeBlanc, H. N. and A. Ashkenazi (2003). "Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors." *Cell death Diff* **10**: 66-77.

Lincz LF, Yeh TX, Spencer A (2001). "TRAIL-induced eradication of primary tumour cells from multiple myeloma patient bone marrows is not related to TRAIL receptor expression or prior chemotherapy." *Leukemia* **10**: 1650-1657.

Liu, S; Yu, Y; Zhang, M; Wang, W; Cao, X. (2001). "The Involvement of TNF- α -Related Apoptosis -Inducing Ligand in the Enhanced Cytotoxicity of IFN- β -Stimulated Human Dendritic Cells to Tumor Cells." *J Immunol* **166**: 5407-5415.

Liu, Z; Sun, C; Olejniczak, E T; Maeadows, R P; Betz, S F; Oost, T; Herrmann, J; Wu, J C; Fesik, S W (2000). "Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain." *Nature* **408**: 1004-1008.

Locksley, RM; Killeen, N; J, Lenardo M. (2001). "The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology." *Cell* **104**: 487-501.

Lum, L; Wong, B R; Josien, R; Becherer, J D; Erdjument-Bromage, H; Schlöndorff, J; Tempst, P; Choi, Y; Blobel, C P (1999). "Evidence for a Role of a Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)-converting Enzyme-like Protease in Shedding of TRANCE, a TNF Family Member Involved in Osteoclastogenesis and Dendritic Cell Survival." *J Biol Chem* **274**: 13613-13618.

MacFarlane, M; Kohlhaas, S; Sutcliffe, M J; Dyer, M J S; Cohen, G M (2005). "TRAIL receptor-selective mutants signal to apoptosis via TRAIL-R1 in primary lymphoid malignancies." *Cancer Res* **65**: 11265-11270.

Mackay, F; Woodcock, S A; Lawton, P; Ambrose, C; Baetscher, M; Schneider, P; Tschopp, J; Browning, J L (1999). "Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations." *J Exp Med* **190**: 1697-1710.

Marsters, S. A., J. P. Sheridan, et al. (1997). "A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain." *Curr Biol* **7**: 1003-1006.

Mitsiades, C S; Treon, S P; Mitsiades, N ; Shima, Y; Richardson, P; Schlossman, R; Hideshima, T; Anderson, K C. (2001). "TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications." *Blood* **99**: 2162-2171.

- Mitsiades, N; Mitsiades, C S; Poulaki, V; Anderson, C K; Treon, S P. (2002). "*Intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human multiple myeloma cells.*" *Blood* **99**: 2162-2171.
- Mühlenbeck, F; Schneider, P; Bodmer, J-L; Schwenzler, R; Hauser, A; Schubert, G; Scheurich, P; Moosmayer, D; Tschopp, J; Wajant, H (2000). "*The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct crosslinking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK-activation.*" *J Biol Chem* **275**: 32208-32213.
- Naismith, J. H. and S. R. Sprang (1998). "*Modularity in the TNF-receptor family.*" *TIBS* **23**: 74-79.
- Pan, G; O'Rourke, K; Arul, M C; Gentz, R; Ebner, R; Ni, J; Dixit, V M (1997). "*The Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL.*" *Science* **276**: 111-113.
- Pitti, R M; Marsters, S A; Ruppert, S; Donahue, C J; 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**: 12687-12690.
- Powell, W C; Fingleton, B; Wilson, C L; Boothby, M; Matrisan, L M (1999). "*The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas Ligand and potentiates epithelial cell apoptosis.*" *Curr Biol* **9**: 1441-1447.
- Salvesen, G. S. and V. M. Dixit (1999). "*Caspase activation: the induced-proximity model.*" *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 10964-10967.
- Samel, D; Müller, D; Gerspach, J; Assouhou-Luty, C; Sass, G; Tiegs, G; Pfizenmaier, K; Wajant, H (2003). "*Generation of a FasL-based Proapoptotic Fusion Protein Devoid of Systemic Toxicity due to Cell-surface Antigen-restricted Activation.*" *J Biol Chem* **278**: 32077-32082.
- Sato, K; S, Joda.; Takayanagi, H; Yokochi, T; Kayagaki, N; Takeda, K; Yagita, H; Okumura, K; Tanaka, N; Taniguchi, T; Ogasawara, K (2001). "*Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gen induction by IFN- α/β .*" *Eur J Immunol* **31**: 3138-3146.
- Scaffidi, C; Schmitz, I; Krammer, P H; Peter, M E (1999). "*The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis.*" *J Biol Chem* **274**: 1541-1548.
- Schneider, P; Holler, N; Bodmer, J-L; Hahne, M; Frei, K; Fontana, A; Tschopp, J (1998). "*Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity.*" *J Exp Med* **187**: 1205-1213.
- Schneider, P; Olson, D; Tardivel, A; Browning, B; Lugovskoy, A; Gong, D; Dobles, M; Hertig, S; Hofmann, K; Van Vlijmens, H; Hsu, Y-M; Burkly, C L; Tschopp, J; Zheng, T S (2003). "*Identification of a New Murine Tumor Necrosis Factor Receptor Locus That Contains Two Novel Murine Receptors for Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL).*" *J Biol Chem* **278**: 5444-5454.

Screaton, G R; Mongkolsapaya, J; Xu, X-N; Cowper, A E; McMichael, A J; Bell, J I (1997). "*TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL.*" *Curr Biol* **7**: 693-696.

Sedger, L M; Glaccum, M B; Schuh, C L; T, Kanaly S; Williamson, E; Kayagaki, N; Yun, T; Smolak, P; Le, T; Goodwin, R ; Gliniak, B (2002). "*Characterization of the in vivo function of TNF- α -related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice.*" *Eur J Immunol* **32**: 2246-2254.

Seki, N; Hayakawa, Y; Brooks, A D; Wine, J; Wiltrout, R H; Yagita, H; Tanner, J E; Smyth, M J; Sayers, T J (2003). "*Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-mediated Apoptosis Is an Important Endogenous Mechanism for Resistance to Liver Metastases in Murine Renal Cancer.*" *Cancer Res* **63**: 207-213.

Sprick, M. and H. Walczak (2004). "*The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis.*" *Biochem and Biophys Acta* **1644**: 125-132.

Srinivasula, S M; Hegde, R; Saleh, A; Datta, P; Shiozaki, E; Chai, J; Lee, R-A; Robbins, P D; Fernandes-Alnemri, T; Shi, Y; Alnemri, E S. (2001). "*A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis.*" *Nature* **410**: 112-116.

Stieglmeier, J; Bremer, E; Kellner, C; Liebig, T M; Cate, B; Peipp, M; Schulze-Koops, H; Peiffer, M; Bühring, H-J; Greil, J; Oduncu, F; Emmerich, B; Fey, H G; Helfrich, W (2007). "*Selective induction of apoptosis in leukemic B-lymphoid cells by a CD19-specific TRAIL-fusion protein.*" *Cancer Immunol Immunoth* **57**: 233-246.

Suda, T; Tanaka, M; Miwa, K; Nagata, S (1996). "*Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation-induced resistance to Fas ligand.*" *J Immunol* **157** 3918-3924

Tartaglia, L A; Ayres, T M; Wong, G H W; Goeddel, D V (1993). "*A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death.*" *Cell* **74**: 845-853.

Trauzold, A; Siegmund, S; Schniewind, B; Sipos, B; Egberts, J; Zorenkov, D; Emme, D; Röder, C; Kalthoff, H; Wajant, H (2006). "*TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma.*" *Oncogene* **25**: 7434-7439.

Tschopp, J; Irmeler, M; Thome, M (1998). "*Inhibition of Fas death signals by FLIPs.*" *Curr Opin Immunol* **96**: 552-558.

van der Sloot, A M; Tur, V; Szegezdi, E; Mullally, M M; Cool, R H; Samali, A; Serrano, L; Quax, W (2006). "*Designed tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand variants initiating apoptosis exclusively via the DR5 receptor.*" *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 8634-8639.

Voelkel-Johnson, C; King, D L; Norris, J S (2002). "*Resistance of prostate cancer cells to soluble TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) can be overcome by doxorubicin or adenoviral delivery of full-length TRAIL.*" *Cancer Gene Ther* **9**: 164-172.

Vogel, L. A. and R. J. Noell (1998). "*CD40 and its crucial role as a member of the TNFR family.*" *Semin Immunol* **10**: 435-442.

Wajant, H. (2003). "Death receptors." *Essays Biochem* **39**: 53-71.

Wajant, H. (2004). "TRAIL and NFkappaB signaling-a complex relationship." *Vitam Horm* **67**: 101-132.

Wajant, H; Moosmayer, D; Wüest, T; Bartke, T; Gerlach, E; Schönherr, U; Peters, N; Scheurich, P; Pfizenmaier, K. (2001). "Differential activation of TRAIL-R1 and -R2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative." *Oncogene* **20**: 4101-4106.

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* **16**: 5386-5397.

Walczak, H; Miller, R E ; Ariail, K; Gliniak, B; Griffith, T S; Kubin, M; Chin, W; Jones, J; Woodward, A; Le, Tiep; Smith, C A; Smolak, P ; Goodwin, R G; Rauch, C T; Schuh, J C L; Lynch, D H (1999). "Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo." *Nat Med* **5**: 157-163.

Walczak, H; Koschney, R; Willen, D; Schader, M B; Sykora, J; Ganten, T M; Haas, T L; (2006). "The TRAIL Receptor-Ligand System: Biochemistry of Apoptosis Induction, Therapeutic Potential for Cancer Treatment and Physiological Function". *Apoptosis and Cancer Therapy* **1**:31-92.

Wiley, S R; Schooley, K ; Smolak, P J; Wienie, S D; Huang, C-P; Nicholl, J K; Sutherland, G R; Smith, T D; Rauch, C T; Smith, C A; Goddwin, R G. (1995). "Identification and Characterization of a New Member of the TNF Family that Induces Apoptosis." *Immunity* **3**: 673-682.

Wistuba, I I; Behrens, C; Virmani, A K; Milchgrub, S ; Syed, S ; Lam, S; Mackay, B; Minna, J D; Gazdar, A F. (1999). "Allelic Losses at Chromosome 8q21-23 Are Early and Frequent Events in the pathogenesis of Lung Cancer." *Cancer Res* **59**: 1973-1979.

Wu, G S; Burns, T F; Zhan, Y; Alnemri, E S; El-Deiry, W S (1999). "Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) death receptor." *Cancer Res* **59**: 2770-2775.

Wu, G S; Burns, T F; McDonald, E R; Jiang, W; Meng, R; Krantz, I D; Kao, G; Gan, D-D; Zhou, J-Y; Muschel, R; Hamilton, S R; Spinner, N B; Markowitz, S; Wu, G; El-Deiry, W S (1997). "KILLER/DR5 is a damage-inducible p53-regulated death receptor gene." *Nat Gen* **17**: 141-143.

9. Anhang

9.1 Die Protein- und Nukleotidsequenz des Fusionsproteins *Flag-TNC-mTRAIL(99-291)*

Sequenzbeschreibung: Kodierende DNA-Sequenz (NT 1-822) und translatierte Aminosäuresequenz (AS 1-273) des Fusionsproteins Flag-TNC-mTRAIL(99-291)

Merkmale von Flag-TNC-mTRAIL(99-291)

Leitpeptidsequenz:	NT 1- 78;	AS 1-26
Flag-Tag (kussiv):	NT 85-108	AS 29-36
Trimerisierungsdomäne (AS 110-139 des Tenascin-C vom Huhn):	NT 115-204	AS 39- 68
(unterstrichen)		
mTRAIL-Modul (dick-gedruckt):	NT 241-822	AS 81- 273

Sequenz

1	atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag	45
1	M N F G F S L I F L V L V L K	15
46	ggc gtg cag tgc gag gtg aag ctg gtg cca cgc gga tcc gat tac	90
16	G V Q C E V K L V P R G S D Y	30
91	aaa gac gat gac gat aaa gat atc <u>gcc tgt ggc tgt gcg gct gcc</u>	135
31	K D D D D K D I A C G C A A A	45
136	<u>cca gac atc aag gac ctg ctg agc aga ctg gag gag ctg gag ggg</u>	180
46	P D I K D L L S R L E E L E G	60
181	<u>ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag</u> ggt acc gga ggt ggg tct ggc	225
61	L V S S L R E Q G T G G G S G	75
226	ggc cgc ggt gaa ttc acc ttt cag gac acc att tct aca gtt cca	270
76	G R G E F T F Q D T I S T V P	90
271	gaa aag cag cta agt act cct ccc ttg ccc aga ggt gga aga cct	315
91	E K Q L S T P P L P R G G R P	105
316	cag aaa gtg gca gct cac att act ggg atc act cgg aga agc aac	360
106	Q K V A A H I T G I T R R S N	120
361	tca gct tta att cca atc tcc aag gat gga aag acc tta ggc cag	405
121	S A L I P I S K D G K T L G Q	135

406	<i>aag att gaa tcc tgg gag tcc tct cgg aaa ggg cat tca ttt ctc</i>	450
136	K I E S W E S S R K G H S F L	150
451	<i>aac cac gtg ctc ttt agg aat gga gag ctg gtc atc gag cag gag</i>	495
151	N H V L F R N G E L V I E Q E	165
496	<i>ggc ctg tat tac atc tat tcc caa aca tac ttc cga ttt cag gaa</i>	540
166	G L Y Y I Y S Q T Y F R F Q E	180
541	<i>gct gaa gac gct tcc aag atg gtc tca aag gac aag gtg aga acc</i>	585
181	A E D A S K M V S K D K V R T	195
586	<i>aaa cag ctg gtg cag tac atc tac aag tac acc agc tat ccg gat</i>	630
196	K Q L V Q Y I Y K Y T S Y P D	210
631	<i>ccc ata gtg ctc atg aag agc gcc aga aac agc tgt tgg tcc aga</i>	675
211	P I V L M K S A R N S C W S R	225
676	<i>gat gcc gag tac ggc ctg tac tcc atc tat cag gga gga ttg ttc</i>	720
226	D A E Y G L Y S I Y Q G G L F	240
721	<i>gag cta aaa aaa aat gac agg att ttt gtt tct gtg aca aat gag</i>	765
241	E L K K N D R I F V S V T N E	255
767	<i>cat ttg atg gac ctg gat caa gaa gcc agc ttc ttt gga gcc ttt</i>	810
256	H L M D L D Q E A S F F G A F	270
811	<i>tta att aac taa</i>	
271	L I N *	

9.2 Die Protein- und Nukleotidsequenz des Fusionsproteins Flag-Linker-mTRAIL(99-291)

Sequenzbeschreibung: Kodierende DNA-Sequenz (NT 1-783) und translatierte Aminosäuresequenz (AS 1-260) des Fusionsproteins Flag-Linker-mTRAIL(99-291)

Merkmale von Flag-Linker-mTRAIL(99-291)

Leitpeptidsequenz:	NT 1- 78;	AS 1-26
Flag-Tag (kussiv):	NT 85-108	AS 29-36
Linker (unterstrichen):	NT 109-195	AS 37- 65
mTRAIL-Modul (dick-gedruckt):	NT 202- 783	AS 68- 260

Sequenz

1	atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag	45
1	M N F G F S L I F L V L V L K	15
46	ggc gtg cag tgc gag gtg aag ctg gtg cca cgc gga tcc gat tac	90
16	G V Q C E V K L V P R G S D Y	30
91	aaa gac gat gac gat aaa <u>gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acg aag</u>	135
31	K D D D D K V T V S S A S T K	45
136	<u>ggc cca aag ctt gaa gaa ggt gaa ttt tca gaa gca cgc gta cag</u>	180
46	G P K L E E G E F S E A R V Q	60
181	<u>tct gtg ttg act cag</u> gaa ttc acc ttt cag gac acc att tct aca	225
61	S V L T Q E F T F Q D T I S T	75
226	gtt cca gaa aag cag cta agt act cct ccc ttg ccc aga ggt gga	270
76	V P E K Q L S T P P L P R G G	90
271	aga cct cag aaa gtg gca gct cac att act ggg atc act cgg aga	315
91	R P Q K V A A H I T G I T R R	105
316	agc aac tca gct tta att cca atc tcc aag gat gga aag acc tta	360
106	S N S A L I P I S K D G K T L	120
361	ggc cag aag att gaa tcc tgg gag tcc tct cgg aaa ggg cat tca	405
121	G Q K I E S W E S S R K G H S	135
406	ttt ctc aac cac gtg ctc ttt agg aat gga gag ctg gtc atc gag	450
136	F L N H V L F R N G E L V I E	150
451	cag gag ggc ctg tat tac atc tat tcc caa aca tac ttc cga ttt	495
151	Q E G L Y Y I Y S Q T Y F R F	165

496	<i>cag gaa gct gaa gac gct tcc aag atg gtc tca aag gac aag gtg</i>	540
166	Q E A E D A S K M V S K D K V	180
541	<i>aga acc aaa cag ctg gtg cag tac atc tac aag tac acc agc tat</i>	585
181	R T K Q L V Q Y I Y K Y T S Y	195
586	<i>ccg gat ccc ata gtg ctc atg aag agc gcc aga aac agc tgt tgg</i>	630
196	P D P I V L M K S A R N S C W	210
631	<i>tcc aga gat gcc gag tac ggc ctg tac tcc atc tat cag gga gga</i>	675
211	S R D A E Y G L Y S I Y Q G G	225
676	<i>ttg ttc gag cta aaa aaa aat gac agg att ttt gtt tct gtg aca</i>	720
226	L F E L K K N D R I F V S V T	240
721	<i>aat gag cat ttg atg gac ctg gat caa gaa gcc agc ttc ttt gga</i>	765
241	N E H L M D L D Q E A S F F G	255
766	<i>gcc ttt tta att aac taa</i>	
256	A F L I N *	

9.3 Die Protein- und Nukleotidsequenz des Fusionsproteins Flag-mTRAIL(99-291)

Sequenzbeschreibung: Kodierende DNA-Sequenz (NT 1-696) und translatierte Aminosäuresequenz (AS 1-231) des Fusionsproteins Flag-mTRAIL(99-291)

Merkmale von Flag-mTRAIL(99-291)

Leitpeptidsequenz:	NT 1- 78;	AS 1-26
Flag-Tag (kussiv):	NT 85-108	AS 29-36
mTRAIL-Modul (dick gedruckt):	NT 115- 696	AS 39- 231

Sequenz

1	atg aac atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg	45
1	M N F G F S L I F L V L V L K	15
46	ggc gtg cag tgc gag gtg aag ctg gtg cca cgc gga tcc gat tac	90
16	G V Q C E V K L V P R G S D Y	30
91	aaa gac gat gac gat aaa gaa ttc acc ttt cag gac acc att tct	135
31	K D D D D K E F T F Q D T I S	45
136	aca gtt cca gaa aag cag cta agt act cct ccc ttg ccc aga ggt	180
46	T V P E K Q L S T P P L P R G	60
181	gga aga cct cag aaa gtg gca gct cac att act ggg atc act cgg	225
61	G R P Q K V A A H I T G I T R	75
226	aga agc aac tca gct tta att cca atc tcc aag gat gga aag acc	270
76	R S N S A L I P I S K D G K T	90
271	tta ggc cag aag att gaa tcc tgg gag tcc tct cgg aaa ggg cat	315
91	L G Q K I E S W E S S R K G H	105
316	tca ttt ctc aac cac gtg ctc ttt agg aat gga gag ctg gtc atc	360
106	S F L N H V L F R N G E L V I	120
361	gag cag gag ggc ctg tat tac atc tat tcc caa aca tac ttc cga	405
121	E Q E G L Y Y I Y S Q T Y F R	135
406	ttt cag gaa gct gaa gac gct tcc aag atg gtc tca aag gac aag	450
136	F Q E A E D A S K M V S K D K	150
451	gtg aga acc aaa cag ctg gtg cag tac atc tac aag tac acc agc	495
151	V R T K Q L V Q Y I Y K Y T S	165

496	<i>tat ccg gat ccc ata gtg ctc atg aag agc gcc aga aac agc tgt</i>	540
166	Y P D P I V L M K S A R N S C	180
541	<i>tgg tcc aga gat gcc gag tac ggc ctg tac tcc atc tat cag gga</i>	585
181	W S R D A E Y G L Y S I Y Q G	195
586	<i>gga ttg ttc gag cta aaa aaa aat gac agg att ttt gtt tct gtg</i>	630
196	G L F E L K K N D R I F V S V	210
631	<i>aca aat gag cat ttg atg gac ctg gat caa gaa gcc agc ttc ttt</i>	675
211	T N E H L M D L D Q E A S F F	225
676	<i>gga gcc ttt tta att aac taa</i>	
226	G A F L I N *	

9.4 Die Protein- und Nukleotidsequenz des Fusionsproteins Flag-TNC-hTRAIL(95-291)

Sequenzbeschreibung: Kodierende DNA-Sequenz (NT 1- 804) und translatierte Aminosäuresequenz (AS 1-267) des Fusionsproteins Flag-TNC-hTRAIL(95-291)

Merkmale von Flag-TNC-hTRAIL(95-291)

Leitpeptidsequenz: NT 1- 78 AS 1-26
 Flag-Tag (kussiv): NT 85-108 AS 29-36
 Trimerisierungsdomäne (AS 110-139 des Tenascin-C vom Huhn): NT 115-204 AS 39-68
 (unterstrichen)
 hTRAIL-Modul (dick gedruckt): NT 241-804 AS 81-267

Sequenz

```

1  atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag 45
1  M  N  F  G  F  S  L  I  F  L  V  L  V  L  K 15

46  ggc gtg cag tgc gag gtg aag ctg gtg cca cgc gga tcc gat tac 90
16  G  V  Q  C  E  V  K  L  V  P  R  G  S  D  Y 30

91  aaa gac gat gac gat aaa gat atc gcc tgt ggc tgt gcg gct gcc 135
31  K  D  D  D  D  K  D  I  A  C  G  C  A  A  A 45

136 cca gac atc aag gac ctg ctg agc aga ctg gag gag ctg gag ggg 180
46  P  D  I  K  D  L  L  S  R  L  E  E  L  E  G 60

181 ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc gga ggt ggg tct ggc 225
61  L  V  S  S  L  R  E  Q  G  T  G  G  G  S  G 75

226 ggc cgc ggt gaa ttc acc tct gag gaa acc att tct aca gtt caa 270
76  G  R  G  E  F  T  S  E  E  T  I  S  T  V  Q 90

271 gaa aag caa caa aat att tct ccc cta gtg aga gaa aga ggt cct 315
91  E  K  Q  Q  N  I  S  P  L  V  R  E  R  G  P 105

316 cag aga gta gca gct cac ata act ggg acc aga gga aga agc aac 360
106 Q  R  V  A  A  H  I  T  G  T  R  G  R  S  N 120

361 aca ttg tct tct cca aac tcc aag aat gaa aag gct ctg ggc cgc 405
121 T  L  S  S  P  N  S  K  N  E  K  A  L  G  R 135

406 aaa ata aac tcc tgg gaa tca tca agg agt ggg cat tca ttc ctg 450
136 K  I  N  S  W  E  S  S  R  S  G  H  S  F  L 150

451 agc aac ttg cac ttg agg aat ggt gaa ctg gtc atc cat gaa aaa 495
151 S  N  L  H  L  R  N  G  E  L  V  I  H  E  K 165

```

496	ggg ttt tac tac atc tat tcc caa aca tac ttt cga ttt cag gag	540
166	G F Y Y I Y S Q T Y F R F Q E	180
541	gaa ata aaa gaa aac aca aag aac gac aaa caa atg gtc caa tat	585
181	E I K E N T K N D K Q M V Q Y	195
586	att tac aaa tac aca agt tat cct gac cct ata ttg ttg atg aaa	630
196	I Y K Y T S Y P D P I L L M K	210
631	agt gct aga aat agt tgt tgg tct aaa gat gca gaa tat gga ctc	675
211	S A R N S C W S K D A E Y G L	225
676	tat tcc atc tat caa ggg gga ata ttt gag ctt aag gaa aat gac	720
226	Y S I Y Q G G I F E L K E N D	240
721	aga att ttt gtt tct gta aca aat gag cac ttg ata gac atg gac	765
241	R I F V S V T N E H L I D M D	255
766	cat gaa gcc agt ttt ttc ggg gcc ttt tta gtt ggc taa	
256	H E A S F F G A F L V G *	

9.6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BIR	Baculovirus IAP Repeat
41BB/41BBL	41BB-Rezeptor/41BB-Ligand
BS ³	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat
BSA	bovines Serum Albumin
cFLIP	cellular FLIP
°C	Grad Celsius
Caspase	cysteinyl-aspartate-specific proteinases
CHX	Cycloheximid
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CRD	Cysteine rich domain
DD	death domain
DED	death effector domain
DcR1	decoy receptor 1 (=TRAILR3, TRID)
DcR2	decoy receptor 2 (=TRAILR4)
DcR3	decoy receptor 3
CD27/CD27L	CD27-Rezeptor/CD27-Ligand
CD30/CD30L	CD30-Rezeptor/CD30-Ligand
CD40/CD40L	CD40-Rezeptor/CD40-Ligand
CD95/CD95L	CD95-Rezeptor/CD95-Ligand
DISC	death-inducing-signaling-complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphate
DR3	death receptor 3 (=Apo3, TRAMP, WSL-1, LARD)
DR4	death receptor 4 (=TRAILR1)

DR5	death receptor 4 (=TRAILR2, TRICK2, KILLER)
DR6	death receptor 6
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced chemiluminescence
ERK	extracellular signal-regulated kinase (p42/p44)
EMCV	Encephalomyocarditis virus
FCS	fötales Kälber-Serum
FADD	Fas-associating protein with a death domain (=MORT)
FACS	Fluorescent-activated cell sorting
FLIP	FLICE-inhibitory protein
FLIP-L	FLIP-long
FLIP-S	FLIP-short
Flag-Tag	Flag-Epitop (DYKDDDK)
h	Stunde
HRP	horseradish peroxidase
IAP	inhibitor of apoptosis
IL	Interleukin
IFN	Interferon
I κ B	inhibitor of NF κ B
JNK	c-Jun N-terminal Kinase (=SAPK, stress-activated protein kinase)
kDa	Kilo-Dalton
kb	Kilo-Basenpaare
l	Liter
LT α /LT β	Lymphotoxin α /Lymphotoxin β
LT β R	Lymphotoxin- β Rezeptor
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
mM	Millimolar
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MMP	Matrixmetalloproteasen
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid

NF κ B	nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
NGF	nerve growth factor
NT	Nukleotid
OPG	Osteoprotegerin
OX40/OX40L	OX40-Rezeptor/OX40-Ligand
p38 MAPK	P38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
p42/p44 MAPK	siehe ERK
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
RANK	receptor activator of NF κ B
RANK-L	RANK-ligand (=TRANCE)
Rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SCID	severe combined immunodeficiency
sec	Sekunden
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS-gepufferte Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
THD	TNF homology domain
TNC	Trimerisierungsdomäne von Hühner Tenascin-C (Aminosäure 110-139)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand (=Apo2L)
hTRAIL	humanes TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)
mTRAIL	murines TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)
mTRAILR2	muriner TRAIL-Todesrezeptor (mDR5)
mDcTRAILR1	muriner TRAIL-decoy-Rezeptor1
mDcTRAILR2	muriner TRAIL-decoy-Rezeptor2

TRAILR1	TRAIL-Rezeptor 1 (=DR4)
TRAILR2	TRAIL-Rezeptor 2 (=DR5, TRICK2, KILLER)
TRAILR3	TRAIL-Rezeptor 3 (=DcR1, TRID)
TRAILR4	TRAIL-Rezeptor 4 (=DcR2)
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TWEAK	TNF related, weak inducer of apoptosis
u.a.	unter anderem
µl	Mikroliter
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
Z-VAD-fmk	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-Keton

9.7 Publikationen

Berg, D; Lehne, M; Müller, N; Siegmund, D; Münkler, S; Sebald, W; Pfizenmaier, K; Wajant, H (2007). "*Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L.*" *Cell death Differ.* **14**: 2021–2034

9.8 Lebenslauf

Name: Daniela Constanze Berg
Geburtsname: Neff
Geburtsdatum: 05.06.1980
Geburtsort: Esslingen am Neckar
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

09.1986-06.1987 Grundschule Kirchhain, Marburg
09.1987-06.1990 Grundschule Oberschleißheim, München
09.1990-06.1991 Carl-Orff-Gymnasium Unterschleißheim, München
09.1991-06.1999 Deutschhausgymnasium Würzburg
06.1999 Abitur am Deutschhausgymnasium Würzburg, Note: 1,8

Studium

10.1999-08.2004 Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg (Schwerpunkte: Mikrobiologie, Biochemie und Zell-und Entwicklungsbiologie)
10.2003-08.2004 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie unter Leitung von Prof. Dr. J. Kreft mit dem Titel: „Die Rolle der Kohlenhydratverwertung bei der intrazellulären Vermehrung von *Listeria monocytogenes*“
08.2004 Studienabschluß: Diplom-Biologin univ.
Note:1,0
Seit 11.2004 Promotion unter Betreuung von Prof. Dr. H. Wajant an der Medizinischen Poliklinik II der Universität Würzburg in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin mit dem Titel: „Entwicklung von TRAIL-Fusionsproteinen und ihre Wirkung auf Myelomzellen“