

**Charakterisierung eines neuen Tumor Nekrose Faktor
(TNF) Rezeptor 2 (TNFR2) Agonisten: Der heteromere,
membranständige Ligand Lymphotoxin $\alpha_2\beta$**

**Characterization of a novel tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 (TNFR2)
agonist: the heteromeric, membrane bound ligand lymphotoxin $\alpha_2\beta$**

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

vorgelegt von
Kirstin Michaela Kucka

Geb. 19.04.1990 in Offenbach am Main

Würzburg, 2021

Eingereicht am: 20. Mai 2021

Mitglieder der Promotionskommission:

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

Gutachter: Prof. Dr. Harald Wajant

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Müller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Charakterisierung eines neuen Tumor Nekrose Faktor (TNF) Rezeptor 2 (TNFR2) Agonisten: Der heteromere, membranständige Ligand Lymphotoxin $\alpha_2\beta$** “, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

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

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „**Characterization of a novel tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 (TNFR2) agonist: the heteromeric, membrane bound ligand lymphotoxin $\alpha_2\beta$** “ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

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

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

Würzburg, den _____

Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|---|--------|
| 1. | <i>Zusammenfassung</i> | - 6 - |
| 2. | <i>Summary</i> | - 7 - |
| 3. | <i>Einleitung</i> | - 8 - |
| 3.1. | Die Tumor Nekrose Faktor Superfamilie (=TNFSF)..... | - 8 - |
| 3.2. | Liganden der TNFSF..... | - 8 - |
| 3.3. | Rezeptoren der TNFRSF..... | - 9 - |
| 3.4. | Aufbau und Interaktion des Liganden/Rezeptoren-Komplex..... | - 12 - |
| 3.5. | Aktivierung von Rezeptoren der TNFRSF..... | - 17 - |
| 3.6. | Homo- und Heterotrimere..... | - 20 - |
| 3.7. | Das Homotrimer LT α , das Heterotrimer LT $\alpha\beta_2$ und die Interaktion mit ihren Rezeptoren..... | - 22 - |
| 3.8. | NF κ B-System..... | - 23 - |
| 3.9. | Zielsetzung..... | - 25 - |
| 4. | <i>Material</i> | - 26 - |
| 4.1. | Zelllinien..... | - 26 - |
| 4.2. | Fusionsproteine..... | - 26 - |
| 4.2.1. | Verwendete Fusionsproteine - Liganden der TNFSF..... | - 26 - |
| 4.2.2. | Verwendete Fusionsproteine - Rezeptoren der TNFRSF..... | - 27 - |
| 4.2.3. | Verwendete Fusionsproteine - Antikörper..... | - 27 - |
| 4.3. | Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte..... | - 28 - |
| 4.4. | Puffer und Lösungen..... | - 31 - |
| 4.5. | „Fluorescence-activated cell sorting“ (=FACS)-/ Western Blot (=WB)-Antikörper.. | - 33 - |
| 4.6. | Chemikalien, Reagenzien und anwendungsfertige Kits..... | - 35 - |
| 4.7. | Software..... | - 38 - |
| 5. | <i>Methoden</i> | - 39 - |
| 5.1. | Klonierung..... | - 39 - |
| 5.2. | Zellkultur..... | - 39 - |
| 5.2.1. | Transfektion, Produktion und Aufreinigung von Fusionsproteinen..... | - 39 - |
| 5.2.2. | Generierung stabiler Zelllinien..... | - 41 - |
| 5.3. | Bindungsstudien..... | - 41 - |
| 5.3.1. | Punktbindungsstudien..... | - 41 - |
| 5.3.2. | Gleichgewichtsbindungsstudien..... | - 42 - |
| 5.4. | Kokulturassays..... | - 43 - |
| 5.4.1. | IL8- und MCP-1-Expression..... | - 43 - |
| 5.4.2. | Zytotoxizität..... | - 43 - |
| 5.5. | „Enzyme-linked Immunosorbent assay“ (=ELISA)..... | - 44 - |
| 5.6. | Herstellung von Totalzelllysaten..... | - 44 - |

| | | |
|--------|---|---------|
| 5.7. | Gelelektrophorese | - 45 - |
| 5.7.1. | „Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“ (=SDS-PAGE)..... | - 45 - |
| 5.7.2. | Western-Blot..... | - 46 - |
| 5.7.3. | „Enhanced Chemiluminescence“ (=ECL)-Detektion..... | - 47 - |
| 5.7.4. | Silbergel..... | - 47 - |
| 5.8. | Durchflusszytometrie (“Fluorescence-activated cell sorting” =FACS) | - 47 - |
| 5.9. | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie („high performance liquid chromatography“ =HPLC)..... | - 48 - |
| 6. | <i>Ergebnisse</i> | - 49 - |
| 6.1. | Heterotrimerie aus löslichem LT α und löslichem LT β (sLT β) interagieren mit TNFR1, TNFR2 und LT β R | - 49 - |
| 6.2. | Heterotrimerie aus löslichem LT α und membranständigem LT β (memLT β) interagieren mit TNFR1, TNFR2 und LT β R und aktivieren TNFR2 | - 58 - |
| 6.3. | Mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ Heterotrimerie aktivieren TNFR1 und TNFR2 | - 64 - |
| 6.4. | Mem(sc)LT $\alpha_2\beta$, sowie mem(sc)LT $\alpha\beta_2$ aktivieren MCP-1 (<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>)-Expression in murinen Zellen | - 83 - |
| 6.5. | Lösliches (sc)LT $\alpha_2\beta$ (=s(sc)LT $\alpha_2\beta$) aktiviert TNFR1 und TNFR2 vergleichsweise wie TNF | - 85 - |
| 7. | <i>Diskussion</i> | - 91 - |
| 7.1. | Bindung von LT $\alpha_2\beta$ an TNFR1, TNFR2 und LT β R im Vergleich zu LT $\alpha\beta_2$ | - 91 - |
| 7.1. | Aktivierung von TNFR1 und TNFR2 durch LT $\alpha_2\beta$ | - 94 - |
| 7.2. | LT $\alpha_2\beta$ - und LT $\alpha\beta_2$ -Studien in mausbasierten Modellen | - 96 - |
| 8. | <i>Literaturverzeichnis</i> | - 99 - |
| 9. | <i>Anhang</i> | - 105 - |
| 9.1. | Aminosäuresequenzen | - 105 - |
| 9.2. | Vergleiche von humanen und murinen TNFL und TNFR | - 106 - |
| 9.2.1. | LT α | - 106 - |
| 9.2.2. | LT β | - 106 - |
| 9.2.3. | TNFR1..... | - 107 - |
| 9.2.4. | TNFR2..... | - 107 - |
| 9.2.5. | LT β R..... | - 108 - |
| 9.3. | Abbildungsverzeichnis | - 109 - |
| 9.4. | Tabellenverzeichnis..... | - 111 - |
| 9.5. | Abkürzungsverzeichnis | - 112 - |
| 9.6. | Publikationsverzeichnis..... | - 119 - |
| 9.7. | Danksagung..... | - 120 - |

1. Zusammenfassung

Seit mehr als zwei Jahrzehnten ist bekannt, dass nicht nur der Tumor Nekrose Faktor- α (=TNF- α) sondern auch Lymphotoxin- α (=LT α) in Form von Trimeren an TNFR1 und TNFR2 binden kann. Durch diese Fähigkeit an beide Rezeptoren zu binden, haben diese zwei Liganden eine essentielle Rolle in der Entwicklung und dem Verlauf von Autoimmunerkrankungen. Bereits mit Beginn der 1990er Jahren wurde gezeigt, dass LT α nicht nur in Form von Homotrimeren vorliegt, sondern auch mit dem verwandten TNF-Superfamilie Liganden Lymphotoxin β (=LT β) Heterotrimere bilden kann. Hierbei lagern sich LT α und LT β in Form von LT $\alpha_2\beta$ und LT $\alpha\beta_2$ zusammen. Die initialen Experimente mit diesen Heterotrimeren zeigten bereits Unterschiede von LT $\alpha_2\beta$ und LT $\alpha\beta_2$. Während LT $\alpha_2\beta$ wie LT α an den TNFR1 bindet, kann LT $\alpha\beta_2$ weder an TNFR1 noch TNFR2 binden und interagiert mit einem eigenen Rezeptor namens Lymphotoxin β Rezeptor (=LT β R). Da bereits zwei Liganden (TNF und LT α) für TNFR1 und TNFR2 bekannt waren, wurde LT $\alpha_2\beta$ bis heute nicht weiter charakterisiert. LT $\alpha\beta_2$ hingegen war lange Zeit der einzige bekannte Ligand für den LT β R, weshalb die LT $\alpha\beta_2$ -LT β R-Interaktion ausführlich untersucht wurde.

Diese Arbeit fokussiert sich auf die Charakterisierung von LT $\alpha_2\beta$. Hierfür wurde die einzige bekannte Eigenschaft aus den 90er Jahren von LT $\alpha_2\beta$ nämlich die Bindung an TNFR1 aufgegriffen und um die Rezeptoren TNFR2 und LT β R erweitert. Diese Arbeit zeigt, dass LT $\alpha_2\beta$ nicht nur an den TNFR1, sondern auch an TNFR2 und schwach an LT β R bindet. Trotz der asymmetrischen Bindestellen kann membranboundenes LT $\alpha_2\beta$ TNFR1 und TNFR2 nicht nur binden, sondern ist auch in der Lage diese zu aktivieren. Diese Arbeit gibt erste Einblicke in die Komplexität dieses Heterotrimers indem gezeigt wird, dass LT $\alpha_2\beta$ sowohl in seiner löslichen als auch in seiner membranboundenen Form den TNFR1 aktivieren kann, während der TNFR2 nur durch das membranständige LT $\alpha_2\beta$ aktiviert wird. Aufgrund der aktivierenden Eigenschaften von membranständigem LT $\alpha_2\beta$ und LT $\alpha\beta_2$ auf die murine (=mu) Panc02-Zelllinie wird ein ersten Ausblick auf mögliche weitergehende Experimente in mausbasierten Modellen gegeben. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass mit membranständigem LT $\alpha_2\beta$ ein neuer TNFR2 Agonist gefunden wurde.

2. Summary

Since more than two decades it is known, that not only the Tumor Necrosis Factor- α (=TNF- α) but also lymphotoxin-a (=LT α) bind to TNFR1 and TNFR2. Because of their ability to interact with both of these two receptors, the two ligands play a crucial role in the development and persistence of autoimmune diseases. Already at the beginning of the 1990th, it has been shown that LT α forms homotrimers but is also able to form heterotrimers with the related TNF-Superfamily ligand lymphotoxin- β (=LT β). Thereby, LT α and LT β associate to form LT $\alpha_2\beta$ and LT $\alpha\beta_2$. Initial experiments already have shown differences between LT $\alpha_2\beta$ and LT $\alpha\beta_2$. While LT $\alpha_2\beta$ can bind to TNFR1 like LT α , LT $\alpha\beta_2$ can bind neither to TNFR1 nor to TNFR2 but interacts with its own receptor called LT β R. Due to the fact that already two ligands (LT α and TNF) for TNFR1 and TNFR2 were known, LT $\alpha_2\beta$ was not further characterized. Since LT $\alpha\beta_2$ was the only known ligand for the LT β R, this LT $\alpha\beta_2$ -LT β R interaction was further and intensively investigated.

This work is focused on LT $\alpha_2\beta$ and its characterization. For this purpose the initial and only finding reported for in the 1990th namely the binding to TNFR1 were taken up and expanded for the interaktion with TNFR2 and LT β R. The results of this work show that LT $\alpha_2\beta$ can not only bind to TNFR1, but also to TNFR2 and weaker to LT β R. Despite its asymmetric binding sites, membrane bound LT $\alpha_2\beta$ was shown not only to bind, but also to be able to activate TNFR1 and TNFR2. This work shows that LT $\alpha_2\beta$ can activate the TNFR1 receptor in its soluble and membrane bound form while TNFR2 can only be activated by membrane bound LT $\alpha_2\beta$. Due to the activating properties of membrane bound LT $\alpha_2\beta$ and LT $\alpha\beta_2$ on murine (=mu) Panc02 cells a first outlook on further experiments in mouse based models will be given. These findings show, that membrane bound LT $\alpha_2\beta$ is a new TNFR2 agonist.

3. Einleitung

3.1. Die Tumor Nekrose Faktor Superfamilie (=TNFSF)

Die Funktionalität eines Organismus ist abhängig von einem sensiblen Gleichgewicht aus aufbauenden und abbauenden Prozessen, welches durch ein komplexes und stark reguliertes Netzwerk von Interaktionen und Signalkaskaden zustande kommt. Wird dieses Netzwerk gestört und gerät in ein Ungleichgewicht, kann dies immense Folgen für Entwicklungsvorgänge, immunregulatorische Prozesse und den Erhalt der Gewebemöostase haben oder zur Entwicklung von genetischen Erkrankungen oder Autoimmunerkrankung führen, wie beispielsweise der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) oder rheumatoide Arthritis (=RA) (1-7).

Eine wichtiger Baustein in diesem Geflecht sind die Zytokine der TNFSF. Bereits in den 1960/70ern wurden die ersten Mitglieder dieser Gruppe entdeckt. Hierbei handelte es sich um den Namensgeber, den Tumor Nekrose Faktor (=TNF) und kurz darauf das Lymphotoxin- α (=LT α). Damals wurde herausgefunden, dass diese Liganden von Makrophagen und Lymphozyten produziert werden und zur Lyse von bestimmten Zelltypen, insbesondere von Tumorzellen führen (8,9). Untersuchungen der komplementären Desoxyribonukleinsäuren (=DNS) dieser zwei Proteine wiesen signifikante Ähnlichkeiten auf, weshalb sie zu einer Superfamilie zusammengefasst wurden (10,11). Nicht nur Liganden wie LT α und TNF ähneln sich, sondern auch ihre Rezeptoren. Sie bilden die TNF-Rezeptor-Superfamilie (=TNFRSF) (12-15).

3.2. Liganden der TNFSF

Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften wurden seit der Entdeckung von TNF und LT α bislang 17 weitere Liganden der TNFSF gefunden (16,17). Die Liganden der TNFSF besitzen eine charakteristische C-terminale Domäne, welche aufgrund der Ähnlichkeit zu TNF als TNF-Homologie-Domäne (=THD) bezeichnet wird. Sie werden als Transmembranproteine des Types II exprimiert und liegen membrangebunden vor. Diese Liganden können sich aufgrund ihrer THD zu Trimeren zusammenlagern. Die THD fördert nicht nur die Trimerisierung, sondern vermittelt auch die Bindung an die jeweiligen Rezeptoren (18,19). Die Proteine der TNFSF besitzen zwischen der extrazellulären THD und der Transmembrandomäne eine sogenannte „stalk“-Region, welche als Ansatzpunkt für Metalloproteinasen dient. In diesem Bereich können die

Transmembran-TNFSF-Liganden durch Proteinasen wie ADAM17 prozessiert werden, so dass die Liganden auch in löslicher Form vorliegen können (Abbildung 3.1) (20-22). Dies ist für den Großteil der TNFSF-Liganden der Fall. Mit LT α ist jedoch auch eine Ausnahme bekannt. Bei diesem Liganden ähnelt der N-Terminus einem Signalpeptid. Deshalb findet die Prozessierung von membranständigem zu löslichem LT α sehr effizient statt. LT α kann daher nicht oder nur sehr schwer in seiner membranständigen Form detektiert werden, wodurch dieses Protein nur als löslicher Ligand bekannt ist (23). Die Zusammenlagerung zu Trimeren wird durch die THD vermittelt. Deshalb können auch TNFSF-Proteine in ihrer löslichen Form Trimere bilden und an ihre jeweiligen Rezeptoren binden. Obwohl sowohl die membrangebundene, als auch die lösliche Form der TNFSF-Liganden an TNFRSF-Rezeptoren binden können, können die unterschiedlichen Ligandenformen verschiedene Auswirkungen auf die Rezeptoraktivierung haben.

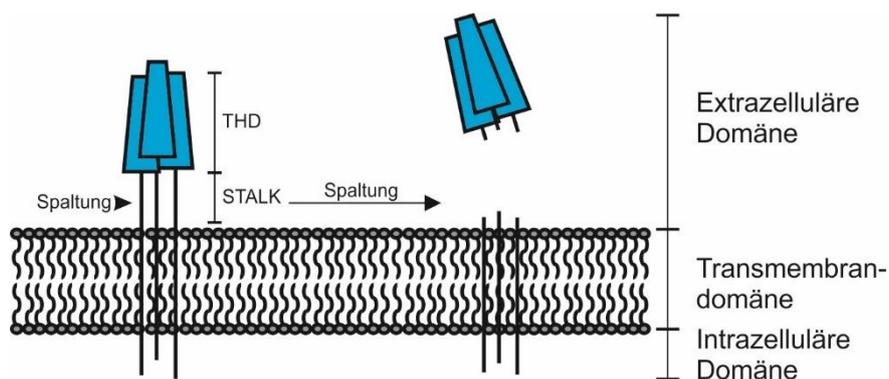


Abbildung 3.1: Liganden der TNFSF

Einzelne Ligandenprotomere (blau) können sich zu Trimeren zusammenlagern. Spaltung der THD von der Transmembrandomäne findet in der „STALK“-Region durch Metalloproteinasen statt. Lösliche Ligandenprotomere können auch als Trimere vorliegen.

3.3. Rezeptoren der TNFRSF

Interaktionspartner der Liganden der TNFSF sind die Rezeptoren der TNFRSF (1,16). Heutzutage sind 29 verschiedene Rezeptoren der TNFRSF im menschlichen Genom bekannt. Extrazellulär zeichnen sich diese Rezeptoren durch ihre konservierten cysteinreichen Domänen „cysteine rich domain“ (=CRD) aus. Hierbei unterscheiden sich die einzelnen Rezeptoren anhand ihrer Wiederholungen an CRD. Die Rezeptoren der TNFRSF besitzen 1-4 CRD-Wiederholungen. Eine Ausnahme ist CD30, welches je nach Publikation 5 oder 6 CRD besitzt (Abbildung 3.2) (16,24,25) Mit Hilfe der CRD-

Module können die Rezeptoren an ihre jeweiligen Liganden binden und mit ihnen interagieren.

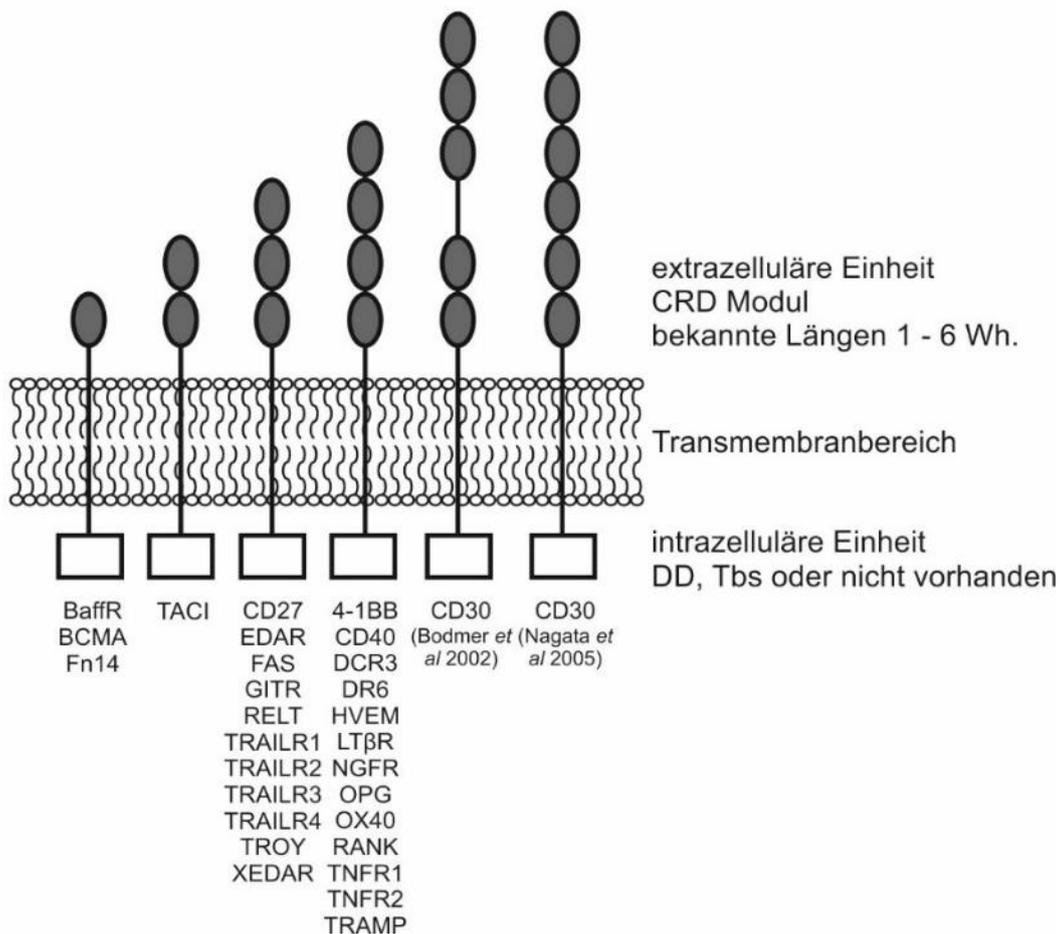


Abbildung 3.2: CRD-Module der TNFRSF

Schema der unterschiedlich langen extrazellulären CRD. Der Großteil der TNFR kodieren für drei oder vier CRD. Die Rezeptoren sind ihren jeweiligen CRD-Wiederholungen zugeordnet.

Ein Großteil dieser Rezeptoren wird in Form von Transmembranproteinen des Types 1 exprimiert, jedoch sind mit den Rezeptoren „B-cell activating factor receptor“ (=BaffR), „Transmembrane activator and CAML interactor“ (=TACI), „B-cell maturation antigen“ (=BCMA) und „X-linked ectodysplaslin-A2 receptor“ (=XEDAR) auch Ausnahmen bekannt, welche als Transmembranproteine des Typs 3 vorliegen ⁽²⁶⁾. Transmembranproteine des Types 1 besitzen eine extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus während die Transmembranproteine des Types 2 kein Signalpeptid besitzen ⁽¹⁶⁾. Rezeptoren der TNFRSF sind jedoch nicht nur membranständig, sondern können wie ihre Liganden durch proteolytische

Prozessierung oder alternatives Spleißen auch in löslicher Form vorliegen. Ausnahmen sind hierbei die Rezeptoren Osteoprotegerin (=OPG) und „Decoy Receptor 3“ (=DcR3), welche aufgrund einer fehlenden Transmembrandomäne nur als lösliche Rezeptoren vorkommen (¹⁶). Anhand ihrer intrazellulären Funktion und Struktur können die Rezeptoren der TNFRSF in drei Untergruppen unterteilt werden. Zum Einen die „Decoy“-Rezeptoren, welche wie OPG oder DcR3 keine Transmembrandomäne und keine intrazelluläre Funktionalität besitzen. Diese können jedoch als Regulatoren von anderen TNFRSF-Rezeptoren fungieren. Zum Anderen die Gruppe der Todesrezeptoren, welche durch ihre intrazelluläre Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die sogenannten Todesdomänen („death domain“ = DD), mit anderen Proteinen mit einer DD interagieren können. Diese Rezeptoren sind nicht nur in der Lage den Zelltod zu induzieren, sondern spielen unter anderem auch eine Rolle in inflammatorischen Prozessen. Der größte Teil der TNFRSF bildet jedoch die Gruppe der TNF Rezeptor assoziierten Faktoren (=TRAF)-interagierenden TNFRSF-Rezeptoren. Abhängig vom jeweiligen Rezeptor können diese bis zu drei Bindungsstellen („TRAF binding site“ = Tbs) für Adapterproteine der TRAF-Familie besitzen und zeichnen sich durch ihre prominente Rolle in proinflammatorischen Signalwegen aus (Abbildung 3.3) (¹⁹).

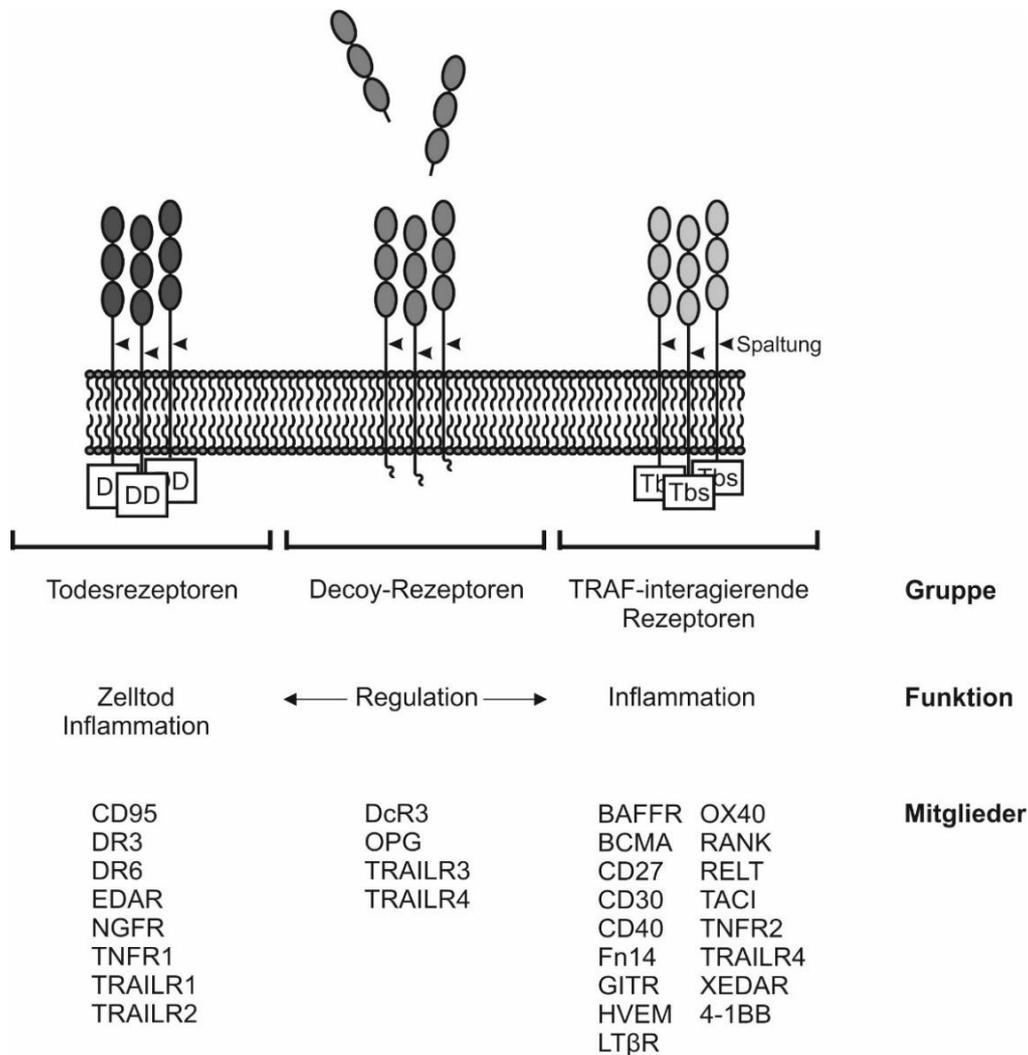


Abbildung 3.3: Unterguppen der TNFR

Rezeptoren sind abhängig von ihrer intrazellulären Domäne in Todesrezeptoren mit ihrer Todesdomäne und den TRAF-interagierenden Rezeptoren mit ihrer Tbs unterteilt. Decoy-Rezeptoren besitzen keine intrazelluläre Domäne oder liegen nur als lösliche Rezeptoren vor. Angriffstellen für die Prozessierung von membranständig zu löslichen Rezeptoren in der Stalk-Region sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Während Todesrezeptoren mit dem Zelltod und der Inflammation assoziiert werden, sind die TRAF-interagierenden Rezeptoren kennzeichnend für die inflammatorische Immunantwort. Decoy-Rezeptoren haben eine regulatorische Funktion inne.

3.4. Aufbau und Interaktion des Liganden/Rezeptoren-Komplex

Die Interaktion zwischen Liganden und Rezeptoren kommt durch den dreidimensionalen Aufbau der THD-Strukturen der Liganden und der CRD der Rezeptoren zustande. Die Bindung zwischen Liganden- und Rezeptormolekülen verläuft nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip, welches die Bildung eines Proteinkomplexes aufgrund von schwachen nicht-kovalenten Wechselwirkungen

beschreibt. Aufgrund dieser Wechselwirkungen können nicht alle Proteine untereinander Komplexe bilden. Der Aufbau und die Stabilität der Komplexe sind von der Tertiärstruktur der einzelnen Proteine abhängig. Durch ihre dreidimensionale Struktur/Faltung bilden Proteine Furchen und Taschen aus, wodurch nur die Bindung von den adequaten Partnern bewerkstelligt werden kann (27).

Die THD der TNFSF-Liganden bestehen aus 150 Aminosäuren, die eine Sequenzähnlichkeit von 25-30 % zueinander aufweisen. Die Aminosäuresequenzen der THD bilden zehn β -Stränge, wobei sich jeweils fünf von ihnen zu einem antiparallelen, Ziehharmonika-ähnlichen β -Faltblatt zusammenlagern. Durch Übereinanderlagerung formen diese beiden Faltblätter ein β -Sandwich mit einer „jelly roll“-Faltung. Ein Großteil der konservierten Aminosäuren besteht aus aromatischen und hydrophoben Aminosäuren, welche innerhalb der TNFSF konserviert sind. Reste dieser Aminosäuren bewerkstelligen die Zusammenlagerung der einzelnen Tertriärstrukturen zu Trimeren, indem die Bindung der einzelnen THD durch die innen liegenden Faltblätter (A, A', H, C und F) bewerkstelligt wird. Die Aminosäuren der außen liegenden Faltblätter (B', B, D, E und G) sind nicht konserviert und sind für die Interaktion mit den CRD der Rezeptoren zuständig (Abbildung 3.4) (16,17,28).

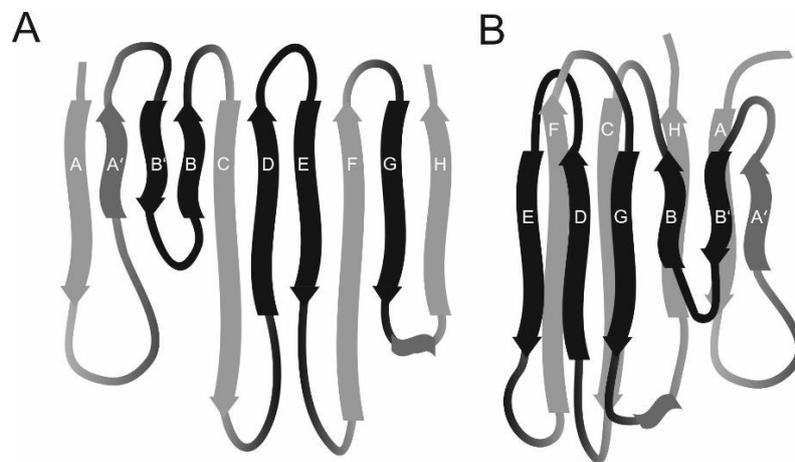


Abbildung 3.4: Aufbau der TNF THD

(A) Schematisch dargestellt sind die exprimierten β -Faltblätter (dargestellt als Pfeile) der THD von $LT\alpha$ mit der Reihenfolge A, A', B', B, C, D, E, F, G, H. (B) Die Tertiärstruktur der THD von $LT\alpha$ zeigt die schematische Zusammenlagerung der β -Faltblätter zu einem β -Sandwich mit einer „jelly roll“-Faltung. Als Grundlage dieser Abbildung diente die Interaktion P01375 aus der Datenbank UniProtKB.

Aufgrund dessen, dass sich die außen liegenden Faltblätter voneinander unterscheiden, kann die Bindung an unterschiedliche Rezeptoren gewährleistet

werden. Die Zusammenlagerung der THDs führt zu einer Quartärstruktur des Trimers, welche dem Erscheinungsbild einer umgedrehten Pyramide gleicht. Hierbei bilden die Kontaktstellen benachbarter THDs Furchen, die als Interaktionsstelle für bestimmte CRD eines Rezeptormoleküls fungieren. Trimere bilden durch ihren strukturellen Aufbau somit drei Interaktionsstellen, welche die Bindung von drei Rezeptormolekülen ermöglichen. Bei Besetzung aller möglichen Interaktionsstellen führt dies zu einer Stöchiometrie von 3:3 (Ligandenmoleküle : Rezeptormoleküle) (^{16,17}).

Während die Liganden strukturell ein relativ einheitliches Erscheinungsbild aufweisen, ist dies für ihre Rezeptoren nicht der Fall, da diese sich mit ihren unterschiedlichen CRD-Wiederholungen stark unterscheiden. Nichtsdestotrotz besitzt die Gruppe der TNFRSF auch strukturelle Gemeinsamkeiten. Einzelne CRD bestehen aus jeweils zwei unterschiedlichen Modulen. Bis dato konnten die bekannten Module aus kristallografischen Untersuchungen in A-, B-, C-, D- oder N-Module untergliedert werden, welche sich in der Länge der Aminosäuresequenz und der daraus resultierenden Tertiärstruktur unterscheiden (^{29-31,32}). A-Module bestehen aus drei kurzen β -Strängen, welche durch Disulfidbrücken zwischen den Strängen eine charakteristische C-Struktur aufweisen. Aminosäuresequenzen der B-Module kodieren für drei anti-parallele β -Stränge, die durch ihre Disulfidbrücken eine typische S-Struktur ausbilden. C- und N-Module weisen Ähnlichkeiten mit dem B-Modul auf, sind innerhalb der TNFRSF jedoch nur selten vertreten und noch nicht ausführlich untersucht (²⁹⁻³¹). Die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen führen nicht nur zur Untergliederung in verschiedene Module sondern können auch dazu führen, dass die enthaltenen Disulfidbrücken innerhalb eines Moduls variieren. Hierdurch werden die Module in die Gruppen eins und zwei unterteilt, wodurch angegeben wird ob das Modul eine oder zwei Disulfidbrücken besitzt. Die unterschiedliche Anzahl der Disulfidbrücken hat jedoch keinen Einfluss auf die resultierende Struktur des Moduls. Am häufigsten vertreten in der Gruppe der TNFRSF sind Kombinationen aus den Modulen A und B in Form von A1B2 und A2B1 (¹⁶).

Kristallstrukturanalysen unter anderem aus dem Ligand/Rezeptor-Komplexen von $LT\alpha/TNFR1$ (Abbildung 3.5), $LT\alpha\beta_2/LT\beta R$, „Cluster of Differentiation“ (=CD)40L/CD40, OX40L/OX40, „Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand“ (=TRAIL)/TRAILR2, „Receptor Activator of NF- κ B“ Ligand (=RANKL)/RANK, „TNF ligand 1A“ (=TL1A)/DcR3, LIGHT/DcR3, Baff/BaffR, Baff/BCMA, „a proliferation-

inducing ligand“ (=APRIL)/TACI und APRIL/BCMA zeigten, dass jede Interaktionsstelle der Ligandentrimere durch CRD eines Rezeptormoleküls besetzt werden (^{30,33-42}).

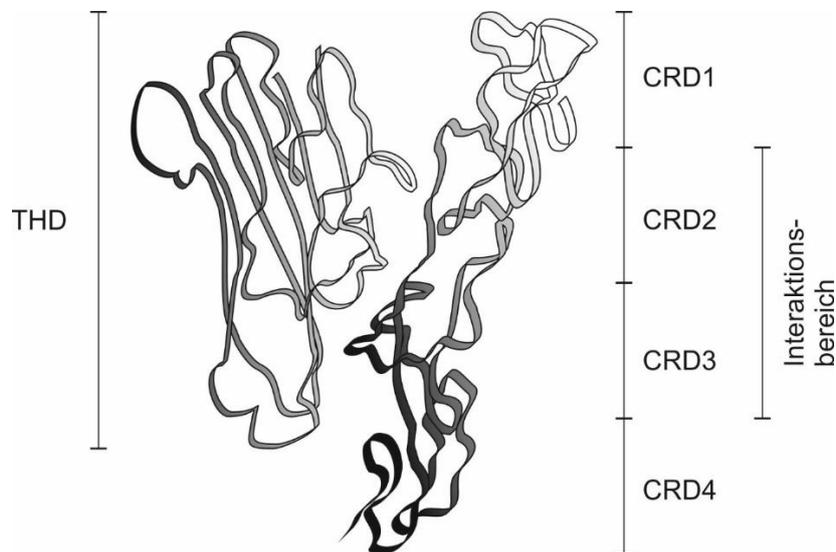


Abbildung 3.5: Interaktion LTα-TNFR1-Protomere

Dargestellt sind die schematischen Tertiärstrukturen der THD von LTα und der extrazellulären CRD eines TNFR1-Moleküls. Der Interaktionsbereich zwischen der THD und dem Rezeptormolekül ist im Bereich der CRD2 und CRD3 angedeutet. Als Grundlage dieser Abbildung diente die Interaktion P01374 aus der Datenbank SWISSMODEL.EXPASY.

Strukturelle Vergleiche der LTα/TNFR1- und CD40L/CD40-Komplexe konnten zwei Bereiche identifizieren, in denen die Rezeptoren an die Liganden binden. Ein Bereich (Bereich A) befindet sich zwischen dem zweiten Modul der CRD zwei und der CRD drei, welche mit den Strängen D, E und G, sowie den Schleifen C-D, E-F und G-H des Liganden interagieren. Im zweiten Bereich (Bereich B) interagieren die CRD eins und das erste Modul der CRD zwei mit dem A', B', E-Strang und den A'-B', D-E-Schleifen des Liganden (Abbildung 3.6) (^{16,33}).

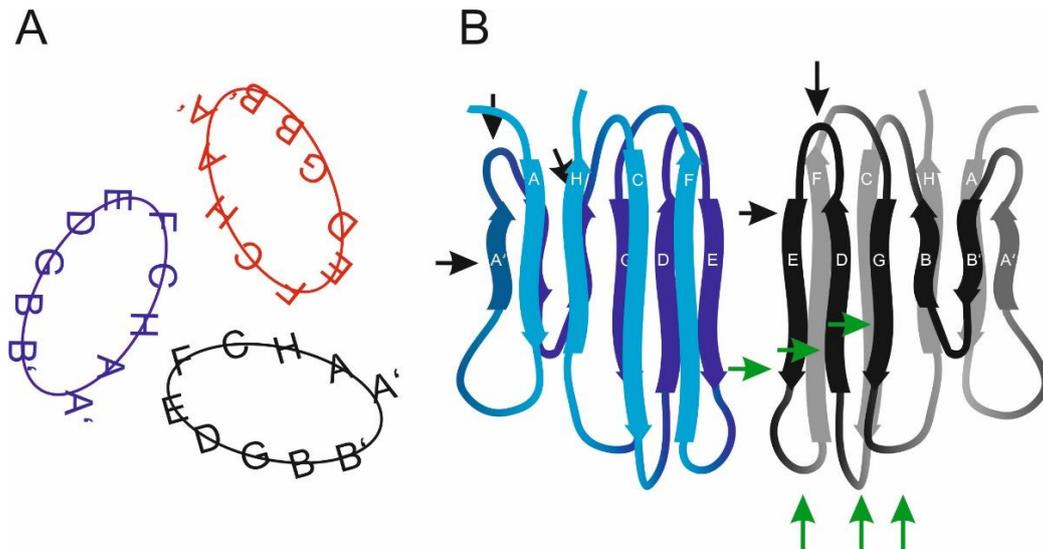


Abbildung 3.6: Aufbau und Bindestellen des CD40L-Trimers

(A) Schematisch dargestellt ist die Zusammenlagerung von drei CD40L-Protomeren in den Farben Schwarz, Blau und Rot mit der Lokalisation der einzelnen β -Faltblätter im „jelly roll“ – Sandwich in Form einer Ellipse. (B) Schematische Aufsicht der Kontaktfläche zwischen zwei THDs. Dargestellt in Blau- und Schwarztönen. Bereich A-Interaktionsstellen sind mit grünen Pfeilen markiert, während schwarze Pfeile die Interaktionsstellen des Bereichs B mit dem Rezeptormolekül kennzeichnen.

Während Bereich B für TNFR1 und CD40 stark homolog ist, sind die Bereiche A des TNFR1 und CD40 unterschiedlich zueinander. Dies zeigt sich insbesondere in der Verteilung der Kontaktfläche mit dem Liganden. Die Interaktion von $LT\alpha$ /TNFR1 weist eine gleichmäßige Verteilung der Bindung zwischen dem Rezeptormolekül und den zwei Ligandenmolekülen auf. Für CD40 wurde jedoch gezeigt, dass die CRD hauptsächlich nur mit einem der beiden involvierten Ligandenmoleküle interagiert ⁽³³⁾. Auch für die Paarung Apo2L/TRAILR2 wurden diese Bereiche als Interaktionsflächen gefunden. Hierbei zeigte sich eine starke Homologie mit dem Bereich B zu den $LT\alpha$ /TNFR1- und CD40L/CD40-Komplexen ⁽³⁰⁾. Für den Proteinkomplex aus OX40L und OX40 wurden zusätzlich zu den Kontaktbereichen zwischen der CRD2 und CRD3 auch Kontaktbereiche der CRD1 mit dem Ligandentramer gefunden ⁽³⁶⁾.

Ein Großteil der Kristallstrukturanalysen beschäftigt sich mit TNFL/TNFR-Komplexen von Rezeptoren mit drei oder vier CRD wie z.B. $LT\alpha$ /TNFR1, $LT\alpha\beta_2$ /LT β R, CD40L/CD40, OX40L/OX40, TRAIL/TRAILR2 ^(30,33,34,36,40). Diese Analysen zeigen Interaktionsbereiche der Liganden mit den CRD zwei und drei der Rezeptoren so zum Beispiel bei den Interaktion von RANKL mit RANK und TL1A oder LIGHT mit DcR3

(^{32,38,43-45}). Ausnahmen wurden mit den Paarungen CD160/„Herpesvirus entry mediator“ (=HVEM) und „B- and T-lymphocyte attenuator“ (=BTLA)/HVEM aber auch nachgewiesen. Hier bindet HVEM nur mit seiner CRD1 an die Bindungspartner, die allerdings nicht zur TNFRSF gehören (^{46,47}). Die Rezeptoren BCMA, BaffR oder TACI besitzen nur zwischen einer halben und zwei CRDs (^{32,43}). Trotz ihrer geringeren Anzahl an CRD besitzen diese Rezeptoren eine vergleichbare Bindungsaffinität zu ihrem Ligand wie andere TNFSF-TNFRSF Paarungen (^{43,48}). Die Interaktion zwischen Ligandentriemer und Rezeptormolekülen hat nicht nur Einfluss auf ihre Konformation, sondern auch durch ihre intrazellulären Domänen auf die Weiterleitung von Signalen. Auf diese Signalwege wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

3.5. Aktivierung von Rezeptoren der TNFRSF

Nicht gebundene Rezeptormoleküle können als Monomere oder auch als Di- oder Trimere vorliegen. Die Zusammenlagerung von Rezeptorprotomeren kann durch kovalente Cysteinbrücken oder durch nicht-kovalente Interaktionen spezifischer Bereiche, welche nicht in die Bindung an den Liganden involviert sind, zustande kommen (⁴⁹). Einer dieser Bereiche ist die sogenannte „pre-ligand assembly domain“ (=PLAD), die die erste CRD der meisten TNFR umfasst und keinen direkten Einfluss auf die Bindung von Liganden besitzt (⁵⁰). Neben der PLAD sind auch Bereiche in der Transmembrandomäne oder dem C-terminalen Ende der Rezeptoren bekannt, welche zur Zusammenlagerung von TNFRSF-Rezeptoren beitragen können (^{51,52}). Trotz der Zusammenlagerung von TNFRSF-Rezeptoren zu Trimeren oder Oligomeren führt dies nicht zur Aktivierung TNFR-assoziierter Signalwege. Hierfür ist die Bindung der dazugehörigen Ligandentrimere notwendig, wodurch eine Konformationsveränderung der intrazellulären Bestandteile der Rezeptorenprotomere zustande kommt und/oder auch der trimere Rezeptorkomplexe stabilisiert wird. Die Bindungsaffinitäten von TNFSF-Liganden für TNFRSF-Rezeptoren sind signifikant höher als die der PLAD-PLAD-Interaktion, wodurch sich das Gleichgewicht zwischen PLAD-PLAD-Interaktionen und Liganden/Rezeptoren-Komplexen auf die Seite der Rezeptor-Ligand-Bindung verschiebt (^{19,53,54}).

Durch die Beschaffenheit ihrer THD formen die Liganden der TNFSF lösliche, als auch membranständige Trimere und können mit hoher Affinität mit den Rezeptoren der TNFRSF interagieren. Die Rezeptoren können neben der Untergliederung anhand

ihrer intrazellulären Domäne auch durch ihre Antwort auf die Bindung von membranständigen und löslichen Liganden unterteilt werden (Abbildung 3.7). Zum Einen die Rezeptoren der Kategorie 1, welche durch die Bindung löslicher Ligandentrimere aktiviert werden. Hierzu gehören u.a. TNFR1, LT β R oder DR3. Zum Anderen die Rezeptoren der Kategorie 2, welche zwar mit hoher Bindungsaffinität mit löslichen Trimere interagieren, aber kaum aktiviert werden, sondern nur durch die membranständige Variante des Liganden. Durch ihre Verankerung in der Membran zeigen membranständige Liganden eine verringerte Mobilität und können in einer vergleichsweise hohen Anzahl im Kontaktbereich zweier Zellen vorliegen. Dies hat eine sekundäre Aggregation von Trimeren zur Folge (⁴⁹). Diese zweite Gruppe umfasst den Großteil der signalfähigen TNFRSF, wie 4-1BB, CD27, CD40, CD95, „Fibroblast growth factor-inducible“ (=Fn14), OX40 oder auch den TNFR2. Interessanterweise können diverse TNFSF-Liganden wie u.a. TNF, LT α oder Baff an mehrere Rezeptoren binden. So binden TNF oder LT α sowohl an TNFR1 als auch an TNFR2, während Baff mit BaffR, BCMA und TACI interagiert. LT α aktiviert aufgrund seiner löslichen Form nur den TNFR1, wohingegen TNF, als Membran-TNF, Rezeptoren beider Kategorien stimulieren kann. TNFR1 kann sowohl durch die löslichen, als auch durch die membrangebundenen Trimere aktiviert werden, TNFR2 jedoch nur durch die membranständige Form (⁵⁵⁻⁵⁷).

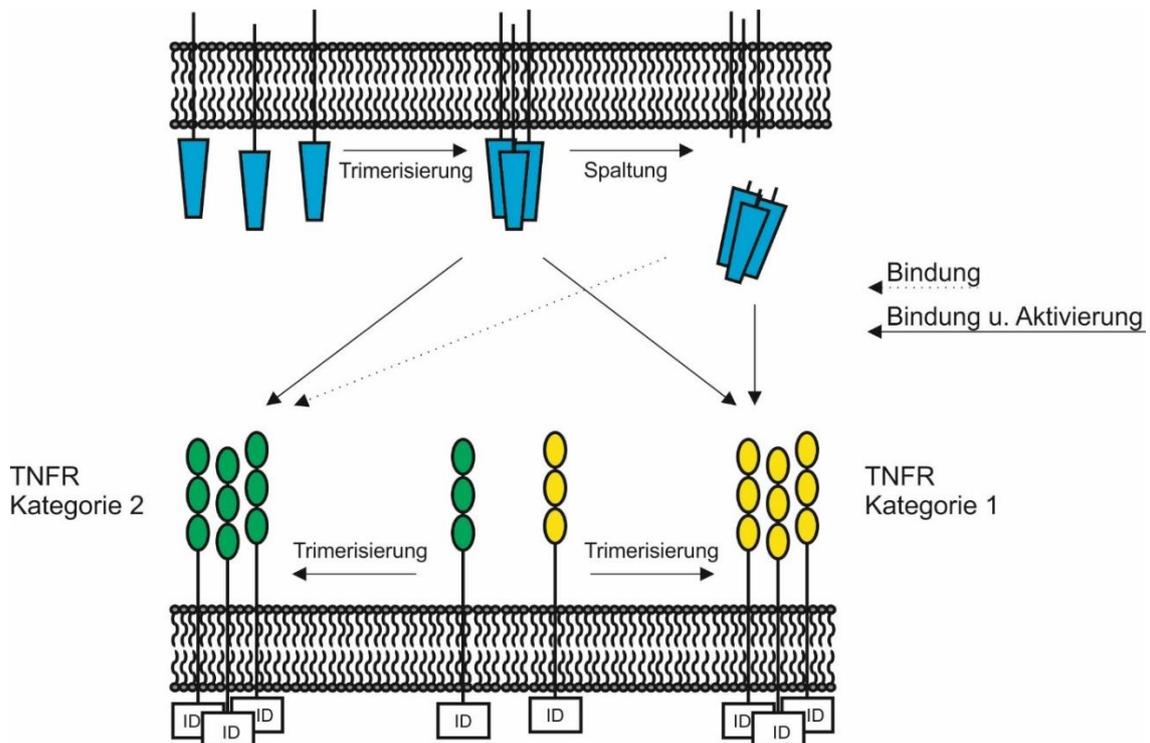


Abbildung 3.7: Aktivierungsschema der TNFR-Kategorien

Ligandenprotomere liegen in der Membran als Monomere vor. Durch Formung von Trimeren in membranständiger oder löslicher Form kommt es zur Interaktion mit Rezeptormolekülen und deren Aktivierung. Rezeptoren der Kategorie 1 (gelb) wie z.B. TNFR1 können durch lösliche, als auch membranständige Ligandentrimere aktiviert werden. Eine Aktivierung der Rezeptoren der Kategorie 2 (grün) kann nur durch membranständige Ligandentrimere bewerkstelligt werden, jedoch können lösliche Trimere binden und den Rezeptor blockieren. Sowohl Kategorie 1, als auch Kategorie 2 Rezeptoren enthalten Todesrezeptoren, als auch TRAF-interagierende Rezeptoren. Die jeweilige intrazelluläre Domäne wurde mittels „ID“ angedeutet.

Durch zusätzliche natürlich vorkommende N-terminale Bindungsstellen oder gentechnisch eingebrachte Membranverankerungsdomänen können lösliche Liganden auch in einer membran-assoziierten Form vorliegen und dadurch ihre Wirkungsweise so verändern, dass sie der natürlichen aktiven membranständigen Ligandenform entsprechen ⁽⁴⁹⁾. Dies kann wie bei dem Ligand APRIL durch Bindungsstellen für Proteoglykane ^(58,59) oder wie bei CD95L für Fibronectin ^(60,61) zustande kommen. Hierbei werden die löslichen Liganden an den N-terminalen Bindungsstellen gebunden und erhalten somit einen „membranständigen“ Status, während die C-terminalen THD weiter mit den TNFRSF-Rezeptoren interagieren kann.

Oligomerisierungen von Trimeren können jedoch auch ohne zusätzliche Bindungsstellen zustande kommen. So wurde für CD95L gezeigt, dass die Aggregation an Trimeren auch durch Oxidation stattfinden kann (^{54,62}).

Neben der Bindung an die Liganden und der daraus resultierenden Konformationsänderung der Rezeptormoleküle spielen auch die nachgeschalteten Proteine der Signalwege eine Rolle. Die sekundäre Aggregation von zwei oder mehreren Ligandentriemer/Rezeptoren-Komplexen ist notwendig, um eine aktive Weiterleitung des Signals durch die Signalkaskade der TNFR der Kategorie zwei zu gewährleisten. Für diese TNFR ist dies durch die Bindung von membranständigen Ligandentrimern möglich. Rezeptoren der Kategorie eins können bereits durch Interaktion mit löslichen Ligandentrimern aktiviert werden. Anhand von Vergleichen von TNFR1 und TNFR2 wurde herausgefunden, dass die STALK-Region für die vom Liganden unabhängige lokale Anreicherung der Rezeptormoleküle in der Membran verantwortlich ist. Während sich die TNFR1-Rezeptoren zusammenlagern können und durch lösliches TNF aktiviert werden, verhindert der STALK-Bereich des TNFR2 diese Zusammenlagerung. Deswegen kann der TNFR2 nur durch membranständiges TNF aktiviert werden (⁶³). Aktivierungen von Todesrezeptoren wie TNFR1 oder von TRAF-interagierenden Rezeptoren wie TNFR2 durch ihre Liganden bewirken die Signalinduktion des NF κ B-Systems (^{20,64,65}).

3.6. Homo- und Heterotrimere

Wegen der konservierten Aminosäuren der inneren β -Faltblätter der THD der TNFSL ist es nicht verwunderlich, dass diese nicht nur Homotrimere, sondern in seltenen Fällen auch Heterotrimere bilden können. Die Bildung von Heterotrimern führt aufgrund der außen liegenden β -Faltblätter und der Trimerbildung zwangsläufig zu einer asymmetrischen Struktur. Während Homotrimere jeweils dreimal dieselbe Interaktionsfläche besitzen, führt die Bildung von Heterotrimern zu unterschiedlichen Interaktionsstellen. Da durch die Trimerisierung ein Verhältnis von 1:2 oder 2:1 von Ligand A zu Ligand B besteht, bleibt jeweils eine Bindungsstelle des Homotrimers bestehen. Die Kontaktflächen zwischen Ligand A und Ligand B führen jedoch zu zwei unterschiedlichen heteromeren Interaktionsflächen (Abbildung 3.8) (^{40,66-68}).

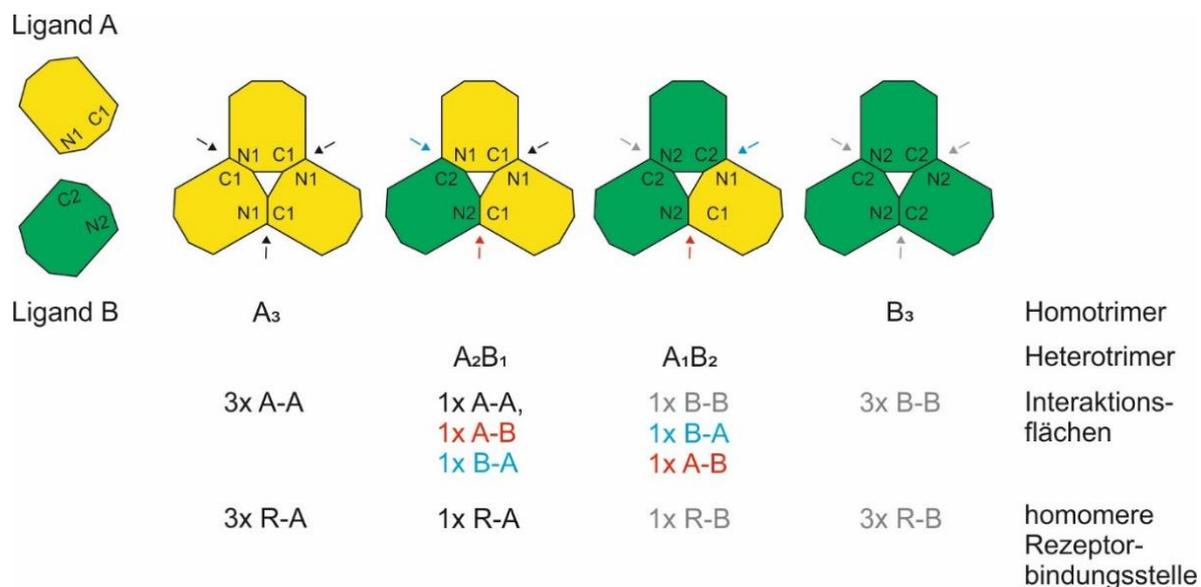


Abbildung 3.8: Interaktionsflächen von Homo- und Heteromeren

Liganden der TNFSF zeichnen sich durch ihre Trimerbildung durch die THD aus. Bei der Trimerisierung eines Homotrimerers entsteht dreimal dieselbe Interaktionsfläche für jeweils eine CRD des Rezeptors. Bei der Bildung von Heterotrimeren entstehen aufgrund der Asymmetrie drei unterschiedliche Interaktionsflächen. Neben der originalen homomeren Interaktionsflächen besitzt sowohl das Heterotrimer A₂B₁, als auch das Heterotrimer A₁B₂ die Interaktionsflächen A-B und B-A und somit nur eine bekannte Interaktionsfläche für das Rezeptormolekül.

Eine solche Bildung von Heterotrimeren wurde bereits in den 1990er Jahren mit den Liganden Lymphotoxin α und Lymphotoxin β gefunden. LT α bindet an den TNFR1 und TNFR2 während LT β hingegen instabil und funktionell inaktiv ist ⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾. Durch die Bildung der Heterotrimeren LT $\alpha_2\beta$ und LT $\alpha\beta_2$ kann LT α auch als membranständiger, heterotrimerer Ligand wirken ^(23,66,69,71). Der unterschiedliche strukturelle Aufbau der Heteromere zeigte sich bereits bei den ersten Untersuchungen. Während eine Bindung von LT $\alpha_2\beta$ an den TNFR1 nachgewiesen wurde, zeigte LT $\alpha\beta_2$ keinerlei Interaktion mit TNFR1 oder dem zweiten Interaktionspartner von LT α , dem TNFR2. Jedoch wurde mit dem LT β R ein eigenständiger Rezeptor für das Heterotrimer LT $\alpha\beta_2$ entdeckt. Da für lange Zeit LT $\alpha\beta_2$ als einziger Ligand für den LT β R galt, wurde diese Rezeptor-Ligand-Paarung ausführlich erforscht. Für LT $\alpha_2\beta$ war dies jedoch nicht der Fall. In den 90er Jahren waren mit LT α und TNF bereits zwei Liganden für den TNFR1 (und den TNFR2) bekannt, wodurch die Charakterisierung von LT $\alpha_2\beta$ nicht weitergeführt wurde. Für dieses Heterotrimer ist bisher bekannt, dass es an den

TNFR1 und den LT β R bindet ⁽³⁹⁾. Jedoch wurde nicht untersucht, ob LT $\alpha_2\beta$ auch eine aktivierende Wirkung besitzt.

Mittlerweile wurden weitere stabile Heterotrimere gefunden. So wurde nachgewiesen, dass Baff mit APRIL oder dem „TNF-related weak inducer of apoptosis“ (=TWEAK) Trimere bilden kann. So zeigten Roschke und Kollegen 2002, dass Baff mit APRIL funktionell aktive Heterotrimere bilden kann. Diese konnten unter anderem in Seren von Patienten mit systemischen immun-basierten rheumatischen Erkrankungen wie SLE, RA, Reiter's Syndrom detektiert werden ^(72,73). Bei diesen Heterotrimeren zeigte sich, dass das BAA-Heterotrimer (ein Baff- und zwei APRIL-Protomere) an BCMA und TACI, jedoch nicht an den BaffR bindet. Für das ABB-Heterotrimer (ein April- und zwei Baff-Protomere) konnte eine Bindung an BCMA, TACI und eine schwache Bindung an BaffR nachgewiesen werden ⁽³⁹⁾.

Für die Bildung von Baff/TWEAK-Heterotrimeren reichte bereits eine Mutation (=mut) im Genom aus. Die Veränderung der Aminosäure an der Stelle 145 von Arginin zu Cystein. Diese Aminosäure ist im konservierten Teil der THD lokalisiert, welche für die Trimerisierung und die Rezeptorbindung notwendig ist. Durch die Veränderung der Aminosäure zu Cystein kann TWEAK(mut) eine zusätzliche Disulfidbrücke zu ähnlichen THD formen. Im Falle von Baff führt dies zu einer Verminderung der Baff-induzierten p100 Prozessierung ⁽⁷⁴⁾.

3.7. Das Homotrimer LT α , das Heterotrimer LT $\alpha\beta_2$ und die Interaktion mit ihren Rezeptoren

In den 90er Jahren wurden die Interaktionen von LT α mit TNFR1 und TNFR2 nachgewiesen. Aufgrund der unter anderem essentiellen Rolle von TNFR1 und TNFR2 bei der Zellproliferation, der Regeneration oder der Inflammation ^(1,20,75,76), wurden die Interaktionen nicht nur von TNF sondern auch von LT α mit diesen Rezeptoren ausführlich untersucht. Ein Meilenstein der Erforschung der Interaktion von Rezeptoren und Liganden der TNFSF war die erste Kristallstrukturanalyse eines solchen Proteinkomplexes in Form von der Bindung zwischen LT α und TNFR1 ⁽³⁴⁾. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse über die Quartärstruktur aus LT α und TNFR1 stellten die Grundlage für den symmetrischen Aufbau des Liganden/Rezeptor-Komplexes, bei dem drei Rezeptormoleküle an ein Ligandentramer binden und im Falle von TNFR1 ihn auch aktivieren kann. LT $\alpha\beta_2$ besitzt aufgrund des heterotrimeren,

asymmetrischen Aufbaus keine drei gleichen Interaktionsflächen. 2013 zeigten Sudhamus und Kollegen, dass $LT\alpha\beta_2$ an seinen Rezeptor $LT\beta R$ über zwei Interaktionsflächen gebunden ist und die Bindung von zwei $LT\beta R$ -Protomeren für eine Aktivierung des NF κ B-Signalweges ausreicht. Bei diesen zwei aktiven Interaktionsflächen handelt es sich zum Einen um die homomere bb' -Interaktionsfläche und zum Anderen um die heteromere ab -Interaktionsstelle. Trotz unterschiedlicher Bindungsaffinität an die unterschiedlichen Interaktionsflächen müssen beide Bindungsflächen belegt sein, um eine Aktivierung starten zu können ⁽⁴⁰⁾.

3.8. NF κ B-System

Transkriptionsfaktoren der NF κ B-Familie sind für die Regulation von Genen zuständig, die mit physiologischen und pathologischen Prozessen assoziiert sind. Die NF κ B-Familie besteht aus den fünf Mitgliedern p50, p52, p65 (RelA), RelB und c-Rel ⁽⁷⁷⁻⁷⁹⁾, welche in Form von Homo- und Heterodimeren im Zytosol vorliegen. Um eine stetige Aktivierung zu verhindern bzw. eine Regulation der Genexpression zu ermöglichen, interagieren die NF κ B Transkriptionsfaktoren mit diversen inhibitorischen κ B (=I κ B) Proteinen (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ) oder liegen in Form von den Vorläuferproteinen p100 oder p105 vor. Erst durch Degradierung der I κ B-Proteine oder durch proteasomale Prozessierung von p100 zu p52 oder p105 zu p50 wird der Transport der Transkriptionsfaktoren aus dem Zytosol in den Nukleus ermöglicht. Durch die Bindung der nun aktiven Dimere wird unter anderem die Expression von Interleukinen wie Interleukin-8 (=IL8), Interleukin-2 (=IL2) oder auch TNF aktiviert ⁽⁸⁰⁾.

Die Aktivierung der NF κ B Transkriptionsfaktoren kann über mehr als 150 unterschiedliche Stimuli wie unter anderem „pathogen-associated molecular patterns“ (=PAMP) oder Rezeptoren der TNFRSF erfolgen, wobei diese durch die variable Expressionen von Rezeptoren zellabhängig ist ⁽⁸⁰⁻⁸²⁾. Die Regulation der Transkriptionsfaktoren der NF κ B-Familie wird durch zwei Signalwege ermöglicht: den klassischen NF κ B-Signalweg und den alternativen Signalweg. Beim klassischen Signalweg kommt es zur Phosphorylierung von I κ B α durch einen I κ B kinasen (IKK)-Komplex, was die Degradation von I κ B α zur Folge hat. Durch den Abbau von I κ B α wird die Kernlokalisationssequenz der dimeren Transkriptionsfaktoren nicht mehr maskiert, wodurch diese in den Nukleus transportiert werden ^(65,83). Im Gegensatz zum klassischen Signalweg wird die Regulation von NF κ B Transkriptionsfaktoren im

alternativen Signalweg nicht durch die I κ B α Degradation, sondern über die proteasomale Prozessierung von p100 erreicht. Hierbei kommt es durch TRAF2/TRAF3-Degradation/Depletion zur Akkumulation der „NF- κ B-inducing kinase“ (=NIK) und der daraus folgenden Aktivierung von IKK α . Durch diese Aktivierung folgt die IKK α -vermittelte Phosphorylierung von p100 was die Ubiquitinierung und Prozessierung von p100 zu p52 oder von p105 zu p50 und die Translokalisierung in den Nukleus zur Folge hat (Abbildung 3.9) ^(65,83).

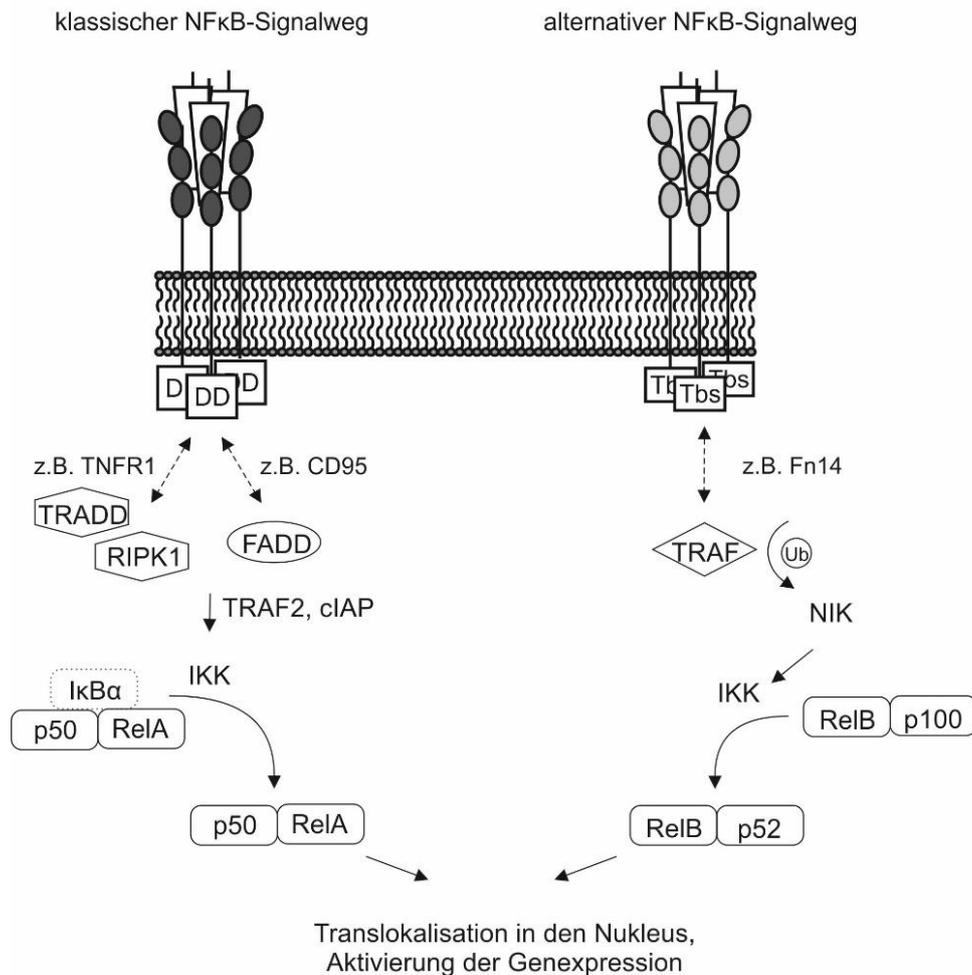


Abbildung 3.9: NF κ B -System

Links dargestellt ist der klassische NF κ B Signalweg. Rezeptorabhängig kann dieser durch diverse intrazelluläre Adapterproteine aktiviert werden. Durch Interaktion mit Proteinen wie u.a. TRAF2 und cIAP2 wird der IKK-Komplex rekrutiert. Dieser führt durch Phosphorylierung zur Degradation von I κ B α , wodurch die Heterodimere in den Nukleus translozieren und dort die Genexpression aktivieren können. Auf der rechten Seite ist der alternative NF κ B-Signalweg aufgeführt. Durch die Ubiquitinierung von TRAF-Molekülen kommt es zur Akkumulation von NIK und der Formierung des IKK-Komplexes. Dies hat die Prozessierung von p100 zu p52 zur Folge und das Dimer kann durch ihre Kernlokalisationssequenz in den Nukleus transportiert werden und dort die Genexpression aktivieren.

3.9. Zielsetzung

Seit ihrer Entdeckung in den 90er Jahren wurden TNF, $LT\alpha$ und $LT\alpha_2\beta$ ausführlich hinsichtlich der Interaktion und der Aktivierung ihrer jeweiligen Rezeptoren TNFR1, TNFR2 und $LT\beta R$ untersucht. Mit der Erkenntnis, dass $LT\alpha$ mit $LT\beta$ die Heterotrimere $LT\alpha_2\beta$ und $LT\alpha\beta_2$ formen kann, wurde auch die Bindung von $LT\alpha_2\beta$ an den TNFR1 herausgefunden. Trotz diesen ersten Erkenntnissen über die Heterotrimere wurden keine Versuche unternommen $LT\alpha_2\beta$ weiter zu charakterisieren. Aus diesem Grund war es zum Einen Ziel dieser Arbeit $LT\alpha_2\beta$ hinsichtlich der Bindung der zwei anderen mit $LT\alpha$ (und $LT\alpha/\beta$) assoziierten Rezeptoren TNFR2 und $LT\beta R$ zu untersuchen. Zum Anderen lag der Fokus auf der Untersuchung der möglichen Aktivierung von TNFR1 und TNFR2 durch $LT\alpha_2\beta$.

4. Material

4.1. Zelllinien

Die Zelllinien HEK293T, HeLa, HeLa-TNFR2, HeLa-TNFR2-TNFR1_{„Knock Out“} (=KO), HeLa-RIP3-FADD_{KO}, Kym-1, „Chinese Hamster Ovary“ (=CHO), CHO-memTNFΔ1-12, Panc02 waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden.

Die Zelllinie HEK293-Flp-In-Wildtyp (=WT) wurde von der AG Hermanns (Universitätsklinik Würzburg) bereitgestellt. Die stabilen Transfektanten (HEK-Flp-In-Leervektor („empty vector“ =EV), HEK-Flp-In-mem(sc)LTα₂β, HEK-Flp-In-mem(sc)LTαβ₂) dieser Zelllinie wurden mittels FRT/Flp-In-System während dieser Arbeit generiert.

4.2. Fusionsproteine

Fusionsproteine waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden oder wurden während dieser Arbeit generiert. Aminosäuresequenzen der einzelnen Konstrukte sind im Anhang Tabelle 9 zusammengefasst.

4.2.1. Verwendete Fusionsproteine - Liganden der TNFSF

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Liganden mit der Konstruktbezeichnung und Lokalisation/ Detektion

| Ligand | Konstrukt | Lokalisation/Detektion |
|--------------------|----------------------------------|--|
| TNF | TNFΔ1-12-Flag-YFP-pIRESpuro3 | Membranständig, Flag Tag |
| LTβ | LTβ-Flag-GpL-pCR3 | Löslich, Flag-Tag, <i>Gaussia princeps</i> Luziferase (=GpL) |
| | LTβ(full)-pCMV6-XL4 | Membranständig |
| LTα | LTα(sc)-Flag-GpL-pCR3 | Löslich, Flag-Tag, GpL |
| | LTα-F | Löslich, Flag-Tag |
| LTα ₂ β | LTα-LTβ-LTα-Flag-pCR3 | Löslich, Flag-Tag |
| | LTα ₂ β-GpL-Flag-pCR3 | Löslich, Flag-Tag, GpL |
| | LTβ(mem)-LTα-LTα-pcDNA5/FRT | Membranständig |

| | | |
|----------------------------------|--|------------------------|
| LT α β ₂ | LT α β ₂ -GpL-Flag-pCR3 | Löslich, Flag-Tag, GpL |
| | LT β (mem)-LT α -LT β - pcDNA5/FRT | Membranständig |

4.2.2. Verwendete Fusionsproteine - Rezeptoren der TNFRSF

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Rezeptoren mit der Konstruktbezeichnung und Lokalisation/ Detektion

| Rezeptor | Konstrukt | Lokalisation/ Detektion |
|--------------|--------------------------------|-------------------------|
| TNFR1 | TNFR1(h)-GPI-pCR3 | Membranständig |
| | TNFR1ed-Flag-GpL | Löslich, Flag-Tag, GpL |
| TNFR2 | TNFR2-pEGFP-N1 | Membranständig |
| | TNFR2ed(h)-Flag-GpL-pCR3 | Löslich, Flag-Tag, GpL |
| LT β R | LT β R(h)-GPI-pCR3 | Membranständig |
| | LT β Red-2xFlag-GpL-pCR3 | Löslich, Flag-Tag, GpL |

4.2.3. Verwendete Fusionsproteine - Antikörper

Tabelle 3: Auflistung der verwendete Antikörper mit den Konstruktbezeichnungen der schweren und leichten Kette

| Antikörper | Konstrukt Schwere Kette („heavy chain“ = HC) | Konstrukt Leichte Kette („light chain“ = LC) |
|------------------|--|--|
| TNFR1-Fab | Anti-TNFR1(H398)-Flag-VH- FAB1(1-108)-pCR3 | Anti-TNFR1(H398)-F-VL-light- pCR3 |
| TNFR2 | Anti-TNFR2(C4)-HC-hlgG1- pCR3 | Anti-TNFR2(C4)-Flag-LC-light- pCR3 |
| LT β R-Fab | Anti-LT β R(BHA-10)-Flag-VH- heavy-FAB1(1-108)-pCR3 | Anti-LT β R(BHA-10)-F-VL-light- pCR3 |

4.3. Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Laborgeräten mit Herstellerangabe

| Allgemein | |
|---|--|
| 0,5-10 µl Transferpipette S | Brand, Wertheim |
| 2-20 µl Pipette Transferpipette S | Brand, Wertheim |
| 20-200 µl Pipette Transferpipette S | Brand, Wertheim |
| 100-1000 µl Pipette Transferpipette S | Brand, Wertheim |
| 20-200 µl Multikanal Transferpipette S | Brand, Wertheim |
| 50-1000 µl Multikanalpipette Finnpipette™ | Thermo Fisher Scientific, Waltham, (USA) |
| Autoklavierbeutel | Hartenstein, Würzburg |
| BD FACSCalibur | BD Bioscience, San Jose (USA) |
| BD FACSCelesta | BD Bioscience, San Jose (USA) |
| Eismaschine AF 124 | Scotsman, Mailand, (I) |
| Durchflusszytometrie (=FACS) Rörhchen | Sarstedt, Nümbrecht |
| Dialyseschlauch „Viking“, MWCO 15kDa | Carl Roth, Karlsruhe |
| Gefrierschrank -80°C „Forma 900 series“ | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |
| Glaspipette | Brand, Wertheim |
| Intas Gel iX20 Imager | INTAS, Göttingen |
| Kühlschrank/Gefrierschrank | Liebherr, Kirchdorf an der Iller |
| Multikanal Spitzen | Sarstedt, Nümbrecht |
| LUmo Luminometer | Anthos Labtec, Siezenheim (AUT) |
| PHOmo | Anthos Labtec, Siezenheim (AUT) |
| Pasteurpipette | Brand, Wertheim |
| Pipettenspitzen 20 µl | Sarstedt, Nümbrecht |
| Pipettenspitzen 200 µl | Sarstedt, Nümbrecht |
| Pipettenspitzen 1000 µl | Sarstedt, Nümbrecht |
| Pipettus | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt |
| Schutzbrille | neoLab, Heidelberg |
| Vortex 7-2020 | neoLab, Heidelberg |
| Zellschaber 25 cm | Sarstedt, Nümbrecht |

| | |
|---|--|
| Zentrifuge Eppendorf 5424 | Eppendorf, Hamburg |
| Zellkultur | |
| Cryo.S, 1 ml | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| EVOS fl Digital Inverted Mikroskop | AMG, Bothell (USA) |
| Inkubator | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |
| KNF Mini-Vakuumpumpe und -kompressor | neoLab, Heidelberg |
| Mikroskop Evos XL | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |
| Neubauer Zählkammer | Hartenstein, Würzburg |
| Sicherheitswerkbank SterilGARDTM Class II Type A2 | Baker Company, Sanford (USA) |
| Zellkultur Microplatte, 96 Well, PS, F-Boden (Kaminform) Transp., CELLSTAR® | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Zellkultur Microplatte, 96 Well, PS, F-Boden (Kaminform) Transp., MICROLON®, high binding | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Zellkultur Microplatte, 96 Well, PS, F-Boden (Kaminform), Schwarz, Fluotrac, Med. Binding | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Zellkultur Microplatte, 96 Well, PS, U-Boden Transp., CELLSTAR® | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Zellkultur Multiwellplatte, 6 Well, PS, Transp., CELLSTAR® | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Zellkultur Schale, PS, 100/20 mm, Nocken, CELLSTAR® | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Zellkultur Schale, PS, 145/20 mm, Nocken, CELLSTAR® | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Zellkulturflasche groß 550 ml, 175 cm ² | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Zellkulturflasche mittel 250 ml, 75 cm ² | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |

| Klonierung | |
|---|--|
| Biometra Personal Thermocycler | Analytik, Jena |
| Consort Electrophoresis Netzgerät E835 | Sigma Aldrich, Darmstadt |
| Digitaler Blockheizer 91-D1100 | Peqlab, Erlangen |
| Eluator™ Vacuum Elution Device | Promega, Fitchburg (USA) |
| Festwinkelrotor JA-14 | Beckman Coulter, Krefeld |
| Festwinkelrotor JA-25.50 | Beckman Coulter, Krefeld |
| GeneQuant™ pro RNA/DNA Calculator | GE Healthcare Life Science, Freiburg |
| Mikro-Küvette 108.002-QS | Hellma, Müllheim |
| Orbital Inkubator SI500 | Stuart Equipment, Staffordshire (UK) |
| PerfectBlue Horizontale Minigelsystem Model 40-0911 | Peqlab, Erlangen |
| UV-Kontaktlampe Chroma 43 | Vetter GmbH, Wiesloch |
| Vacuum manifold, Patent D 342955 | Promega, Fitchburg (USA) |
| WOB-L Press/Vac Dry Pump 2 2522Z-02 | Welch, Ilmenau |
| Zentrifuge J2-HS | Beckman Coulter, Krefeld |
| Western Blot | |
| Blotkammer große Gele | PeqLab, Erlangen |
| Blotkammer kleine Gele | PeqLab, Erlangen |
| Dri-Block DB3 | Techne, Staffordshire (GB) |
| Gießstation kleine Gele | Biorad, München |
| Hyperfilm ECL | GE Healthcare, Garching |
| Laufkammer große Gele 2 | PeqLab, Erlangen |
| LI-COR Odyssey | LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln (USA) |
| Mini Protean Tetra Cell | BioRad, München |

| | |
|--|---|
| Nitrozellulosemembran | Whatman, Dassel |
| pH-Meter | HANNA instruments, Kehl am Rhein |
| Power Supply EPS 301 | GE Healthcare, Garching |
| Röntgenbildentwicklermaschine | Agfa, Düsseldorf |
| Sonifizierer UP100H | Hielscher, Wanaque (USA) |
| Whatmanpapier | Hartenstein, Würzburg |
| Wippschüttler | Hartenstein, Würzburg |
| HPLC | |
| MABPac™ SEC-1 | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |
| Ultimate 3000 | Dionex, Sunnyvale (USA) |
| Ultimate 3000 automated fraction collector | Dionex, Sunnyvale (USA) |

4.4. Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen mit deren Rezeptur

| Puffer/ Lösungen | Rezeptur |
|--|---|
| „Lysogeny broth“ (=LB)-Agar | 10 g/l NaCl 10 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt 15 g/l Agar-Agar |
| „Phosphate Buffered Saline-Tween“ (=PBS-T) | PBS + 0,05 % (v/v) Tween-20 |
| 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (=ABTS)-Lösung | 16,25 g/l ABTS-Puffer 1 g/l ABTS-Substrat |
| Assay Diluent | „Phosphate Buffered Saline“ (=PBS) 10 % (v/v) <i>Fetal Calf Serum</i> (=FCS) |
| Blotpuffer | 0,025 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (=Tris) 0,0192 M Glycin 20 % (v/v) Methanol |
| ECL Lösung 1 | 0,1 M Tris-HCl (pH 8,6) 0,25 mg/ml Luminol |

| | |
|--------------------------------|--|
| ECL Lösung 2 | Dimethylsulfoxid (=DMSO) 1,1 mg/ml para-Hydro-Xycoumaric-Acid |
| ECL-Lösung 3 | Wasserstoffperoxid 30 % |
| Einfriermedium | FCS 10 % (v/v) DMSO |
| IL8 ELISA Coating Buffer | 0,1 M Carbonat pH 9,5 |
| Kristallviolettlösung | 1 % Ethanol 0,25 % Kristallviolett |
| Lämmli Puffer (4x) | 0,25 M Tris 8 % (w/v) <i>Sodium dodecyl sulfate</i> (=SDS) 40 % (v/v) Glycerol 20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol 0,004 % (w/v) Bromphenolblau |
| Laufpuffer | 0,05 M Tris 0,38 M Glycin 0,004 M SDS pH 8.3 |
| LB-Medium | 50 g/l NaCl 50 g/l Pepton 25 g/l Hefeextrakt |
| MCP-1(mu) ELISA Coating Buffer | 0,2 M Natriumphosphat, pH 6.5 12,49 g/l Na ₂ HPO ₄ 15,47 g/l NaH ₂ PO ₄ |
| Milch (0,05)/TBS-T | „Tris Buffered Saline“ (=TBS) 0,05 % (v/v) Tween-20 (=T) 5 % (w/v) Magermilch |
| PBS | 0,02 M Natriumphosphat 0,7 % (w/v) NaCl pH 7,2 |
| S1-Puffer | 50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A |

| | |
|--|---|
| | pH 8,0 |
| S2-Puffer | 200 mM NaOH 1 % SDS |
| S3-Puffer | 2,8 M Kaliumacetat pH 5,1 |
| Sammelgelpuffer | 0,5 M Tris 0,015 M SDS pH 6,8 |
| TBS | 0,02 M Tris 0,8 % (w/v) NaCl pH 7,6 |
| TBS-T | TBS + 0,05 % (v/v) Tween-20 |
| Toxizitätsmix | 5 µg/ml CHX 1 µg/ml Puromycin 200 ng/ml TNF 200 ng/ml Flag-Fc-CD95L 200 ng/ml Flag-TWEAK 0,01 % Natrium Azid |
| Trenngelpuffer | 1,5 M Tris 0,015 M SDS pH 8,8 |
| Tris-EDTA-Elektrophoresepuffer (=TAE) | 4,84 g/l Tris 1,142 ml/l Essigsäure 2 ml/l 0,5M EDTA (pH 8.0) |

4.5. „Fluorescence-activated cell sorting“ (=FACS)-/ Western Blot (=WB)- Antikörper

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Antikörper mit Angaben zum Wirt, Hersteller, Artikelnummer und Anwendung

| Antigen | Wirt | Hersteller | Artikelnr. | Anwendung |
|-----------|-----------|-------------------------------|-------------------|-----------|
| Caspase-8 | Maus | Enzo Life Sciences Germany | ADI-AAM- 118-E | WB |
| Caspase-9 | Kaninchen | Cell Signaling MA (USA) | 9502S | WB |

| | | | | |
|--|-----------|---|-----------------|------|
| Flag-M2 | Maus | Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) | F3165 | WB |
| Hamster IgG- Phycoerythrin (=PE) | Maus | Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA) | Sc-3754 | FACS |
| Human IgG1- Allophycocyanin (=APC) | Human | Miltenyi Biotec, Auburn (USA) | 130-113- 446 | FACS |
| Kaninchen-HRP | Ziege | Cell Signaling Cambridge (GB) | #7074 | WB |
| LT β R | Maus | R&D Systems, Minneapolis (USA) | MAB6291 | WB |
| LT β R(mu)-APC | Human | Miltenyi Biotec, Auburn (USA) | 130-106- 637 | FACS |
| LT β R-PE | Maus | R&D Systems, Minneapolis (USA) | FAB629P | FACS |
| Maus IgG, PE- labeled | Ziege | Sigma-Aldrich, Deutschland | P9670 | FACS |
| Maus IRDye 800 | Ziege | LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln (USA) | 926-32210 | WB |
| Maus-Horseradish peroxidase (HRP) | Kaninchen | Dako Glostrup (DK) | P0260 | WB |
| Maus-HRP | Pferd | Cell Signaling Cambridge (GB) | #7076 | WB |
| PARP | Maus | BD Biosciences NJ (USA) | 551025 | WB |
| pRIPK1 | Kaninchen | Cell Signaling MA (USA) | 65746S | WB |
| RIPK1 | Maus | BD Biosciences NJ (USA) | 610459 | WB |

| | | | | |
|-----------------------------|-----------|--|-------------|----------|
| TNF α , PE-labeled | Maus | Thermo Fisher Scientific, MA (USA) | #12-7349-82 | FACS |
| TNF-R1 | Kaninchen | Cell Signaling Cambridge (GB) | # 3736 | WB |
| TNFR1(mu)-PE | Hamster | Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA) | sc-12746 | FACS |
| TNFR1-PE | Maus | R&D Systems, Minneapolis (USA) | FAB225P | FACS |
| TNF-R2 | Kaninchen | Cell Signaling Cambridge (GB) | # 3727 | WB |
| TNFR2(mu)-PE | Hamster | Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA) | sc-12750 | FACS |
| TNFR2-PE | Maus | R&D Systems, Minneapolis (USA) | FAB226P | FACS |
| TNF β (=LT α) | Maus | Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA) | sc-28345 | FACS, WB |
| β -Aktin | Maus | Sigma-Aldrich, Deutschland | A1978 | WB |

4.6. Chemikalien, Reagenzien und anwendungsfertige Kits

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits mit Herstellerangaben

| Chemikalie | Hersteller |
|---|-----------------|
| „Roswell Park Memorial Institute“ (=RPMI) 1640 Medium | PAA, Pasching |
| ABTS | Roche, Mannheim |
| ABTS Puffer | Roche, Mannheim |

| | |
|---|---|
| Agar-Agar | Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumpersulfat (=APS) | AppliChem, Darmstadt |
| Anti-Flag M2 Agarose | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Bromphenolblau | Merck, Darmstadt |
| Coelenterazin | Carl Roth, Karlsruhe |
| CS&T Research Beads | BD Bioscience, San Jose (USA) |
| Cycloheximid (=CHX) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Dimethylsulfoxid (=DMSO) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | AppliChem, Darmstadt |
| Dulbecco`s PBS | PAA, Pasching |
| Entwickler | Agfa, Mortsel |
| Essigsäure | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Etanercept | Geschenk von Prof. Tony (Innere Medizin II, UKW) |
| Ethanol (EtOH) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Carl Roth, Karlsruhe |
| FACS Clean | BD Bioscience, San Jose (USA) |
| FACS Flow | BD Bioscience, San Jose (USA) |
| FACS Rinse | BD Bioscience, San Jose (USA) |
| Fixierer | Agfa, Mortsel |
| Fötales Bovines Serum (FBS) | PAA, Pasching |
| GeneRuler 1 kb DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt |
| Glycerol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Glycin | AppliChem, Darmstadt |
| Hefeextrakt | Carl Roth, Karlsruhe |
| Hygromicin | Merck, Darmstadt |
| Intas Gel iX20 Imager | INTAS, Göttingen |
| Isopropanol | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Kaliumacetat | Carl Roth, Karlsruhe |
| KOD Hot Start DNA Polymerase | Merck, Darmstadt |
| Kristallviolett | Carl Roth, Karlsruhe |
| Luminol | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |

| | |
|--|---|
| Magermilchpulver | AppliChem, Darmstadt |
| Methanol (MetOH) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| N,N,N,N'-Tetramethyldiamin (=TEMED) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Natriumazid (Na-Azid) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid (NaCl) | AppliChem, Darmstadt |
| Natrium-dihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄) | AppliChem, Darmstadt |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Carl Roth, Karlsruhe |
| N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (=zVAD) | Bachem, Heidelberg |
| Necrostatin-1 | Enzo Life Science, Lörrach |
| NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit | Macherey-Nagel |
| OptEIA™ Human Interleukin 8 (=IL8) - ELISA Kit | BD Biosciences, Heidelberg |
| OptEIA™ Mouse „monocyte chemotactic protein-1“ (=MCP-1) ELISA Kit | BD Biosciences, Heidelberg |
| Para-Hydro-Xycoumaricacid | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Penicillin/Streptomycin | PAA, Pasching, Österreich |
| Pepton | Carl Roth, Karlsruhe |
| Pierce™ Silver Stain Kit | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |
| Polyethylenimine (PEI) | Polysciences Europe GmbH, Eppelheim |
| Proteingelmarker (11-250 kDa) | New England Biolabs, Frankfurt |
| PureYield™ Plasmid Midiprep Kit | Promega, Fitchburg (USA) |
| Quick CIP | New England Biolabs, Frankfurt |
| Rapid DNA Ligation Kit | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt |
| Restriktionsenzyme | New England Biolab, Frankfurt |
| RNAse A | Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt |
| Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Salzsäure, rauchend 37 % | Carl Roth, Karlsruhe |
| Sodium dodecyl sulfate (=SDS) | Carl Roth, Karlsruhe |
| TNF (rekombinant, human) | Geschenk von Daniela Männel (Uni Stuttgart) |
| Tris | Carl Roth, Karlsruhe |

| | |
|---------------------------|--|
| Trypsin | PAA, Pasching |
| Tween-20 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Wasserstoffperoxid (30 %) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Zeocin™ | Thermo Fisher Scientific, Waltham,(USA |
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |

4.7. Software

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Computersoftware

| |
|-----------------------------|
| Chromeleon 7 |
| CorelDRAW X4 |
| FACSDiva |
| FlowJow |
| GraphPad PRISM 5 |
| Microsoft Office Excel 2007 |
| Microsoft Office Word 2007 |
| Odyssey V3.0 |
| WinMDI |

5. Methoden

5.1. Klonierung

Generierung der für die Fusionsproteine kodierenden Plasmide wurden mittels gängigen Klonierungsmethoden wie PCR, Restriktionsverdau und Ligation durchgeführt. Durch Transfektion von kompetenten Zellen und einer anschließenden Selektion durch die integrierte Antibiotikaresistenz wurden positive Einzelklone generiert. Anschließend wurden die selektionierten Plasmide in *E.coli* produziert, isoliert und durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Genauer Aufbau der kodierenden Bereiche sind im Anhang 9.1 aufgelistet.

5.2. Zellkultur

Zellen der Zelllinien HEK293T, HeLa, HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}, HeLa-RIP3-FADD_{KO} und Kym-1 wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS unter Standardbedingungen (5 % CO₂ und 37°C) in Zellkulturflaschen kultiviert. Zellen der Zelllinie HEK293-Flp-In-WT, HEK293-Flp-In-EV, HEK293-Flp-In-mem(sc)LT $\alpha\beta$, HEK293-Flp-In-mem(sc)LT $\alpha\beta_2$ und Panc02 wurden in DMEM mit 10 % FCS und Standardbedingungen kultiviert. Zur Passagierung oder der Verwendung für Experimente wurden adhärente Zellen mit Trypsin (2 ml bei 75 cm² und 3 ml bei 175 cm² Flaschen) gelöst und in frischem Medium resuspendiert. Zur Passagierung oder weiteren Kultivierung wurden 10-20 % der Zellen in der Flasche belassen. Für die Verwendung in Experimenten wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und entsprechend der durchgeführten Experimente ausgesät. Zur Kryokonservierung wurden Zellen bei 1200 rpm für 4 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in Einfriermedium (10 % DMSO in FCS) resuspendiert und bei -80°C gelagert.

5.2.1. Transfektion, Produktion und Aufreinigung von Fusionsproteinen

Um die Expression von membranständigen oder löslichen Fusionsproteinen wie Liganden, Rezeptoren oder Antikörpern zu erreichen, wurden HEK293T-Zellen mit dem chemischen Transfektionsreagenz Polyethylenimin (=PEI) und 12µg Plasmid-DNA transfiziert.

Hierfür wurden HEK293T-Zellen auf 200 mm Zellkulturplatten ausgesät und bei Erreichen einer 80-90 % Konfluenz weiterverwendet. Für die Transfektion wurde das Medium auf den Platten durch 15 ml RPMI 1640 Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin (=Pen/Strep) ersetzt. Anschließend wurden 2 ml von RPMI 1640 Medium, 1 % Pen/Strep mit 36 µl einer 1 mg/ml PEI-Lösung und 12 µg von dem kodierenden Plasmid des gewünschten Konstrukts versetzt, durch vortexen gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur (=RT) inkubiert. Die PEI-Plasmid-Lösung wurde anschließend auf die Zellen getropft.

Für Bindungsstudien wurden die Zellen innerhalb der nächsten zwei Tage verwendet. Für die Produktion von löslichen Liganden, Rezeptoren oder Antikörpern wurde das FCS freie Medium nach einem Tag Inkubation durch 17 ml von RPMI 1640 Medium mit 2 % FCS und 1 % Pen/Strep ausgetauscht. Nach einer Inkubationszeit von 5-7 Tagen wurden die Überstände gesammelt und durch Zentrifugieren für 10 min bei 4600 „rounds per minute“ (=rpm) von etwaigen Zellen und Schwebstoffen befreit. Die Konzentration an Proteinen oder Antikörpern konnte via *Gaussia princeps* Luziferase Aktivitätsmessung und/oder Western Blot Analyse bestimmt werden.

Um die eigenen IL8-Signale oder nicht gewollte Proteine aus den Protein-Überständen zu verringern bzw. zu entfernen, wurden die Liganden und Antikörper, welche in ELISA- und HPLC-Versuchen verwendet wurden, mit Hilfe der Anti-Flag-Affinitätschromatographie nach Kucka *et al.* 2021 ⁽⁸⁴⁾ aufgereinigt.

Hierfür wurde anti-Flag-M2-Agarose auf eine Säule beladen und mit TBS gewaschen. Die Agarose wurde anschließend mit einem Verhältnis von ~ 1 mg der zu aufreinigenden Zellkulturüberstände zu 1 ml an Agarose beladen. Durch eine geringe Tropfgeschwindigkeit wurde eine Bindung der Proteine anhand ihrer FLAG-Sequenz an die Agarose ermöglicht. Anschließend wurden diese mit TBS gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Durch Hinzufügen von 100 µg/ml FLAG-Peptid in TBS wurden die Fusionsproteine von der Agarose gelöst und konnten in Fraktionen von 500- 700 µl eluiert werden. Anschließend wurde die Agarose ein weiteres Mal mit TBS gewaschen und bei -20°C in einer Lösung aus 50 % Glycerol in TBS und 0,02 % Natriumazid gelagert. Zur Entfernung des FLAG-Peptids in den Eluaten wurden diese mindestens über Nacht gegen PBS dialysiert und für die Weiterverwendung sterilfiltriert. Die Konzentrationsbestimmung, sowie die Reinheitsüberprüfung erfolgte über Western Blot Analyse und Silbergel-Färbung.

5.2.2. Generierung stabiler Zelllinien

HEK293-Flp-In Zellen wurden in DMEM 10 % FCS und 100 ng/ml Zeocin kultiviert, um die Zellen auf die benötigte Zeocinresistenz (=Zeocin^R) zu selektieren.

Für die Generierung von stabilen Zelllinien wurden Zeocin^R positive HEK293-Flp-In Zellen in 100 mm Zellkulturplatten ausgesät und bei 60-70 % Konfluenz verwendet. Die Zellen wurden mit dem halben Ansatz einer Transfektion wie in Kapitel 5.2.1 und einem Verhältnis der Plasmide von 1:1 (3 µg des gewünschten Konstruktes mit Hygromycinresistenz + 3 µg des Rekombinaseplasmids) transfiziert und über Nacht inkubiert. Für die Generierung von einer Negativkontrolle wurden Zellen nur mit 3 µg des Rekombinaseplasmids transfiziert. Am folgenden Tag wurde ein Teil der transfizierten Zellen auf die Expression des gewünschten Konstrukts via FACS getestet und bei einem positiven Ergebnis mit Hygromycin selektiert. Hierfür wurde DMEM 10 % FCS mit 75 µg/ml Hygromycin versetzt und für einen Zeitraum von 3-4 Wochen alle 2-3 Tage gewechselt. Nach vollständigem Sterben der Negativkontrolle, wurden die Hygromycin^R positiven Zellen auf die Expression und Reinheit der Zelllinie via FACS untersucht und gegebenenfalls durch Generierung von Einzelklonen weiterselektiert.

5.3. Bindungsstudien

5.3.1. Punktbindungsstudien

Für die Ermittlung der Bindung der LTαβ-Heterotrimere an unterschiedliche Rezeptoren wurden die Protomere von LTα und LTβ-GpL ko-exprimiert, sodass die jeweiligen Homo- als auch Heterotrimere als Überstand gebildet wurde. Durch die Konjugation der GpL-Domäne an LTβ konnten nur die Trimere durch die Bindungsstudie untersucht werden, die mindestens ein LTβ-Protomer besaßen.

Um Herauszufinden, an welche Rezeptoren die LTα und LTβ-GpL Homo- als auch Heterotrimere binden, wurden HEK293T-Zellen mittels PEI-Transfektion (s. Kapitel 5.2.1) mit den gewünschten Rezeptoren transfiziert oder Zelllinien verwendet, die bereits die gewünschten Rezeptoren exprimierten.

Für die Bindungsstudien wurden die jeweiligen Zellen geerntet und mit einer Zellzahl von 0,5 – 1,5x10⁶ Zellen/Tube in Eppendorf Tubes überführt. Daraufhin wurden die

Zellen mit blockierenden Antikörpern oder Liganden mit einer Konzentration von 10 µg/ml in Triplikaten für 30 min bei 5 % CO₂ und 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde den Ansätzen eine konstante Menge an LTα + LTβ-GpL -Überstand hinzugegeben um eine Endkonzentration (=Endkonz.) von 20 ng/ml zu erreichen. Darauf folgend wurden die Ansätze für 1 h bei 5 % CO₂ und 37°C inkubiert. Ein Ansatz ohne Hinzugabe des GpL-enthaltenden Überstandes diente zur Bestimmung des Hintergrundsignals der Zellen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen um ungebundene Antikörper, sowie ungebundene Liganden zu entfernen. Hierfür wurden die Zellen bei 14000 rpm für 1-2 min zentrifugiert und in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Auf die Waschschrte folgend wurden die Zellen in 50 µl RPMI 1640 Medium mit 0,5 % FCS und 1 % Pen/Strep aufgenommen und auf eine schwarze 96-Well-Platte transferiert. Zur Bestimmung der *Gaussia princeps* Luziferase Aktivität mittels der enzymatischen Luziferasereaktion wurde jeweils 25 µl einer 1,5 µM Coelenterazin (in PBS)-Lösung zu den Zellen gegeben und die Lumineszenz sofort anhand eines LUMO Luminometers mit einer Verweildauer von 1 s pro Well gemessen.

HEK293T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen von membranständigem LTβ und löslichen LTα kotransfiziert und mit löslichen GpL-konjugierten Ektodomänen von TNFR1, TNFR2 und LTβR getestet. Bei diesem Ansatz von Punktbindungsstudien wurden Zellen mit einer Zellzahl von 0,5 – 1,5x10⁶ Zellen/Tube in jeweils zwei Ansätzen in Triplikaten auf Eppendorf Tubes aufgeteilt. Zu den Zellen von Ansatz eins wurde jeweils ein konstanter Überschuss an rekombinanten humanen TNF (20 µg/ml) hinzugegeben und für 30 min bei 5 % CO₂ und 37°C vorinkubiert. Ansatz zwei wurde hingegen nur Medium hinzugefügt. Anschließend wurden beiden Ansätzen mit einer konstanten Menge an den löslichen GpL-konjugierten Ektodomänen stimuliert (Endkonz. 500 ng/ml) und für 1 h bei 5 % CO₂ und 37°C inkubiert. Daraufhin wurde mit diesen Bindungsstudien wie oben bereits beschrieben weiterverfahren.

Die graphische, als auch statistische Auswertung der Rohdaten wurde mittels Excel, GraphPad PRISM5 und CorelDRAW X4 durchgeführt.

5.3.2. Gleichgewichtsbindungsstudien

Zur Untersuchung durch Gleichgewichtsbindungsstudien wurden HEK293T-Zellen via PEI-Transfektion mit den membranständigen Liganden oder Rezeptor transfiziert (s. Kapitel 5.2.1, Tabelle 1, Tabelle 2) oder stabil exprimierende Zellen verwendet. Für

jede Gleichgewichtsstudie wurden jeweils 10 Eppendorf Tubes mit 1×10^6 Zellen/Tube versetzt, die zum Einen den Rezeptor bzw. Liganden von Interesse exprimierten (totale Bindung) und zum Anderen den Rezeptor bzw. Liganden nicht exprimierten (unspezifische Bindung). Beide Ansätze wurden anschließend mit derselben Titration des GpL-konjugierten Liganden oder GpL-konjugierten löslichen Rezeptors für 1 h bei 5 % CO_2 und 37°C inkubiert. Um ungebundenen Liganden oder Rezeptoren zu entfernen, wurden die Ansätze, wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben, gewaschen und gemessen. Für die Bestimmung der spezifischen Bindung wurden die gemessenen Werte der unspezifischen Bindung von der totalen Bindung subtrahiert.

Die Ermittlung der spezifischen Bindung wurde mit Excel durchgeführt. Anhand der Analyse-Software GraphPad PRISM5 konnte die statistische Auswertung berechnet werden. Für die anschließende graphische Aufarbeitung wurde CorelDRAW X4 verwendet.

5.4. Kokulturassays

5.4.1. IL8- und MCP-1-Expression

Für die Kokulturassays zur Überprüfung der IL8- oder MCP-1(μ)- Expression wurden $2,5 - 5 \times 10^4$ Zellen/Well der HeLa-, HeLa-TNFR2- und HeLa-TNFR2-TNFR1 KO - oder Panc02-Zellen in 96-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurde das verbrauchte Medium mit frischem RPMI 1640 10 % FCS Medium ersetzt und $2,5 - 5 \times 10^4$ Zellen der Zelllinien von Interesse (CHO, CHO-memTNF Δ 1-12, HEK293-Flp-In-EV, HEK293-Flp-In-mem(sc)LT $\alpha_2\beta$, HEK293-Flp-In-mem(sc)LT $\alpha\beta_2$) hinzugegeben. Nach Inkubation bei 5 % CO_2 und 37°C über Nacht wurden die Überstände abgenommen und anhand des „Enzyme-linked immunosorbent assay“ (=ELISA) (Kapitel 5.5) auf die Expression von IL8 getestet.

5.4.2. Zytotoxizität

Zur Untersuchung der Aktivierung von Apoptose oder Nekroptose durch die Zellen von Interesse wurden Kym-1- und HeLa-RIP3-FADD KO - Zellen (2×10^4 Zellen/Well) in 96-Well Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurde das verbrauchte Medium durch frisches RPMI 1640 10 % FCS Medium welches mit zVAD (20 μM), CHX (2,5 $\mu\text{g/ml}$)

oder Necrostatin-1 (=Nec-1) (90 μ M) versetzt wurde, ersetzt. Nach einer Vorinkubation von 30 min bei 5 % CO₂ und 37°C wurden die Zellen von Interesse (CHO, CHO-memTNF Δ 1-12, HEK293-Flp-In-EV, HEK293-Flp-In-mem(sc)LT α ₂ β , HEK293-Flp-In-mem(sc)LT α β ₂) im Verhältnis von 1:1 hinzugegeben und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ kokultiviert. Als Positivkontrolle für das Sterben der Zellen, wurden Zellen der jeweiligen Zelllinie mit einem Toxizitätsmix inkubiert. Nach Inkubation wurde der Überstand mit den abgestorbenen Zellen verworfen und die verbliebenden lebenden adhären Zellen durch 70 μ l/Well Kristallviolettlösung für 20 min angefärbt. Anschließend wurden die Wells mit destilliertem Wasser gewaschen um überschüssige Kristallviolettlösung zu entfernen. Nach Trocknung der Platten wurden diese bei 595nm anhand des PhOMO Photometers gemessen. Auswertung der gewonnenen Daten wurde per Excel sowie der Analyse-Software GraphPad PRISM5 für die statistische Auswertung durchgeführt. Die graphische Aufarbeitung wurde anhand der Software CorelDRAW X4 bewerkstelligt.

5.5. „Enzyme-linked Immunosorbent assay“ (=ELISA)

Zur Detektierung der IL8- oder MCP-1(mu)-Expression von Zellüberständen aus Kokulturassays (Kapitel 5.4) wurden die ELISA-Kits von OptEIA laut Herstellerangaben verwendet. Eine erhöhte IL8- oder MCP-1(mu)-Konzentration zeigte sich anhand eines stärkeren Farbumschlags des ABTS-Substrats der „horseradish peroxidase“ (=Meerrettichperoxidase). Dieser Farbumschlag wurde bei einer Optischen Dichte (OD) von 405nm anhand des PhOMO Photometers gemessen. Auswertungen der Rohdaten und graphische Aufarbeitung wurden anhand von Excel, GraphPad PRISM5 und CorelDRAW X4 durchgeführt.

5.6. Herstellung von Totalzelllysaten

Für die Untersuchung von Totalzelllysaten wurden Kym-1, sowie HeLa-RIP3-FADD_{KO}-Zellen mit 2x10⁶ Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurde das verbrauchte RPMI 1640 10 % FCS Medium erneuert und mit CHO-, CHO-memTNF Δ 1-12-, HEK293-Flp-In-EV-, HEK293-Flp-In-mem(sc)LT α ₂ β -, HEK293-Flp-In-mem(sc)LT α β ₂-Zellen in einem Verhältnis von 1:1 versetzt. Nach 8 h Inkubationszeit und der optischen Detektion eines anfangenden Zellsterbens wurden die Zellen in 2 ml Eppendorf Tubes gesammelt und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das

Zellpellet, abhängig von der Größe, mit 4x Lämmli-Puffer versetzt. Durch Sonifikation und anschließendem „Aufkochens“ für 5 min bei 95°C wurden die Proteine freigesetzt und denaturiert. Anhand von Western Blot Analysen mit spezifischen Antikörpern wurden die Stimulationsansätze auf das Vorhandensein von RIP1, phosphorylierten RIP1, Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (=PARP) oder den „Cysteinylyl aspartat specific proteinase“ (=Caspasen) 8 und 9 untersucht. Die Detektierung von β -Aktin diente hierbei als Ladekontrolle.

5.7. Gelelektrophorese

5.7.1. „Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“ (=SDS-PAGE)

Zur Detektion und Konzentrationsbestimmung von löslichen Antikörpern, Liganden und Rezeptoren wurden Proben der Zellkulturüberstände anhand der SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend durch Western Blot oder Silbergel-Färbung visualisiert.

Hierfür wurden SDS-Polyacrylamid-Gele bestehend aus Trenngel und Sammelgel verwendet. Zunächst wurde das 12 % Acrylamid enthaltene Trenngel gegossen. Durch Schichtung von Isopropanol auf das noch nicht polymerisierte Trenngel wurden etwaige Luftblasen entfernt und eine gerade Trennlinie erreicht. Nach dem Temed-induzierten Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel mit einem Acrylamidanteil von 6 % über das Trenngel geschichtet. Um das Auftragen von Proben zu ermöglichen wurde vor dem Polymerisieren des Sammelgels ein Kamm eingesetzt welcher Probentaschen bildete, die ein Beladen von maximal 20 Proben mit einem jeweiligen Volumen von bis zu 30 μ l ermöglichte. Nach Aushärtung des Sammelgels wurde die Laufapparatur mit Laufpuffer befüllt. Anschließend wurden Proben der Fusionsprotein-enthaltenden Überstände mit 4x Lämmli-Puffer versetzt. Zur Auftrennung der Proteine wurden diese bei 95°C für 5 min denaturiert und bei 14000 rpm für 1 min zentrifugiert und gesammelt. Daraufhin wurden die Taschen des Gels mit den Proben beladen. Für die Konzentrations- und Größenbestimmung wurden zusätzliche Proben mit einer bekannten Konzentration, sowie einem Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der

Proteine erfolgte innerhalb des Sammelgels bei 90 V und im Trenngel bei 120-130V für eine Gesamtdauer von ca. 90 min.

5.7.2. Western-Blot

Für die Detektion der aufgetrennten Proteine, wurden diese nach dem „Sandwich-Prinzip“ in einer Nass-Blotkammer auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Bei diesem Prinzip wurden die Nitrozellulosemembran und die Lagen aus Whatman-Filterpapier in Blotpuffer getränkt. Anschließend wurde das Trenngel mit den aufgetrennten Proteinen (s. Kapitel 5.7.1) auf die nasse Nitrozellulosemembran gelegt und von jeweils zwei Lagen von getränktem Whatman-Papier umschlossen. Das entstandene „Sandwich“ wurde so in die Nass-Blotkammer gespannt, dass die Proteine beim Wandern von der Anode zur Kathode auf die Nitrozellulosemembran gelangen. Dies führt zu der folgenden Reihenfolge: Anode, zwei Lagen Whatman-Filterpapier, Nitrozellulosemembran, Gel, zwei Lagen Whatman-Filterpapier, Kathode. Der Proteintransfer erfolgte innerhalb von 2,5 h bei konstanten 400mA.

Nach erfolgreichem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran, wurde diese für 0,5 – 1 h in 5 % Milch in PBST oder TBST bei Raumtemperatur geschwenkt um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Im Anschluss wurde die Nitrozellulosemembran 3 x 5 min mit PBST oder TBST gewaschen, um überschüssige Milch zu entfernen. Für die Detektion von Proteinen mittels ihrer FLAG-Sequenz, wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper anti-FLAG (M2) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Nitrozellulosemembran wiederum dreimal für 5 min mit PBST oder TBST gewaschen und anschließend für 1 h im Sekundärantikörper für die Detektion via LI-COR bei Raumtemperatur geschwenkt. Durch dreimaliges Waschen mit PBST oder TBST für 5 min, wurden überschüssige Antikörper entfernt und die Proteine mittels LI-COR detektiert. Für die Detektion von Proteinen ohne FLAG-Sequenz oder Totalzelllysaten wurden Primärantikörper spezifisch für die Proteine von Interesse und den dazugehörigen Sekundärantikörper verwendet (Tabelle 6). HRP-gebundene Sekundärantikörper wurden mittels „Enhanced Chemiluminescence“ (=ECL)-Systems (5.7.3) detektiert.

5.7.3. „Enhanced Chemiluminescence“ (=ECL)-Detektion

Für die Detektion via des ECL-Systems wurden die Membranen in der ECL-Entwicklungslösung (bestehend aus 8 ml ECL-Lösung 1, 800 µl ECL-Lösung 2 und 2,4 µl ECL-Lösung 3) für 1 min bei RT inkubiert. Das Signal der gebundenen Meerrettichperoxidase wurde mittels Röntgenfilmen detektiert. Die Belichtungszeit des Röntgenfilmes wurde durch die Signalstärke und -intensität bestimmt. Anschließend wurde die belichteten Filme anhand der Entwicklermaschine entwickelt. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden die entwickelten Filme gescannt und mittels CorelDRAW X4 veranschaulicht.

5.7.4. Silbergel

Zur Überprüfung der Reinheit und Konzentrationsbestimmung von aufgereinigten Proteinen oder Fraktionen der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurden Proben dieser via SDS-PAGE (s. Kapitel 5.7.1) aufgetrennt und im Anschluss anhand des Pierce™ Silver Stain Kit nach Herstellerangaben entwickelt.

5.8. Durchflusszytometrie (“Fluorescence-activated cell sorting” =FACS)

In dieser Arbeit verwendete Zelllinien wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf ihre Expression der für diese Arbeit relevanten TNF-Liganden und -Rezeptoren untersucht. Hierfür wurden jeweils 1×10^5 Zellen mit dem jeweiligen PE-konjugierten Antikörpern und den entsprechenden Isotypkontrollen (Tabelle 6) nach Herstellerangaben für 1 h bei 4°C inkubiert. Durch Zentrifugieren bei 1200 rpm für 4 min und anschließender Resuspension in frischem PBS wurden überschüssige, nicht gebundene Antikörper entfernt. Für die Durchflusszytometrieanalyse wurde die Zellen in 100-200 µl PBS in FACS Röhrchen transferiert.

Für die Detektion und Charakterisierung der in dieser Arbeit generierten stabilen Zelllinien (HEK293-Flp-In-mem(sc)LTα₂β, HEK293-Flp-In-mem(sc)LTαβ₂) wurde ein unkonjugierter Primärantikörper gegen LTα verwendet. Hierfür wurden die Zellen, wie bereits oben beschrieben angefärbt und gewaschen. Für die Detektion mittels Durchflusszytometrie wurden diese Zellen anschließend mit einem isotypspezifischen PE-konjugierten Sekundärantikörper für 1 h bei 4°C nach Herstellerangaben inkubiert. Für die Messung wurden die Zellen wiederum von überschüssigem Antikörper befreit und in 100-200 µl PBS resuspendiert. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers

zu erkennen, wurden Kontrollzellen (HEK293-Flp-In-EV) ohne LT α -Expression verwendet.

FACS-Analysen wurden mittels BD FACSCelesta und BD FACSCalibur durchgeführt und anhand der Software FlowJow oder WinMDI analysiert und durch die Software Corel veranschaulicht.

5.9. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie („high performance liquid chromatography“ =HPLC)

Zur Überprüfung und Auftrennung der s(sc)LTa2b-Trimere wurden Proben des aufgereinigten Fusionsproteins (250 μ l) mit Hilfe von Tengyu Zhang auf eine MAbPac™ SEC-1 Größenausschlusschromatographie-HPLC-Säule geladen, mittels einer Flussrate von 760 μ l/min von PBS pH 7,2 eluiert und in Fraktionen aufgefangen. Anschließend wurden die Ausschläge mit einem Standard bekannter Proteingrößen verglichen um diese als aggregierte- und „reine“ Trimere bestimmen zu können.

Einzelne Fraktionen wurden danach per Silbergefärbung überprüft und die Fraktionen der Aggregate oder der „reinen“ Trimere gepoolt. Zur Veranschaulichung der Reinheit wurden Proben (Aggregate 15 μ l; „reine“ Trimere 250 μ l) dieser Pools ein weiteres Mal auf die HPLC geladen. Als Negativkontrolle und der Überprüfung von Hintergrundausschlägen wurden 250 μ l PBS aufgetragen.

6. Ergebnisse

6.1. Heterotrimere aus löslichem $LT\alpha$ und löslichem $LT\beta$ (s $LT\beta$) interagieren mit TNFR1, TNFR2 und $LT\beta R$

Seit den 90ern ist bekannt, dass $LT\alpha$ an TNFR1 und TNFR2 bindet, während $LT\beta$ nur in Form von $LT\alpha_2\beta$ mit TNFR1 interagiert und $LT\alpha\beta_2$ eine Bindung an $LT\beta R$ vorweist⁽²³⁾. Im Gegensatz zu $LT\alpha$ und $LT\alpha\beta_2$, wurde $LT\alpha_2\beta$ seit diesen initialen Studien nicht mehr untersucht. Um die Eigenschaften von $LT\alpha_2\beta$ und $LT\alpha\beta_2$ zu verifizieren und weiterführend zu charakterisieren, wurden lösliches $LT\alpha$ und mit einer *Gaussia princeps* Luziferase (=GpL)-fusioniertes, lösliches $LT\beta$ (=GpL-s $LT\beta$) in HEK293T-Zellen koexprimiert. Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit Plasmiden transfiziert, welche für diese Liganden kodieren. Durch die Verknüpfung der Liganden an eine FLAG-Sequenz, können bei späteren Untersuchungen, die Konzentration und Expression von $LT\alpha$ und GpL-s $LT\beta$ bestimmt werden. Um eine möglichst gleichmäßige Expression der, für $LT\alpha$ und $LT\beta$ kodierenden, Plasmide zu ermöglichen, wurden die Zellen mit einem Verhältnis von 1:1 der Plasmide transfiziert. Dies sollte die Produktion und Bildung sowohl von $LT\alpha$ -, $LT\alpha_2\beta$ -, $LT\alpha\beta_2$ - und $LT\beta$ -Trimeren (Abbildung 6.1) ermöglichen.

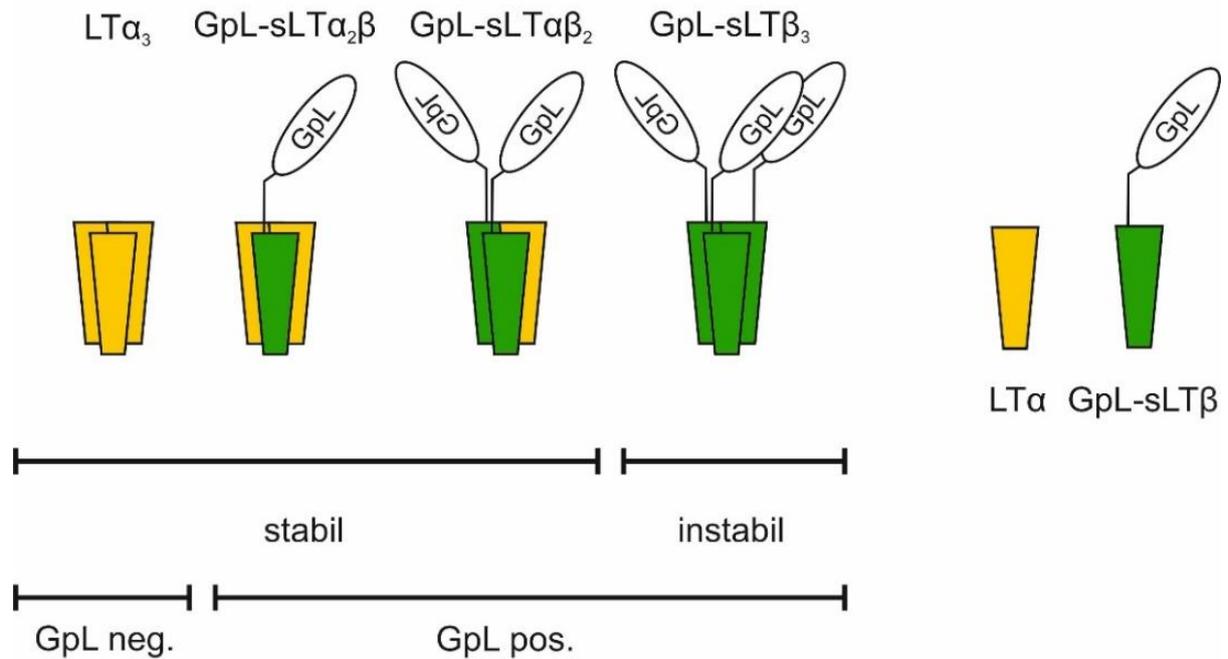


Abbildung 6.1: Schema Homo- und Heterotrimere von Lymphotoxin α und löslichem GpL-Lymphotoxin- β .

Die Protomere von $LT\alpha$ (gelb) und $LT\beta$ (grün) können sich zu Homotrimeren in Form von $LT\alpha_3$ und $LT\beta_3$ zusammenlagern. Desweiteren ist eine Zusammenlagerung in Form von Heterotrimeren mit dem Verhältnis 1:2 und 2:1 von $LT\alpha$ zu $LT\beta$ möglich, wodurch $LT\alpha_2\beta$ - und $LT\alpha\beta_2$ -Heterotrimere entstehen. Browning und Kollegen (1996) zeigten bereits, dass reine $LT\beta_3$ -Homotrimere instabil sind. Durch die Fusionierung an eine GpL-Domäne sind Trimere mit min. einem $LT\beta$ -Protomer anhand der Luziferase sehr sensitiv mittels Lumineszenzmessung detektierbar.

Anhand des FLAG-Tags, mit denen GpL-sLT β und $LT\alpha$ versehen waren, konnte untersucht werden, inwiefern die GpL-sLT β - und $LT\alpha$ -Moleküle von den transient transfizierten Zellen exprimiert wurden. Durch Western Blot Analysen mit einem spezifischen anti-FLAG-Primärantikörpers, wurde sowohl die Expression der einzelnen Protomere ($LT\alpha$ und GpL-sLT β), als auch die Koexpression der beiden Protomere durch Kotransfektion der kodierenden Plasmide detektiert (Abbildung 6.2A). Browning und Kollegen ⁽⁶⁹⁾ zeigten, dass reine sLT β_3 -Trimere hoch instabil sind. Da die Analyse der GpL-sLT β -Transfektion zeigte, dass dieses Molekül effizient gebildet wurde, wurde dennoch verifiziert, ob diese, wie $LT\alpha\beta_2$ ^(85,86) an den LT β R binden können. Hiefür wurden HEK293T-Zellen, mit einem Leervektor oder einem Plasmid transient transfiziert, welches für eine Variante des LT β R kodiert, in welcher die extrazelluläre Domäne des LT β R an einen Glycosylphosphatidylinositol (=GPI)-

Anker fusioniert wurde. Durch den GPI-Anker wurde der Rezeptor stabiler an der Außenseite der Plasmamembran der Zellen verankert. Anschließend wurden diese Zellen auf die Fähigkeit untersucht, GpL-sLT β_3 zu binden. Hierbei zeigte sich, dass GpL-sLT β_3 alleine nicht an den LT β R-GPI band, während eine Bindung von Heterotrimeren mit LT α einfach nachgewiesen werden konnte. Anhand dessen kann davon ausgegangen werden, dass obwohl sLT β alleine durchaus gut exprimiert und sezerniert wird, dieses nicht als Bindungspartner für den LT β R-GPI fungiert. Erst nach Vorhandensein des LT α -Protomers durch die Koexpression, konnte eine Bindung an den LT β R-GPI beobachtet werden (Abbildung 6.2B). Diese Beobachtung korreliert gut mit der Annahme, dass LT β alleine keine funktionsfähigen Homotrimere bildet.

Dadurch, dass das zur Transfektion verwendete LT α -Konstrukt keine GpL-Domäne enthält verfügt auch das daraus resultierende LT α_3 über keine GpL-Domäne. Letzteres kann deshalb in Lumineszenz basierten Bindungsstudien nicht detektiert werden. Da desweiteren GpL-LT β nicht an den LT β R-GPI bindet, muss eine mittels GpL-Aktivität detektierte Bindung von Überstand von LT α /GpL-sLT β transfizierten Zellen auf der Interaktion der Heterotrimeren GpL-sLT $\alpha_2\beta$ - oder GpL-sLT $\alpha\beta_2$ -Moleküle mit dem stark überexprimierten LT β R-GPI zurückzuführen sein.

Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass nur GpL-sLT $\alpha_2\beta$ und GpL-sLT $\alpha\beta_2$ bei einer Koexpression von GpL-sLT β und LT α als mögliche aktive Bindungspartner in Bindungsstudien detektiert werden. Inwieweit diese Heterotrimere auch an die Rezeptoren von LT α , nämlich TNFR1 und TNFR2 zu binden vermag, wurde nun im Weiteren untersucht.

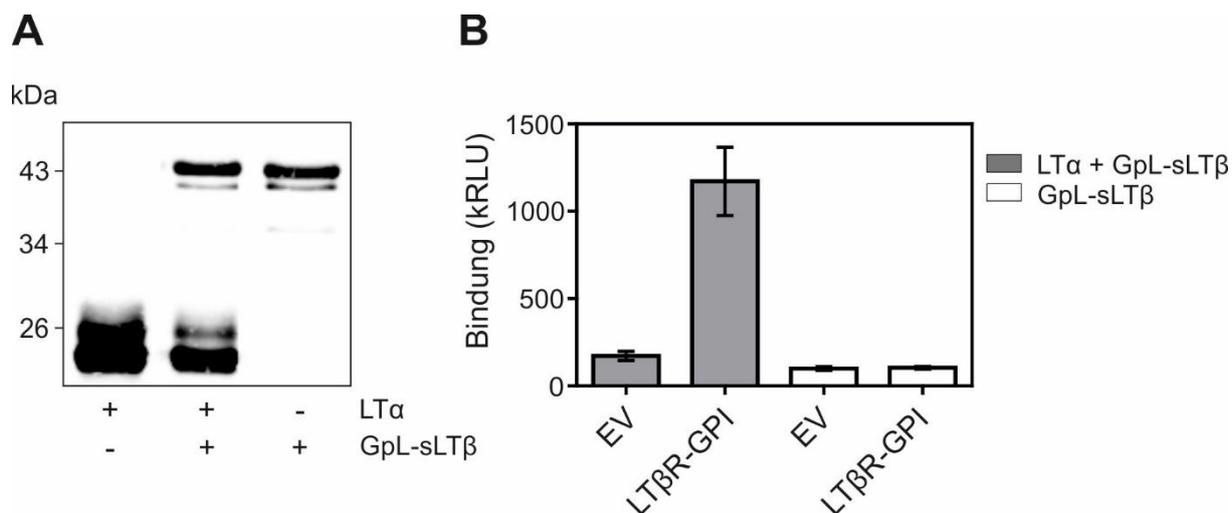


Abbildung 6.2: *sLTβ* wird gebildet, bindet aber nicht an *LTβR*.

(A) HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für *LTα*, *GpL-sLTβ* und *LTα* oder nur für *GpL-sLTβ* transfiziert. Die Zellüberstände wurden nach einer Woche gesammelt und mittels Western Blot Analyse mit dem anti-FLAG-Antikörper M2 untersucht. (B) Die *GpL-sLTβ*-enthaltenen Zellüberstände, wurden mittels Bindungsstudie auf ihre Bindung an den *LTβR* untersucht. HEK293T-Zellen wurden transient mit einem Leervektor („empty vector“ = EV) oder einem Expressionsplasmid für *LTβR-GPI* transfiziert. Diese Zellen wurden am nächsten Tag für 1 h mit Zellüberstand (Flag-Protein-Konz. 1 µg/ml) von *GpL-sLTβ* oder *LTα+GpL-sLTβ* transfizierten Zellen inkubiert. Anschließend wurde die Bindung der Liganden durch Messung der *GpL*-Aktivität gemessen.

Für die Untersuchungen der Bindung der *GpL*-fusionierten heterotrimeren Liganden an TNFR1, TNFR2 und *LTβR* wurden HEK293T-Zellen mit Expressionsplasmiden für diese Rezeptoren transient transfiziert, da diese Zelllinie die Rezeptoren selbst nicht oder nur minimal endogen exprimiert. Des Weiteren wurden HEK293T-Zellen mit einem leeren Vektorplasmid („empty vector“ = EV) transfiziert, um diese residuelle endogene Expression zusammen mit der unspezifischen Bindung der Liganden zu bestimmen. Bindungsstudien mit diesen Rezeptor-transfizierten Zellen mit dem Zellüberstand der Koexpression von *LTα* und *GpL-sLTβ* wiesen eine spezifische Bindung an TNFR1, TNFR2 und *LTβR* auf, zeigten jedoch keine Bindung an den Leervektor. Durch Blockierung von TNFR1, TNFR2 und *LTβR* konnten die spezifischen Bindungen weiterführend untersucht und bestätigt werden. Hierfür wurden lösliches humanes TNF, ein spezifischer Antikörper gegen TNFR2 (anti-TNFR2) sowie Antikörperfragmente in Form von *Fragment antigen binding* (=Fab)-Domänen von IgG-Antikörpern, welche TNFR1 und *LTβR* erkennen (anti-TNFR1-Fab

und anti-LT β R-Fab) verwendet. Hierbei zeigte sich, dass lösliches TNF, sowie anti-TNFR1-Fab, die Bindung der GpL-fusionierten Heterotrimeren an TNFR1-exprimierende Zellen blockiert, während anti-TNFR2 und anti-LT β R-Fab keinerlei Auswirkungen auf diese Bindung hatten. Ähnliches zeigte sich bei der Bindung der heterotrimeren Mischung mit TNFR2-exprimierenden Zellen. Durch lösliches TNF, sowie anti-TNFR2 konnte die Bindung von den Heterotrimeren verhindert werden, während anti-LT β R-Fab und anti-TNFR1-Fab keinen Einfluss auf die Bindung besaßen. Hinsichtlich der Bindung von den GpL-fusionierten Heterotrimeren an LT β R-exprimierenden Zellen, konnte weder lösliches TNF noch die spezifischen Antikörper/Antikörperfragmente für TNFR1 (anti-TNFR1-Fab) und TNFR2 (anti-TNFR2), die Rezeptorbindung inhibieren. Im Gegensatz zu den Bindungenstudien mit TNFR1- und TNFR2-exprimierenden Zellen hatte die Blockade mit anti-LT β R-Fab bei den LT β R-exprimierenden Zellen eine Reduzierung der zellassozierten Luziferaseaktivität zur Folge (Abbildung 6.3).

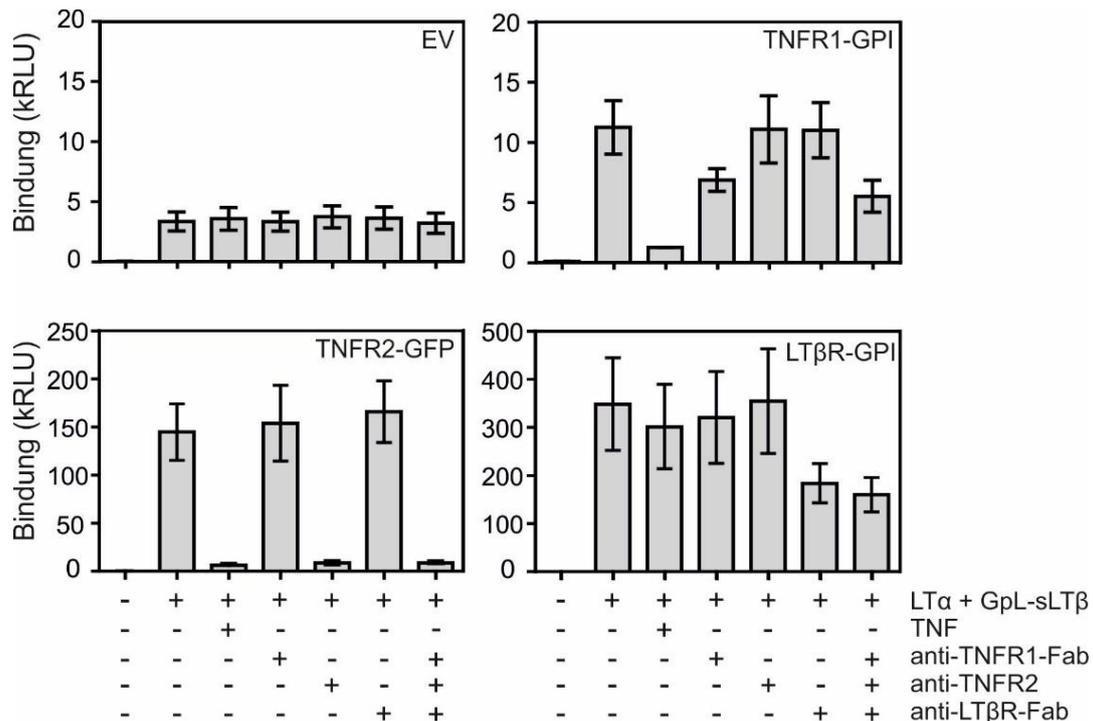


Abbildung 6.3: Bindungsfähigkeit von Überständen $LT\alpha + GpL-sLT\beta$ kotransfizierter Zellen an transient $TNFR1$, $TNFR2$ und $LT\beta R$ transfizierten HEK293T-Zellen.

Um die spezifische Rezeptorbindung von koexprimierten $LT\alpha$ und $GpL-sLT\beta$ zu klären, wurden HEK293T-Zellen mit einem Leervektor oder Expressionsplasmiden, welche für $TNFR1-GPI$, $TNFR2-GFP$ oder $LT\beta R-GPI$ kodieren, transient transfiziert. Diese Zellen wurden mit $10 \mu g/ml$ humanen TNF , oder Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten gegen $TNFR1$, $TNFR2$ oder $LT\beta R$ für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurden diese Ansätze mit dem Überstand ($20 ng/ml$ Flag-Proteine) von $LT\alpha$ und $GpL-sLT\beta$ koexprimierenden Zellen stimuliert und die gebundenen Heterotrimere durch ihre GpL -Aktivität quantifiziert (RLU (= „Relative Light Units“)).

Da für $LT\alpha\beta_2$ nur eine Bindung an $LT\beta R$ und nicht an $TNFR1$ oder $TNFR2$ bekannt ist ⁽²³⁾, kann aus diesen Befunden geschlossen werden, dass sowohl $GpL-sLT\alpha\beta_2$, als auch $GpL-sLT\alpha_2\beta$ in dem Überstand vorhanden waren und dass $GpL-sLT\alpha_2\beta$ an $TNFR1$ und $TNFR2$ bindet. Hierdurch konnten die bekannten Eigenschaften von $sLT\alpha_2\beta$ und $sLT\alpha\beta_2$ hinsichtlich ihrer Bindung an $TNFR1$ und $LT\beta R$ bestätigt werden ⁽²³⁾. Des Weiteren legten die Ergebnisse nahe, dass $sLT\alpha_2\beta$ nicht nur an $TNFR1$, sondern auch an $TNFR2$ binden kann.

Um nun die Interaktion von $sLT\alpha_2\beta$ mit den Rezeptoren $TNFR1$ und $TNFR2$ weiter zu untersuchen und die Limitationen der transienten Transfektion (starke Überexpression, Heterogenität der Expression) ausschließen zu können, wurden Bindungsstudien mit

Zelllinien durchgeführt, welche sowohl TNFR1 und TNFR2 endogen exprimieren. Hierfür wurden Kym-1-, sowie HeLa-TNFR2-Zelllinien ausgewählt. In diesen Zelllinien wird TNFR1 in geringem Maße und TNFR2 in hohem Maße endogen exprimiert. Dies ist ersichtlich durch das Verhältnis von TNFR1- und TNFR2-Rezeptoren der zwei Zelllinien. Während ein Verhältnis von 1:10 bis 1:30 von TNFR1 zu TNFR2 in Kym-1-Zellen vorliegt (⁸⁷), exprimieren die HeLa-TNFR2-Zellen diese Rezeptoren in einem Verhältnis von ~ 1:25 (⁸⁸). Anhand von FACS-Analysen konnte die Expression von TNFR1 und TNFR2 bestätigt werden. Verglichen zu der Isotypkontrolle wiesen hierbei sowohl Kym-1-Zellen, als auch HeLa-TNFR2-Zellen eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität für die Anfärbung der TNFR1- und TNFR2-Rezeptoren auf. Die Analyse bezüglich der LT β R- Expression zeigte nur eine geringe Bindung des Antikörpers gegen den LT β R, was sich in der geringen Fluoreszenz widerspiegelt. Anhand des geringen Unterschiedes zwischen der Isotypkontrolle und dem LT β R-spezifischen Antikörpers kann davon ausgegangen werden, dass dieser Rezeptor nicht oder nur marginal in diesen Zellen exprimiert wird (Abbildung 6.4).

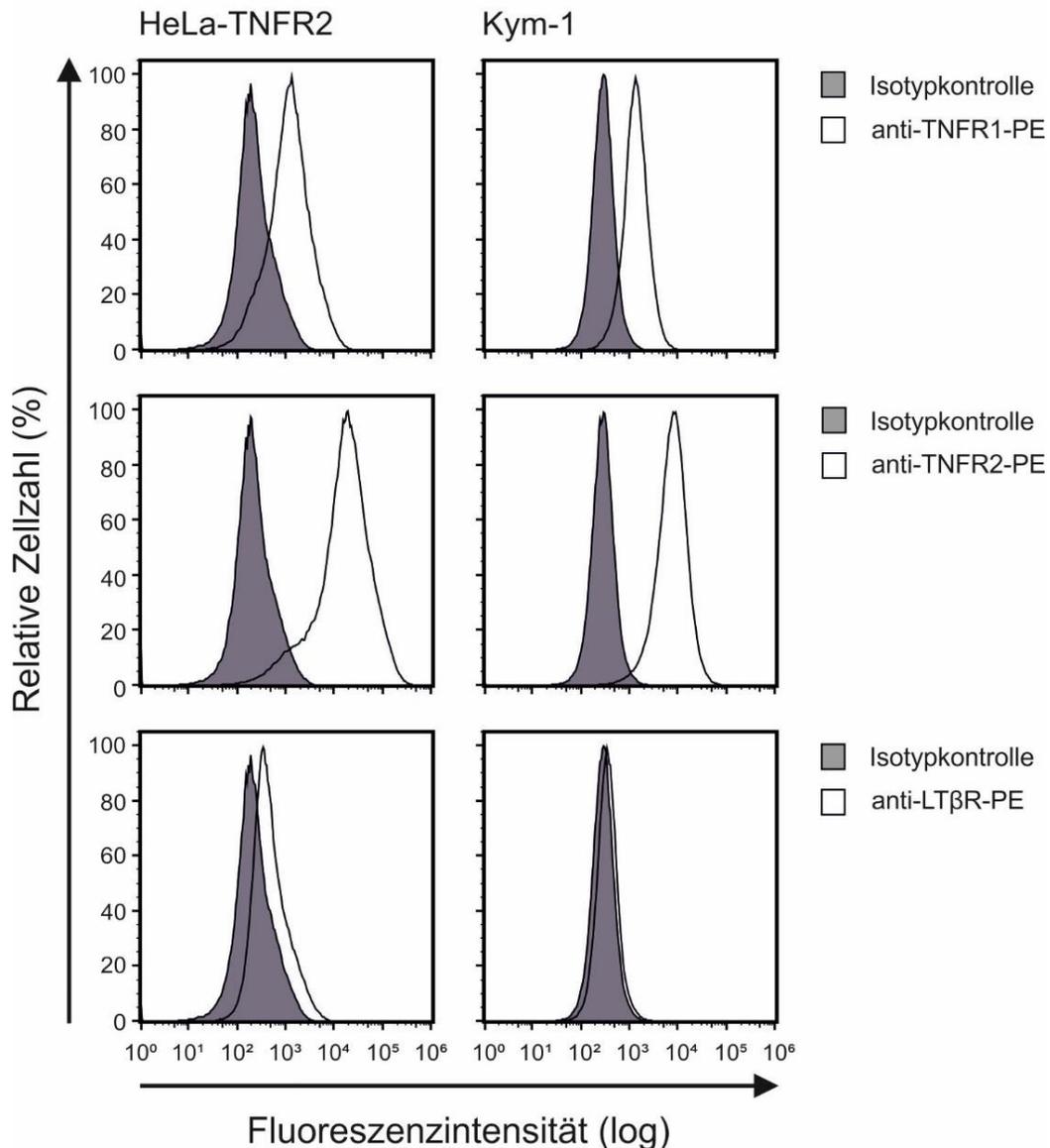


Abbildung 6.4: Expressionsanalyse von TNFR1, TNFR2 und LT β R in HeLa-TNFR2 und Kym-1.

HeLa-TNFR2- und Kym-1-Zellen wurden für 1 h bei 4°C mit den PE-fusionierten Antikörpern gegen TNFR1, TNFR2 und LT β R oder deren Isotypkontrolle inkubiert und anschließend auf die Bindung des Antikörpers und der dementsprechenden Rezeptorexpression mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Bindungsstudien mit diesen Zelllinien zeigten, dass Überstände von heterotrimeren GpL-fusionierten sLT $\alpha_2\beta$ - und sLT $\alpha_2\beta_2$ -Trimeren exprimierenden Zellen sowohl an die HeLa-TNFR2-, als auch an die Kym-1-Zellen stark binden. Während die Blockierung des TNFR2 durch einen TNFR2-spezifischen Antikörper sowohl in HeLa-TNFR2, als auch in Kym-1-Zellen zu einer sichtbaren Reduzierung der Bindung führt, konnte beim

Blockieren des TNFR1 bei beiden Zelllinien nur ein marginaler Unterschied zwischen blockiertem und nicht-blockiertem Bedingungen detektiert werden (Abbildung 6.5). Dies kann auf die niedrige endogene Expression von TNFR1 und TNFR2 zurückgeführt werden. Da TNFR1 und TNFR2 dieselben Liganden teilen kann die höhere Expression von TNFR2 die Bindung bzw. Blockierung des Liganden und dessen Luziferasesignals an TNFR1 überlagern. Bereits die FACS Analysen zeigten, dass der LT β R nur im geringen Maße detektiert werden konnte (Abbildung 6.4). Das Blockieren dieses Rezeptors durch ein LT β R-spezifisches Antikörperfragment führte zu einer Reduzierung des Luziferasesignals in HeLa-TNFR2-Zellen. Für Kym-1-Zellen wurde für die Blockierung des LT β R kein Unterschied zwischen blockiertem und nicht-blockiertem Rezeptor detektiert (Abbildung 6.5).

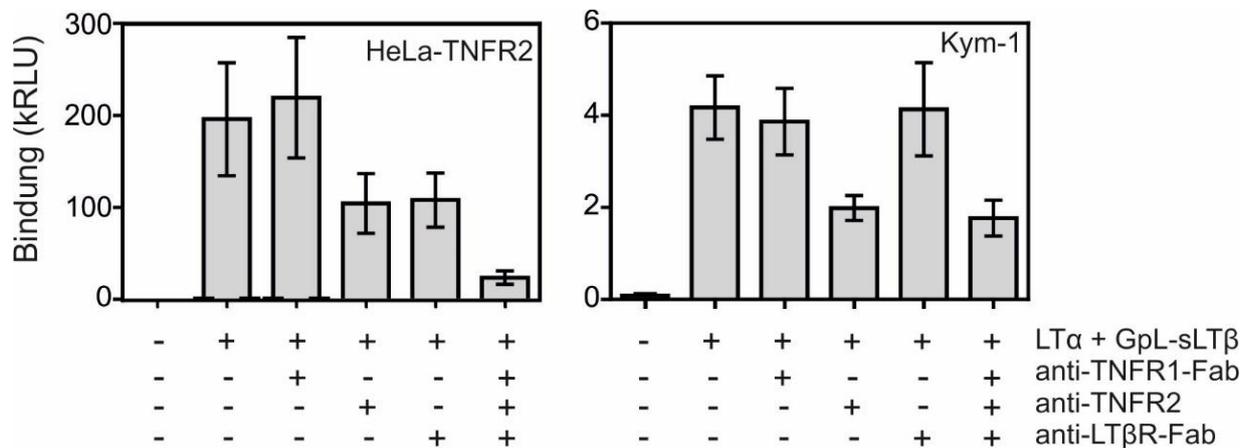


Abbildung 6.5: Bindungsfähigkeit von LT α + GpL-sLT β Heterotrimeren an endogen exprimierte Rezeptoren.

HeLa-TNFR2- und Kym-1-Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern oder Antikörperfragmenten gegen TNFR1, TNFR2 oder LT β R für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurden diese Ansätze mit 10 ng/ml eines LT α und GpL-sLT β Koexpressionsüberstandes für 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ stimuliert. Die gebundenen GpL-sLT β enthaltenen Trimere wurden anschließend über ihre GpL-Aktivität quantifiziert.

6.2. Heterotrimere aus löslichem $LT\alpha$ und membranständigem $LT\beta$ (mem $LT\beta$) interagieren mit TNFR1, TNFR2 und $LT\beta R$ und aktivieren TNFR2

In seiner natürlich vorkommenden Form liegt $LT\beta$ hauptsächlich als membranständiger Ligand vor, während $LT\alpha$ nur als lösliche Form vorkommt ^(23,66,69,71). Bei einer Koexpression dieser beiden Liganden kann es jedoch sowohl zu der Bildung von $LT\alpha_2\beta$ -, als auch von $LT\alpha\beta_2$ -Heterotrimeren kommen. Um nun diese Heterotrimere zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen mit Expressionsplasmiden für membranständiges $LT\beta$ (mem $LT\beta$) und löslichem $LT\alpha$ kotransfiziert, so dass diese Zellen sowohl lösliche $LT\alpha_3$ -Trimere, als auch membranständige $LT\alpha_2\beta$ - und $LT\alpha\beta_2$ -Heterotrimere und membranständige $LT\beta_3$ -Trimere exprimieren konnten. Da bereits gezeigt wurde, dass $LT\beta_3$ -Trimere hoch instabil und inaktiv sind ^(69,71) kann davon ausgegangen werden, dass diese nur in einer inaktiven Form vorliegen (Abbildung 6.6).

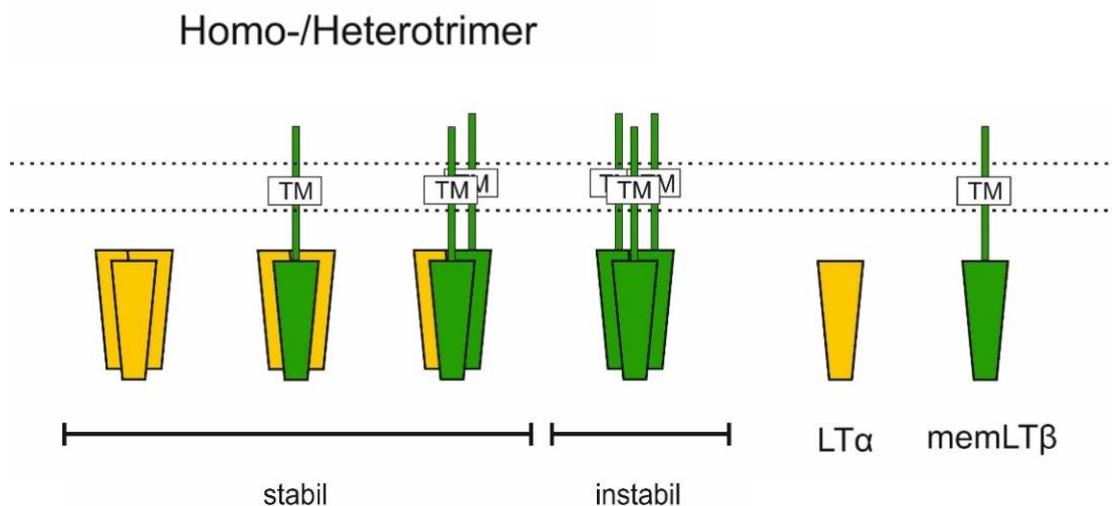


Abbildung 6.6: Schema Homo- und Heterotrimere von Lymphotoxin α und membranständigen Lymphotoxin β .

Die Protomere von $LT\alpha$ (gelb) und $LT\beta$ (grün) können sich zu Homotrimeren in Form von $LT\alpha_3$ und $memLT\beta_3$ zusammenlagern. Desweiteren ist eine Zusammenlagerung in Form von Heterotrimeren mit dem Verhältnis 1:2 und 2:1 von $LT\alpha$ zu $LT\beta$ möglich, wodurch $memLT\alpha_2\beta$ - und $memLT\alpha\beta_2$ -Heterotrimere entstehen. Durch die Instabilität/Inaktivität von $memLT\beta_3$ Trimere, liegen nur $memLT\alpha_2\beta$ - und $memLT\alpha\beta_2$ -Heterotrimere als membranständige aktive Trimere vor.

Um die Bildung von membranständigen Heterotrimeren zu untersuchen, wurden unterschiedliche Verhältnisse der Expressionsplasmide für $LT\alpha$ und $memLT\beta$ zur Transfektion verwendet. Wie Browning und Kollegen (^{23,66,69}) bereits zeigten, liegt $LT\alpha$ alleine nicht als membranständiges Protein vor. Interessanterweise zeigten die FACS Analysen, dass bei Erhöhung des Verhältnisses von $LT\alpha$ zu $memLT\beta$ zu Gunsten von $memLT\beta$, sich das Signal und somit die Anzahl der gebundenen $LT\alpha$ Moleküle ab einem Verhältnis von 1:1 nicht sichtbar verändert (Abbildung 6.7). Eine Erhöhung des $memLT\beta$ -Anteils bei der Transfektion lässt vermuten, dass dies auch mit einer erhöhten Expression dieses Moleküls einhergeht. Anhand der gleichbleibenden Fluoreszenzintensität bei Erhöhung des $memLT\beta$ -Anteils und der Senkung von $LT\alpha$ kann davon ausgegangen werden, dass $LT\alpha$ hier als Großteil in Form von $memLT\alpha\beta_2$ vorliegt. Aufgrund des gleichbleibenden Fluoreszenzsignals der Zellen, welche mit einem EV oder nur mit einem für $memLT\beta$ -kodierenden Plasmid transfiziert wurden, lässt sich schlussfolgern, dass das Fluoreszenzsignal ausschließlich durch das an membranständiges $LT\beta$ assoziierte $LT\alpha$ zustande kam.

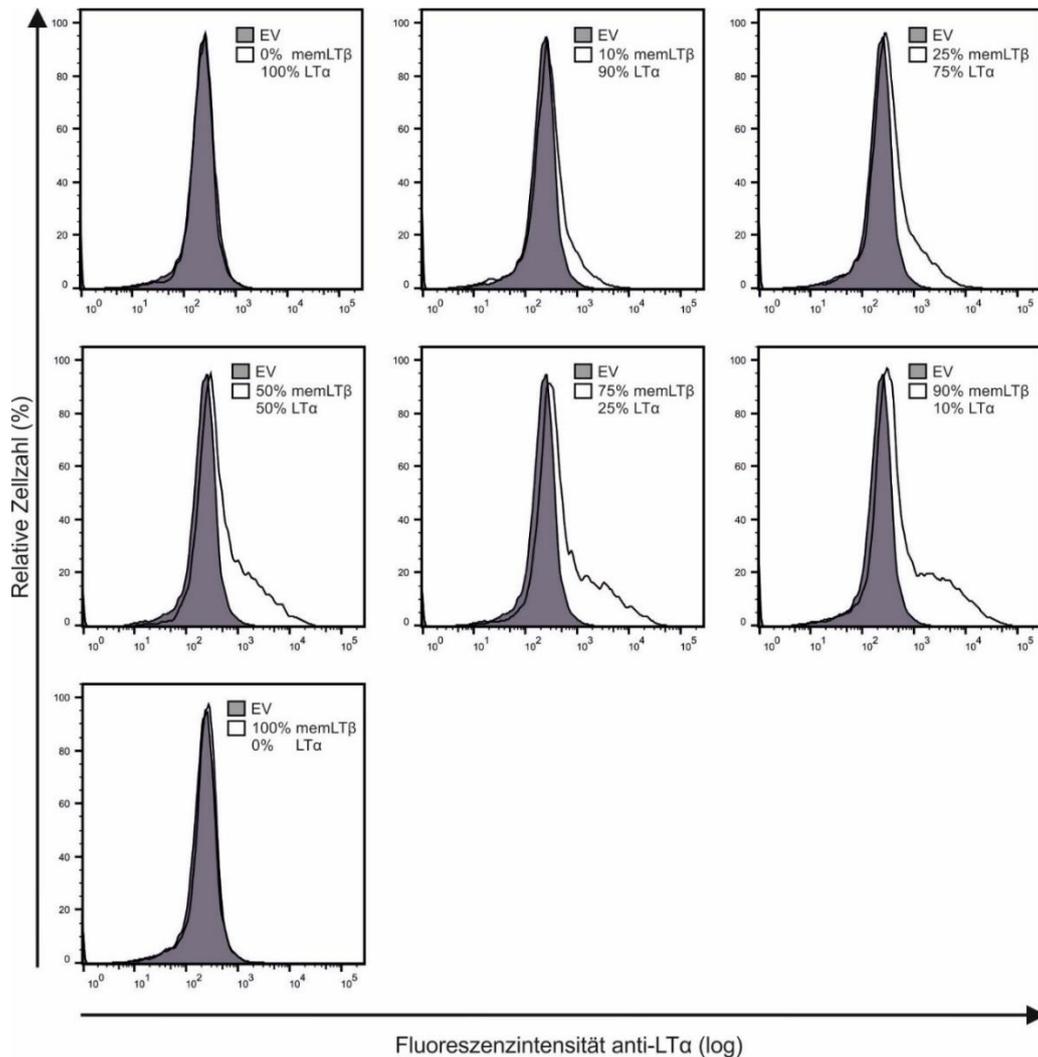


Abbildung 6.7: Detektion von memLT β -gebundenem LT α

HEK293T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen von LT α und memLT β kodierenden Plasmiden kotransfiziert und anschließend, mit Hilfe eines anti-LT α Antikörpers und dem passenden PE-versehenden Sekundärantikörper, auf das Vorhandensein von membrangebundenen LT α hin, untersucht. Als Kontrollen wurden HEK293T-Zellen mit einem Leervektor, sowie nur mit dem Plasmid für LT α oder (mem)LT β transfiziert.

Die transfizierten Zellen wurden daraufhin auf ihre Bindungsvermögen für TNFR1, TNFR2 und LT β R untersucht. Hierfür wurden Fusionsproteine aus den extrazellulären Domänen (=„extracellular domain“ (ed)) von TNFR1, TNFR2 oder LT β R (TNFR1ed, TNFR2ed und LT β Red) und der GpL-Domäne verwendet. Für TNFR1ed-GpL, TNFR2ed-GpL und LT β Red-GpL konnte weder für die Leervektorzellen, noch für die Zellen mit 100 % LT α - oder 100 % memLT β -Expression eine spezifische Bindung beobachtet werden. Dies ist in Einklang mit den bereits genannten Erkenntnissen,

dass $LT\alpha$ nur löslich vorliegt und reine $memLT\beta$ -Trimere hoch instabil und/oder inaktiv sind^(69,71). Eine deutliche Bindung der drei Rezeptoren wurde ab einem Verhältnis von 1:1 von $LT\alpha$ zu $memLT\beta$ detektiert. Hierbei konnte eine steigende Bindung bei der Erhöhung des $memLT\beta$ -Anteils beobachtet werden. Die Bindungen von $TNFR1ed$ -GpL und $TNFR2ed$ -GpL konnten durch das Hinzufügen eines Überschusses an löslichem TNF blockiert werden. Im Gegensatz hierzu führte die Zugabe eines Überschuss an löslichem TNF zu keiner Verringerung des GpL-Signals bei der Bindung von $LT\beta Red$ -GpL (Abbildung 6.8).

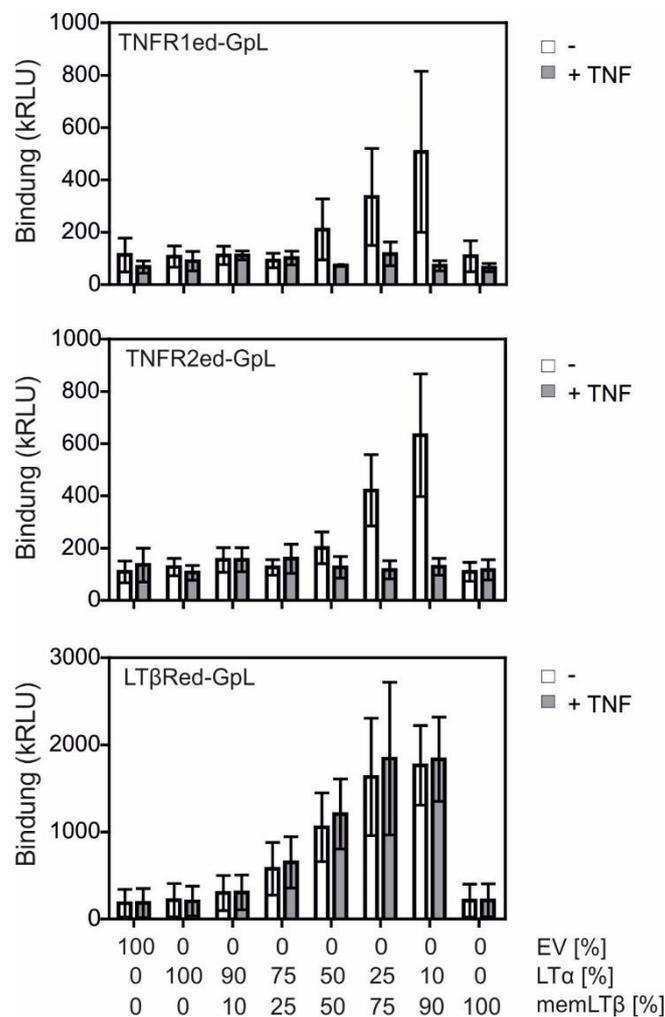


Abbildung 6.8: Membrangebundene Heterotrimere von $LT\alpha$ und $memLT\beta$ binden sowohl an $LT\beta R$, als auch an $TNFR1$ und $TNFR2$.

Zur Untersuchung der membrangebundenen $LT\alpha\beta$ -Trimere wurden HEK293T-Zellen in den angegebenen Verhältnissen mit Plasmiden, die für $LT\alpha$ bzw. $memLT\beta$ kodieren, kotransfiziert und anschließend auf ihre Fähigkeit $TNFR1ed$ -, $TNFR2ed$ - und $LT\beta Red$ -GpL zu binden untersucht. Ein Teil der Zellen wurden mit $20 \mu g/ml$ humanen TNF für 30 min vorinkubiert.

Diese Ergebnisse bestätigen zum Einen die bereits publizierte Interaktion von membranständigen $LT\alpha\beta_2$ -Trimeren mit $LT\beta R$ ⁽²³⁾, zum Anderen belegen sie eine Interaktion von $LT\alpha\beta$ -Heterotrimeren mit $TNFR1$ und $TNFR2$. Da $LT\alpha$ -Homotrimere nicht als membranständiger Ligand vorliegen und der $TNFR1$ - und $TNFR2$ kein $LT\alpha\beta_2$ binden, muss es sich um das membranständige Heteromer $LT\alpha_2\beta$ handeln, das $TNFR1$ ed-GpL und $TNFR2$ ed-GpL bindet. Aufgrund der Koexpression von membranständigem $LT\beta$ und löslichen $LT\alpha$ können lösliche $LT\alpha$ -Trimere oder membranständige $LT\alpha_2\beta$ - oder $LT\alpha\beta_2$ -Trimere entstehen. Hierbei wurde nicht untersucht, inwiefern die Bildung von mem $LT\alpha\beta_2$ -Trimeren gegenüber der Bildung von mem $LT\alpha_2\beta$ -Trimeren bevorzugt wird bzw. in welchem Verhältnis die zwei heterotrimeren Varianten zueinander und im Vergleich zu löslichen $LT\alpha$ -Trimeren vorliegen.

Um die rezeptoraktivierende Wirkung dieser membranständigen Heterotrimere auf die einzelnen Rezeptoren zu untersuchen, wurden für die folgende Experimente Zelllinien verwendet, die entweder nur $TNFR1$ (HeLa-Zellen), nur $TNFR2$ (HeLa- $TNFR2$ - $TNFR1_{KO}$ -Zellen) oder $TNFR1$ und $TNFR2$ (HeLa- $TNFR2$ -Zellen) stabil endogen exprimieren (Abbildung 6.9).

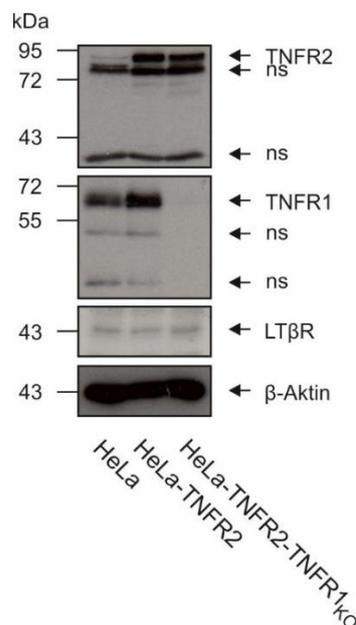


Abbildung 6.9: Expression von $TNFR1$, $TNFR2$ und $LT\beta R$ in verschiedenen HeLa-Varianten.

HeLa-, HeLa- $TNFR2$, HeLa- $TNFR2$ - $TNFR1_{KO}$ -Zellen wurden bezüglich der Expression von $TNFR1$, $TNFR2$ und $LT\beta R$ mittels Western Blot Analysen und spezifischen Antikörpern gegen $TNFR1$, $TNFR2$ und $LT\beta R$ untersucht. Hierfür wurden Lysate aus jeweils 1×10^6 Zellen der Zelllinien hergestellt. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin der Lysate detektiert. ns = nicht spezifische Banden

Die Aktivierung von TNFR1, TNFR2 und LT β R in den verschiedenen HeLa-Zelllinien wurde mittels der induzierbaren IL8-Produktion als Folge der Aktivierung des NF κ B-Signalwegs untersucht. Hierfür wurden HEK293T-Zellen, welche mit Expressionsplasmiden für LT α und memLT β in einem Verhältnis von 1:1 oder einem Leervektor transfiziert wurden (Abbildung 6.10A), mit den HeLa-Zelllinien kokultiviert und die IL8-Induktion analysiert. Membranständiges TNF-exprimierende HEK293T-Zellen dienten hierbei sowohl als Positivkontrolle als auch zur Vergleichsmöglichkeit der aktivierenden Wirkung von membranständigen TNF zu der Koexpression von LT α und memLT β . Analysen der IL8-Expression der transfizierten HEK293T-Zellen alleine zeigten, im Vergleich untereinander als auch im Vergleich mit den unbehandelten Zielzellen, keine Unterschiede in der IL8-Expression. Eine Erhöhung der Produktion konnte bei der Kokultivierung von HeLa, HeLa-TNFR2, sowie HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO} mit den mit membranständigem TNF (memTNF) transient exprimierenden HEK293T-Zellen, als auch mit Transfektanten mit Koexpression von memLT β mit LT α beobachtet werden. Dies zeigte, dass die Koexpression von LT α und memLT β nicht nur Liganden bildet, die TNFR1 und TNFR2 binden sondern auch stimulieren (Abbildung 6.10B).

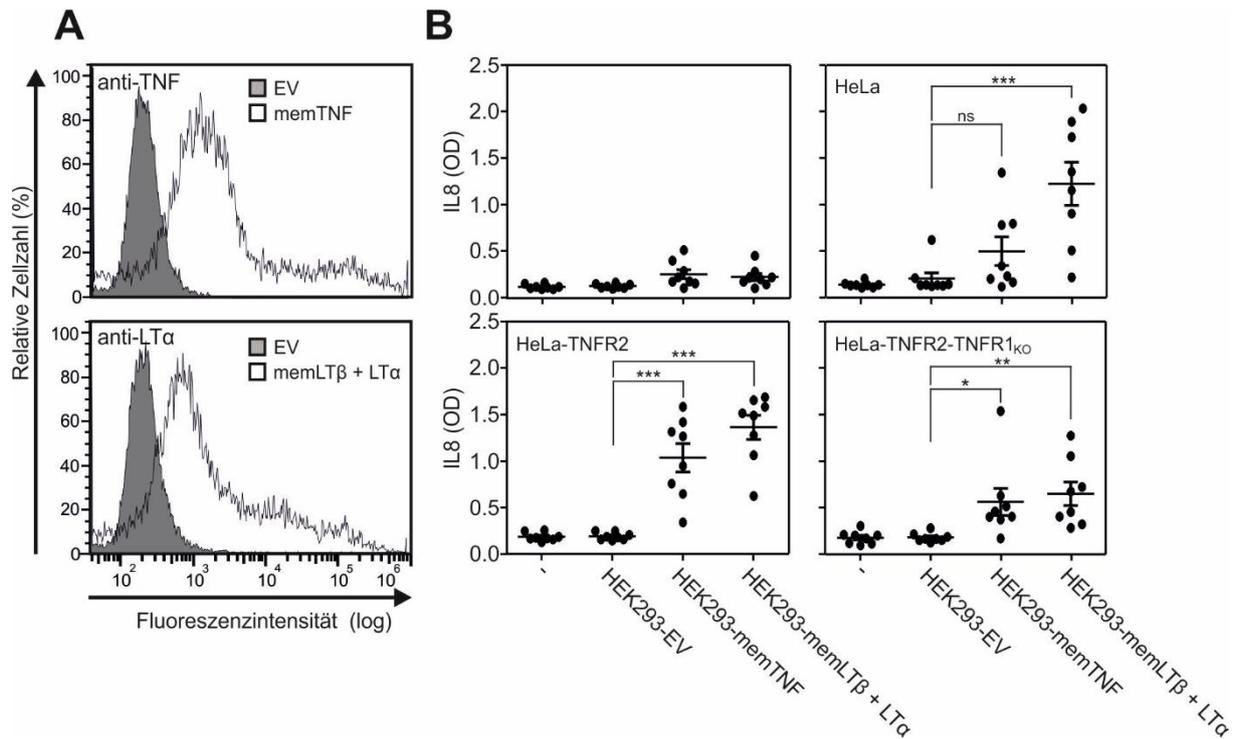


Abbildung 6.10: Koexpression von membranständigem $LT\beta$ und löslichem $LT\alpha$ führt zur Bildung von Heterotrimeren, die die IL8-Produktion in HeLa, HeLa-TNFR2 und HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO} stimulieren

(A) HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für membranständiges TNF, membranständiges $LT\beta$ + löslichem $LT\alpha$ oder einem Leervektor transient transfiziert und anhand der FACS-Analyse auf die Expression von TNF und membrangebundenem $LT\alpha$ untersucht. Hierfür wurden Zellen mit einem PE-markierten Antikörpern gegen TNF α oder einem unmarkierten Primärantikörper gegen $LT\alpha$ in Kombination mit einem PE-markierten Sekundärantikörper für 1 h bei 4°C gefärbt. Die transfizierten Leervektorzellen dienten hierbei als negative Kontrolle. (B) HeLa, HeLa-TNFR2 und HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}-Zellen wurden in 96-Well-Platten mit 2×10^4 Zellen/Well ausgesät. Am nächsten Tag wurden 2×10^4 Zellen/Well der transfizierten Zellen hinzugegeben. Zur Kontrolle wurden die transfizierten Zellen ohne Effektorzellen untersucht. Nach Stimulation über Nacht wurde die IL8-Expression der Kokulturen, sowie der einzelnen Zellen mittels IL8-ELISA detektiert und mit der Software PRISMA analysiert. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns, nicht signifikant

6.3. Mem(sc) $LT\alpha_2\beta$ Heterotrimer aktivieren TNFR1 und TNFR2

Um nun die einzelnen membranständigen $LT\alpha_2\beta$ - und $LT\alpha\beta_2$ -Heterotrimer näher auf ihre Wirkungsweise und Funktion untersuchen zu können, wurden membranständige durch eine Aminosäurekette („single-chain“(sc)-Konstrukte) kodierte Varianten dieser Moleküle generiert. Hierfür wurde ein membranständiges $LT\beta$ -Molekül mit zwei $LT\alpha$ -

Molekülen oder einem $LT\alpha$ -Molekül und einem löslichen $LT\beta$ -Molekül anhand von Linkersequenzen aneinander fusioniert (Abbildung 6.11).

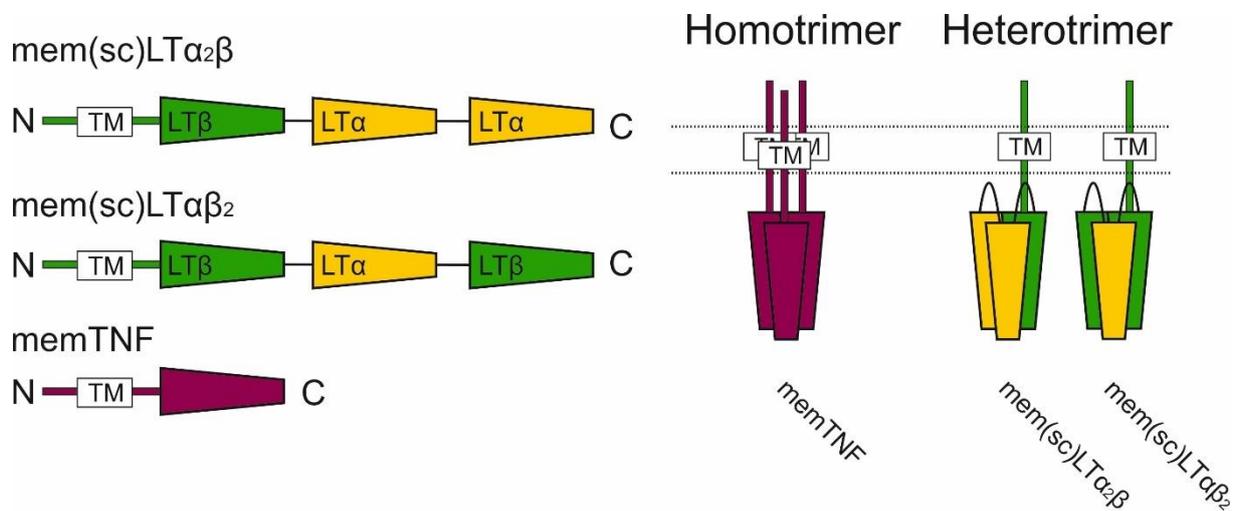


Abbildung 6.11: Schema $mem(sc)LT\alpha_2\beta$, $mem(sc)LT\alpha\beta_2$ und $memTNF$.

Die THD von löslichem $LT\alpha$ und löslichem $LT\beta$ wurden mit Hilfe von Linkersequenzen an ein $LT\beta$ -Molekül inklusive dessen Transmembrandomäne (=TM) fusioniert. Für $mem(sc)LT\alpha_2\beta$ wurden hierfür zwei $LT\alpha$ Moleküle an ein $memLT\beta$ fusioniert, während für $mem(sc)LT\alpha\beta_2$ zunächst eine THD von $LT\alpha$, gefolgt von einer THD von $LT\beta$, an ein $memLT\beta$ fusioniert wurde. Anhand der Linker kommt es zu einer intramolekularen Zusammenlagerung zu $mem(sc)LT\alpha_2\beta$ oder $mem(sc)LT\alpha\beta_2$. $MemTNF$ hingegen besteht aus einzelnen membranständigen Molekülen.

Mit Hilfe dieser membranständigen single-chain Konstrukte konnten nun die reinen Heterotrimeren untersucht werden, da keine Koexpression der $LT\alpha$ - und $LT\beta$ -Liganden nötig war und nur das Vorhandensein der jeweiligen einzelnen Heterotrimeren gewährleistet werden konnte. Um die Funktionalität der membranständigen Heterotrimeren $mem(sc)LT\alpha_2\beta$ und $mem(sc)LT\alpha\beta_2$ näher zu untersuchen, wurden hierfür stabil exprimierende Zelllinien anhand des Flp-In/FRT Systems generiert. Zusätzlich zu den Heteromer-exprimierenden Zellen, wurden Kontrollzellen mittels Transfektion eines Leervektors generiert.

Durchflusszytometrische Analysen der generierten Zelllinien mit einem spezifischen anti- $LT\alpha$ -Antikörper zeigten bereits erste Unterschiede der zwei membranständigen Heteromerzelllinien $mem(sc)LT\alpha_2\beta$ und $mem(sc)LT\alpha\beta_2$ auf. (Abbildung 6.12). $LT\alpha_3$ kommt in seiner natürlichen Form nicht als membranständiges Trimer vor, jedoch interagieren sowohl $LT\alpha_3$ als auch TNF mit den Rezeptoren TNFR1 und TNFR2. Aus

diesem Grund können, anstelle von membranständigem $LT\alpha_3$ -Zellen, membranständige TNF-Zellen als Kontrolle verwendet werden. Für die Untersuchungen der stabil exprimierenden HEK293-Flp-In-mem(sc) $LT\alpha_2\beta$ - und HEK293-Flp-In-mem(sc) $LT\alpha\beta_2$ -Zellen wurden auch stabil exprimierende memTNF-Zellen verwendet. Hierfür wurde die bereits publizierte CHO-memTNF Δ 1-12-Zelllinie (⁵⁶) als Positivkontrolle für die Experimente ausgesucht und mit deren Negativkontrolle, in Form von CHO-Zellen, in die Analysen integriert (Abbildung 6.12).

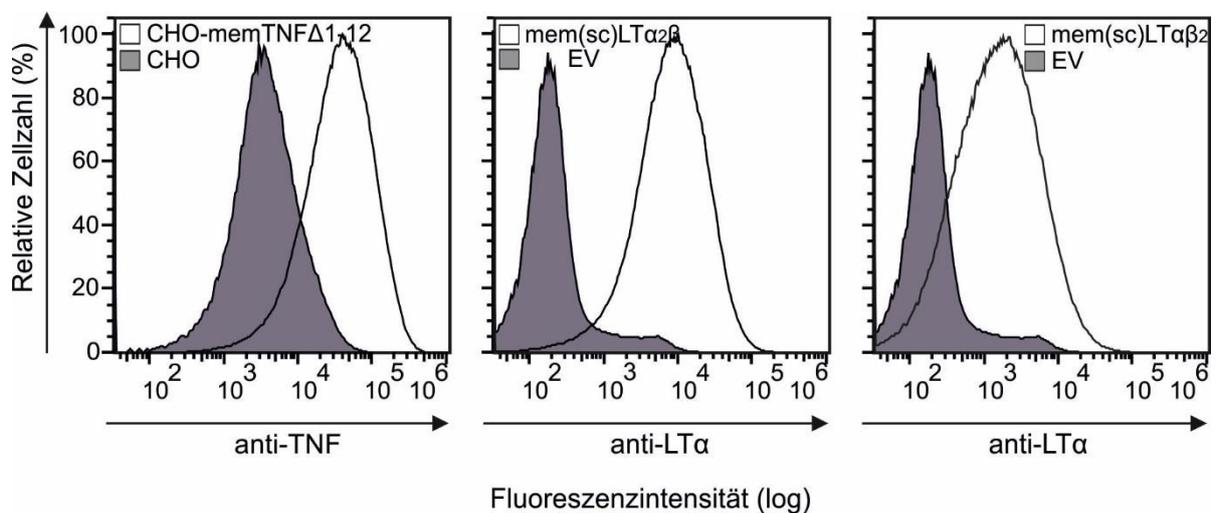


Abbildung 6.12: Stabile Expression von mem(sc) $LT\alpha_2\beta$, mem(sc) $LT\alpha\beta_2$ in HEK293-Flp-In-Zellen, sowie memTNF in CHO-Zellen.

Stabil exprimierende mem(sc) $LT\alpha_2\beta$, mem(sc) $LT\alpha\beta_2$ oder EV-Zellen (HEK293-Flp-In), sowie stabil exprimierende memTNF Zellen (CHO-memTNF Δ 1-12), als auch ihre Kontrollzellen (CHO), wurden auf ihre Expression der jeweiligen membranständigen Liganden via FACS untersucht. Hierfür wurden die exprimierenden Zellen und deren Kontrollzellen mit den spezifischen Antikörpern für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend auf die gebundenen Antikörper mittels Durchflusszytometrie überprüft.

Die stabil exprimierenden HEK293-Flp-In-Zelllinien für mem(sc) $LT\alpha_2\beta$ und mem(sc) $LT\alpha\beta_2$, sowie den stabilen memTNF-exprimierenden CHO-memTNF Δ 1-12-Zellen, wurden zunächst auf ihre Funktionalität hinsichtlich der Bindung an TNFR1, TNFR2 und LT β R untersucht. TNFR1ed-GpL und TNFR2ed-GpL wiesen eine starke Bindung an memTNF-exprimierende Zellen (CHO-memTNF Δ 1-12) auf. Eine

spezifische Bindung von LT β Red-GpL an memTNF konnte nicht detektiert werden. Für mem(sc)LT $\alpha_2\beta_2$ -Zellen konnte hingegen nur eine spezifische Bindung mit LT β Red-GpL detektiert werden. Interessanterweise banden mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ -Zellen nicht nur spezifisch TNFR1ed-, sowie TNFR2ed-GpL, sondern auch LT β Red-GpL auf (Abbildung 6.13).

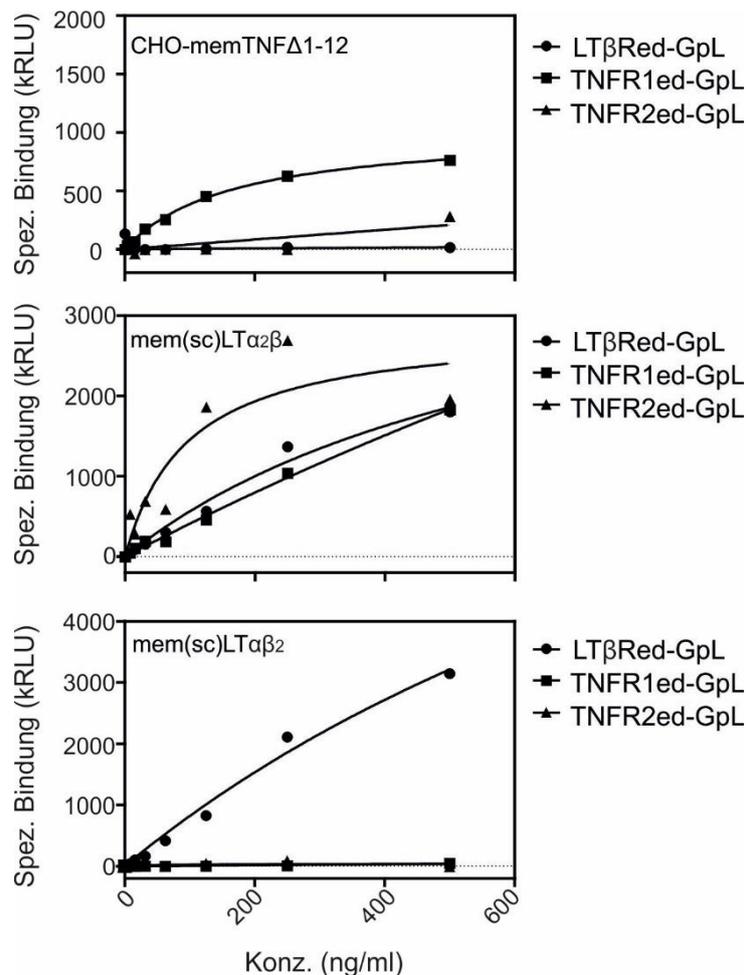


Abbildung 6.13: mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ bindet LT β R, sowie TNFR1 und TNFR2.

Stabil exprimierende mem(sc)LT $\alpha_2\beta$, mem(sc)LT $\alpha_2\beta_2$ und memTNF-Zellen, sowie deren Kontrollzellen wurden auf ihre Bindungsfähigkeit für LT β Red-, TNFR1ed-, TNFR2ed-GpL untersucht. Hierfür wurden 1×10^6 Zellen pro Konzentrationswert für 1 h bei 37°C mit den entsprechenden Zellüberständen inkubiert. Anschließend wurde die *Glossina morsitans* Luziferaseaktivität der gebundenen löslichen Rezeptoren bestimmt und die spezifische Bindung mittels der Software GraphPad Prism5 und der Funktion „Nonlinear regression (curve fit)“ berechnet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von fünf voneinander unabhängigen Experimenten.

Aufgrund der Bindungsfähigkeit von mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ an TNFR1, TNFR2 und LT β R lag das Interesse der möglichen aktivierenden Wirkung dieser Rezeptoren besonders im Fokus. Anhand von Kokulturrexperimenten mit TNFR1-exprimierenden HeLa-Zellen, TNFR1- und TNFR2-exprimierenden HeLa-TNFR2-Zellen, sowie nur TNFR2-exprimierenden HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}-Zellen konnte die spezifische Wirkung von mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ auf TNFR1 und TNFR2 untersucht werden.

Die unterschiedlichen HEK293-Flp-In-Zelllinien wiesen ohne die Zielzellen eine marginale IL8-Expression auf. Diese marginale IL8-Expression zeigt sich auch bei der Kokultivierung von HEK293-Flp-In-EV-Zellen mit HeLa-, HeLa-TNFR2- oder HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}-Zellen. Bei den Kokulturrexperimenten mit HEK293-Flp-In-mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ -Zellen wiesen sowohl HeLa, HeLa-TNFR2, als auch HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}-Zellen eine signifikante Erhöhung des IL8-Signals auf. Durch diese Ergebnisse konnte zum Einen sichergestellt werden, dass eine Erhöhung der IL8-Expression aufgrund der Aktivierung der Zielzellen und nicht über die stabil exprimierenden Zellen zustande kam, zum Anderen konnte eine Aktivierung der TNFR1- und TNFR2-Signalkaskaden durch mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ festgestellt werden. Der marginale Anstieg von IL8 nach Stimulation mit mem(sc)LT $\alpha_2\beta$, lässt sich auf die Aktivierung der endogen exprimierten LT β -Rezeptoren (Abbildung 6.4) in HeLa-, HeLa-TNFR2- und HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}-Zellen zurückführen (Abbildung 6.14).

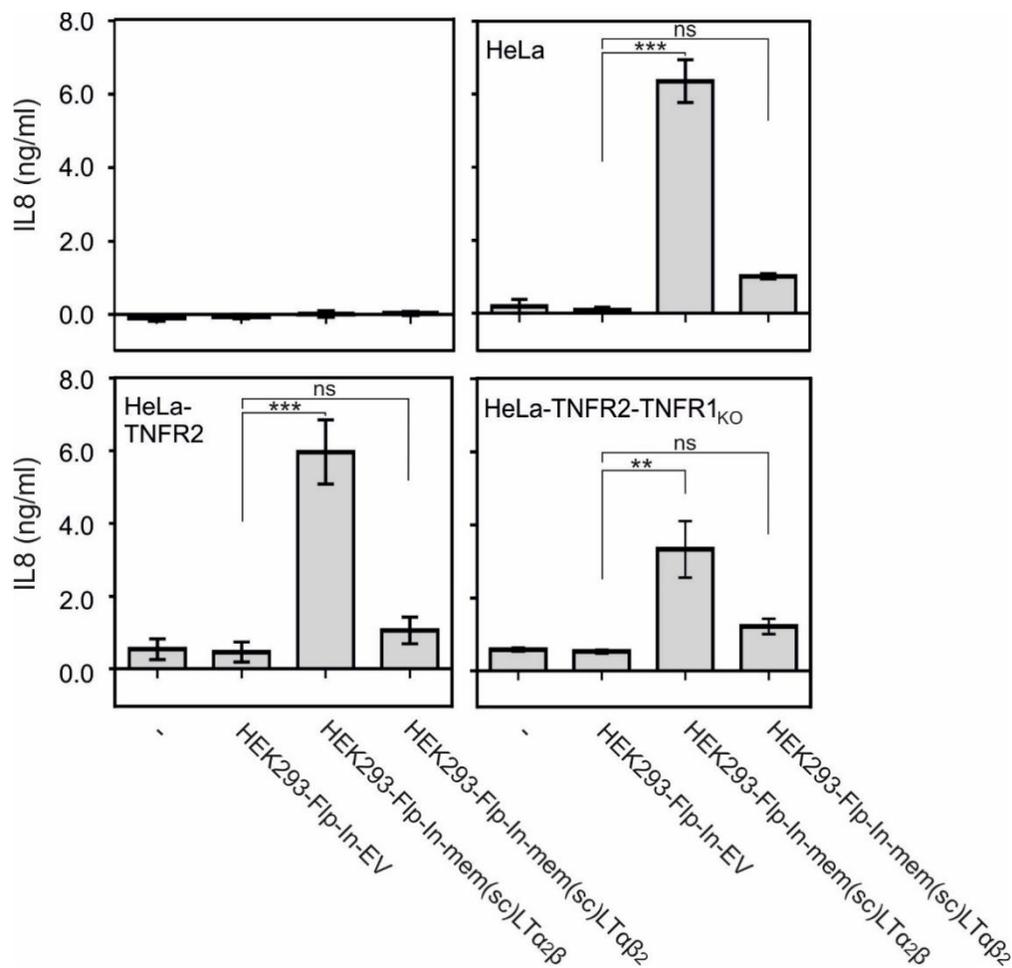


Abbildung 6.14: *mem(sc)LTa₂β* aktiviert TNFR1 und TNFR2.

HeLa, HeLa-TNFR2 und HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}-Zellen wurden mit stabil exprimierenden *mem(sc)LTa₂β*, und *mem(sc)LTa₂β*-Zellen, sowie Kontrollzellen für 18 h bei 37°C in einem Verhältnis von 1:1 stimuliert und sowohl die IL8-Produktion der unstimulierten, als auch der stimulierten Zellen mittels IL8-ELISAs bestimmt und anhand der Software PRISM analysiert. Statistische Analysen wurden mit der Funktion 1way ANOVA durchgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei voneinander unabhängigen Experimenten. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,1$; ns nicht-signifikant

Um die aktivierende Funktion des membranständigen Heteromers *mem(sc)LTa₂β* weiter zu untersuchen und zu bestätigen, wurden die einzelnen Rezeptoren mit spezifischen Antikörper blockiert. Um zu gewährleisten, dass diese spezifischen Antikörper keine aktivierende Wirkung auf die HEK293-Flp-In-Zellen haben, wurden auch HEK293-Flp-In-WT-Zellen mit diesen spezifischen Antikörpern inkubiert. Stimulation mit humanen rekombinanten TNF hatte eine hohe IL8-Expression zu Folge. Ein spezifischer Antikörper gegen TNFR2 bzw. spezifische Antikörperfragmente gegen TNFR1, und LTβR (anti-TNFR1-Fab, anti-TNFR2, anti-LTβR-Fab) zeigten im

Gegensatz dazu auch bei hohen Konzentrationen keine IL8-Induktion (Abbildung 6.15). Hierdurch konnte gewährleistet werden, dass die zum Blockieren von TNFR1, TNFR2, sowie LT β R verwendeten Antikörper/Antikörperfragmente selbst zu keiner IL8-Induktion in HEK293-Flp-In-Zellen führen und diese als Ausgangszelllinie für die stabilen Zellen in Experimenten mit blockierenden Antikörpern verwendet werden können. Durch diese Ergebnisse konnte zudem sichergestellt werden, dass die detektierten Signale auf die jeweils anderen Zellen des Kokultorexperiments zurückzuführen sind.

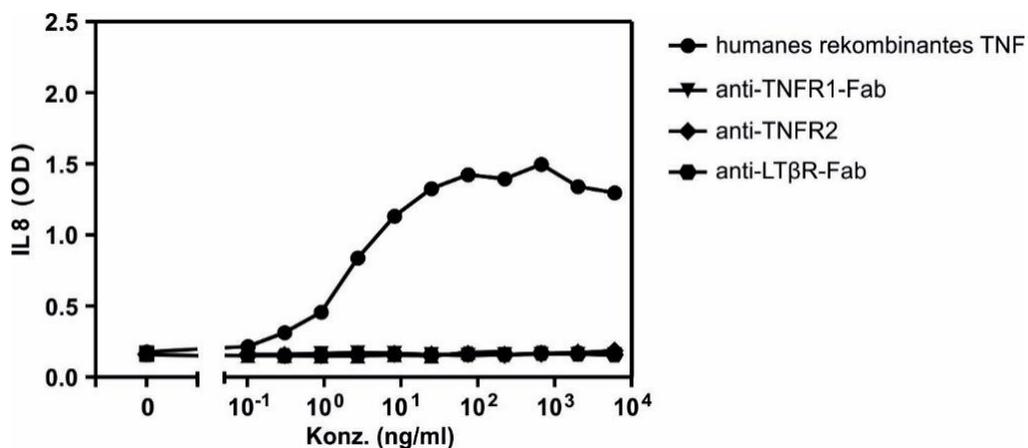


Abbildung 6.15: Charakterisierung von HEK293-Flp-In-Zellen.

HEK293-Flp-In-WT-Zellen (5×10^4 Zellen/Well) wurden mit spezifischen Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten (Fab) für TNFR1, TNFR2 und LT β R, sowie einer Positivkontrolle (TNF(h)) für 18 h bei 37°C inkubiert, anschließend auf ihre IL8-Produktion mittels ELISA untersucht und mit Hilfe der Software GraphPad Prism5 analysiert. Aufgrund der geringen IL8-Produktion überlagern sich die Kurven für anti-TNFR1-Fab, anti-TNFR2 und anti-LT β R-Fab, wodurch sie schlecht unterschieden werden können. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei voneinander unabhängigen durchgeführten Experimenten.

Die blockierenden Antikörper bzw. Antikörperfragmente wurden dann in Kokultorexperimenten von HeLa-TNFR2-TNFR1 $_{KO}$ -Zellen mit HEK293-Flp-In-mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ -Zellen, sowie deren Kontrollzellen zum Blockieren von TNFR1, TNFR2 und LT β R verwendet. Durch die Blockade der einzelnen Rezeptoren konnte die aktivierende Wirkung von mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ auf den TNFR2 untersucht werden.

Die spezifischen Antikörper bzw. Antikörperfragmente für TNFR1, TNFR2 und LT β R zeigten keine aktivierende Wirkung auf HeLa-TNFR2-TNFR1 $_{KO}$ -Zellen besitzen. Durch

die Vorversuche mit HEK-Flp-In-Zellen und dem spezifischen Antikörper bzw. den spezifischen Antikörperfragmenten konnte auch eine IL8-Induktion in HEK-Flp-In-Zellen ausgeschlossen werden. Hierdurch ist eine Erhöhung des IL8-Signals auf die Sekretion von IL8 durch die Effektorzelllinie HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO} zurückzuführen und nicht auf die HEK293-Flp-In-Zellen. Anti-TNFR1-Fab, anti-TNFR2 und anti-LTβR-Fab wiesen erwartungsgemäß auch in Kokulturen von HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}-Zellen mit den Kontrollzellen HEK293-Flp-In-EV keine IL8-Induktion auf.

Im Gegensatz hierzu konnte eine hohes IL8-Signal in Kokulturen mit HEK293-Flp-In-mem(sc)LTα₂β und HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}-Zellen erzielt werden. Die Kokulturen zeigten bei Blockade des TNFR2-Rezeptors eine signifikante Reduzierung der IL8-Induktion, jedoch nicht bei Blockade des TNFR1- oder des LTβR-Rezeptors (Abbildung 6.16). Hierdurch konnte eine aktivierende Wirkung von mem(sc)LTα₂β auf den TNFR2 nachgewiesen werden.

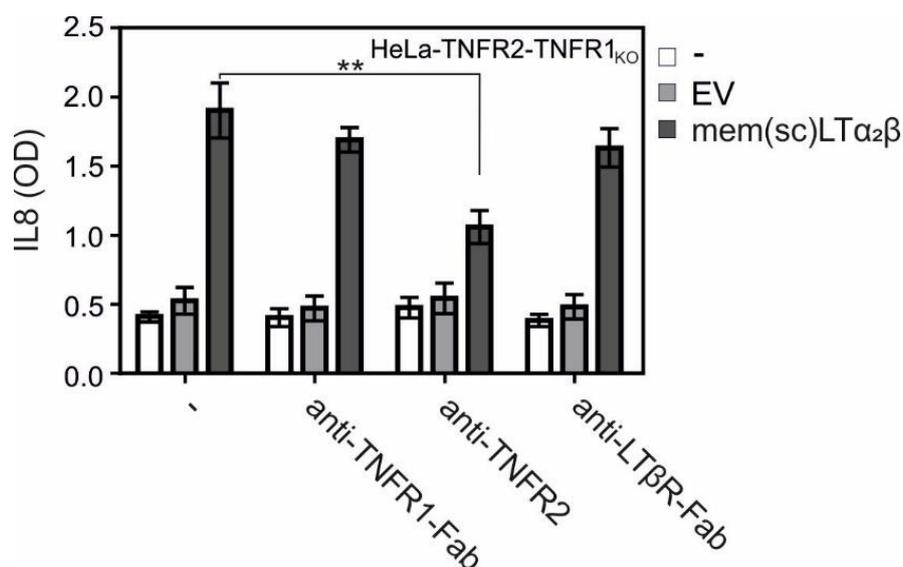


Abbildung 6.16: Mem(sc)LTα₂β aktiviert TNFR2.

Zur genauen Bestimmung der Interaktionspartner von stabil exprimierenden HEK293-Flp-In-mem(sc)LTα₂β-Zellen wurden HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}-Zellen (5x10⁴ Zellen/Well) mit spezifischen Antikörpern für TNFR1, TNFR2 und LTβR (10 µg/ml) für 30 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit mem(sc)LTα₂β exprimierenden Zellen oder den Kontrollzellen (EV) im Verhältnis 1:1 für 18 h stimuliert. Anschließend wurde die IL8-Induktion mittels IL8-ELISA bestimmt und mit der Software PRISM analysiert. Statistische Analysen wurden mit der Funktion 1way ANOVA durchgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei voneinander unabhängigen Experimenten. *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,1; ns nicht-signifikant

Die hohe IL8-Expression nach Stimulation mit mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ exprimierenden Zellen weist auf die Initiierung des NF κ B-Signalwegs hin, welcher durch TNFR1 als auch TNFR2 aktiviert werden kann. Mit Hilfe von Kokulturen aus Kym-1- und HeLa-RIP3-FADD_{KO}-Zellen mit den stabil exprimierenden memTNF-, mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ - und mem(sc)LT $\alpha_2\beta_2$ -Zelllinien wurden die membranständigen Liganden hinsichtlich der Auslösung von Nekroptose und Apoptose untersucht.

Kym-1-Zellen wurden mit HEK-Flp-In-mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ -Zellen kokultiviert, um eine mögliche apoptotische Wirkung von mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ zu untersuchen. Bei der Kym-1-Zelllinie haben sowohl die Aktivierung von TNFR1, als auch von TNFR2 die Induzierung der Apoptose zur Folge. TNFR1 gehört zur TNFRSF-Subgruppe der Todesrezeptoren, welche eine Todesdomäne besitzen und Apoptose sowie Nekroptose initiieren können (^{19,89}). TNFR2 hingegen gehört zur TNFRSF-Subgruppe der TRAF-interagierenden Rezeptoren, welche keine DD besitzen. Diese Gruppe zeichnet sich dadurch aus, dass sie Bindestellen für Mitglieder der TRAF-Familie besitzen, die Signalwege aktivieren, die zur Aktivierung von NF κ B-Transkriptionsfaktoren und diversen Kinasen führen (^{90,91}). Aufgrund der fehlenden DD kann der TNFR2, im Gegensatz zum TNFR1, nicht direkt Apoptose oder Nekroptose einleiten. Jedoch hat die Aktivierung des TNFR2 die Expression von TNF zur Folge, welches wiederum zur Aktivierung des TNFR1 führt (^{20,89}). Anhand von Kokulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass Stimulation mit CHO-memTNF Δ 1-12- und HEK293-Flp-In-mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ -Zellen die Apoptose in Kym-1-Zellen einleiten kann. Durch die Hinzugabe von CHX, welches Zellen für Apoptose sensibilisiert, konnte diese Wirkung noch verstärkt werden. Mit Hilfe des Pancaspase-Inhibitors zVAD konnte diese Induzierung der Apoptose unterbunden werden (Abbildung 6.17).

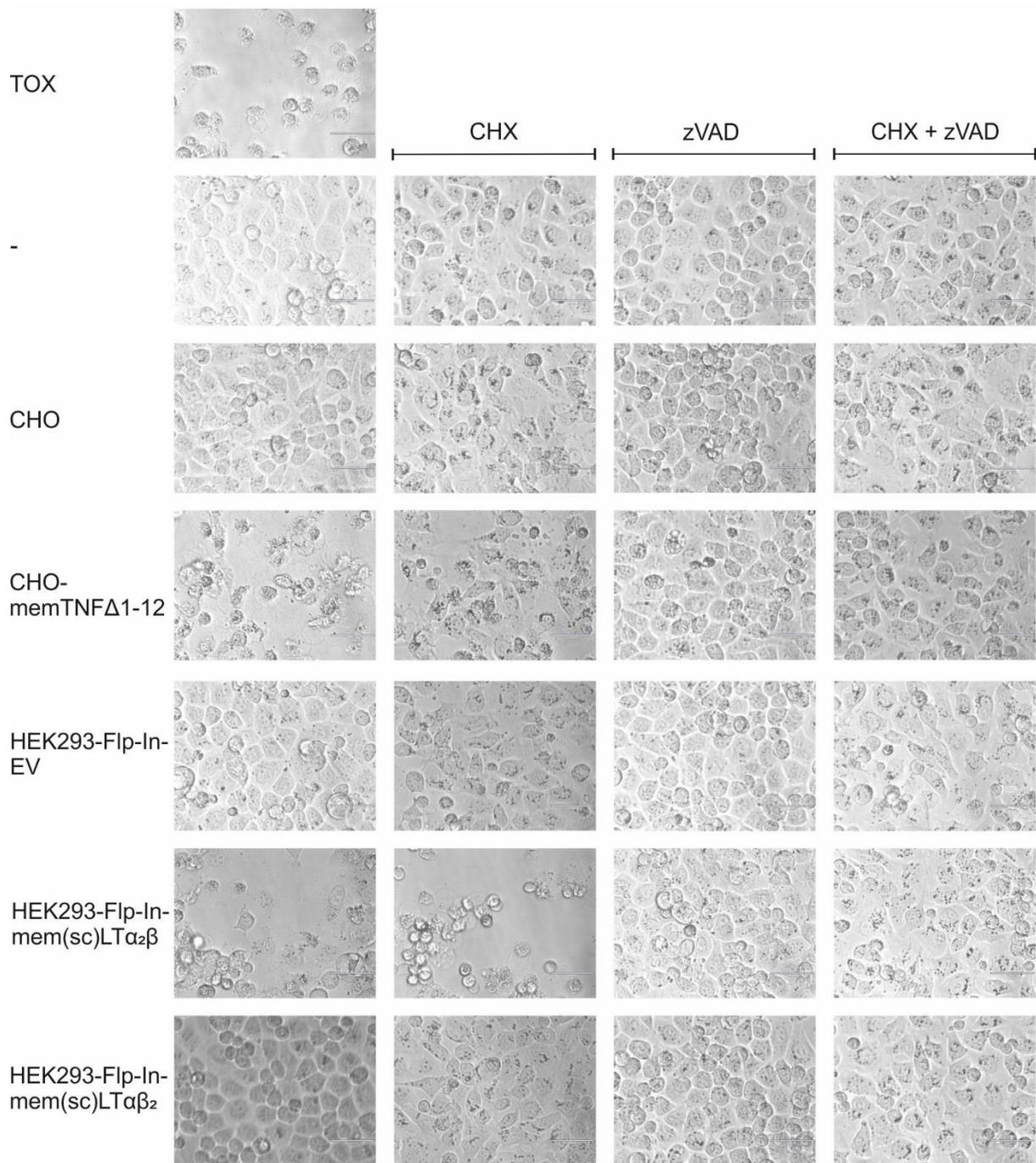


Abbildung 6.17: Membranständiges TNF sowie mem(sc)LTα₂β führt zur Apoptose in Kym-1 Zellen.

Kym-1 Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät (2×10^4 Zellen/Well) und am nächsten Tag mit CHX ($2,5 \mu\text{g/ml}$), zVAD ($20 \mu\text{M}$) oder CHX und zVAD für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurden 2×10^4 Zellen der Zelllinien CHO, CHO-memTNFΔ1-12, HEK293-Flp-In-EV, sowie HEK293-Flp-In-mem(sc)LTα₂β und -mem(sc)LTα₂β₂ hinzugegeben. Nach Kultivierung über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ wurde Kokulturen sowie eine Sterblichkeitskontrolle (Tox) verglichen und mikroskopisch dokumentiert. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Vergrößerung 40x.

Um die mikroskopisch ersichtlichen Ergebnisse zu verifizieren, wurden die Zellvitalität, zusätzlich zu der optischen Beurteilung, anhand von Färbung mit Kristallviolett ⁽⁹²⁾ untersucht. Hierbei nehmen die Zellen den Kristallviolettfarbstoff auf, welcher nicht mehr ausgewaschen werden kann. Während die lebendigen Zellen weiterhin adhären vorliegen, werden die toten Zellen durch Waschen entfernt. Hierdurch werden nur die vitalen Zellen bei spektralphotometrischen Messungen detektiert. Kokulturen von CHO-memTNF Δ 1-12- und HEK293-Flp-In-mem(sc)LT α β ₂-Zellen zeigten eine signifikante Induzierung der Apoptose während die unstimulierten Zellen, sowie die Kokulturen mit Kontrollzellen, als auch HEK293-Flp-In-mem(sc)LT α β ₂-Zellen keine apoptotische Wirkung aufwiesen. Die Hinzugaben von CHX führten zu einer stärkeren apoptotischen Antwort auf die Interaktion mit memTNF und mem(sc)LT α β ₂, jedoch nicht auf die Interaktion mit mem(sc)LT α β ₂. Die Verwendung von zVAD konnte diese Initiierung der Apoptose sowohl bei Kym-1- Zellen, als auch bei CHX-sensitivierten Kym-1-Zellen unterbinden (Abbildung 6.18).

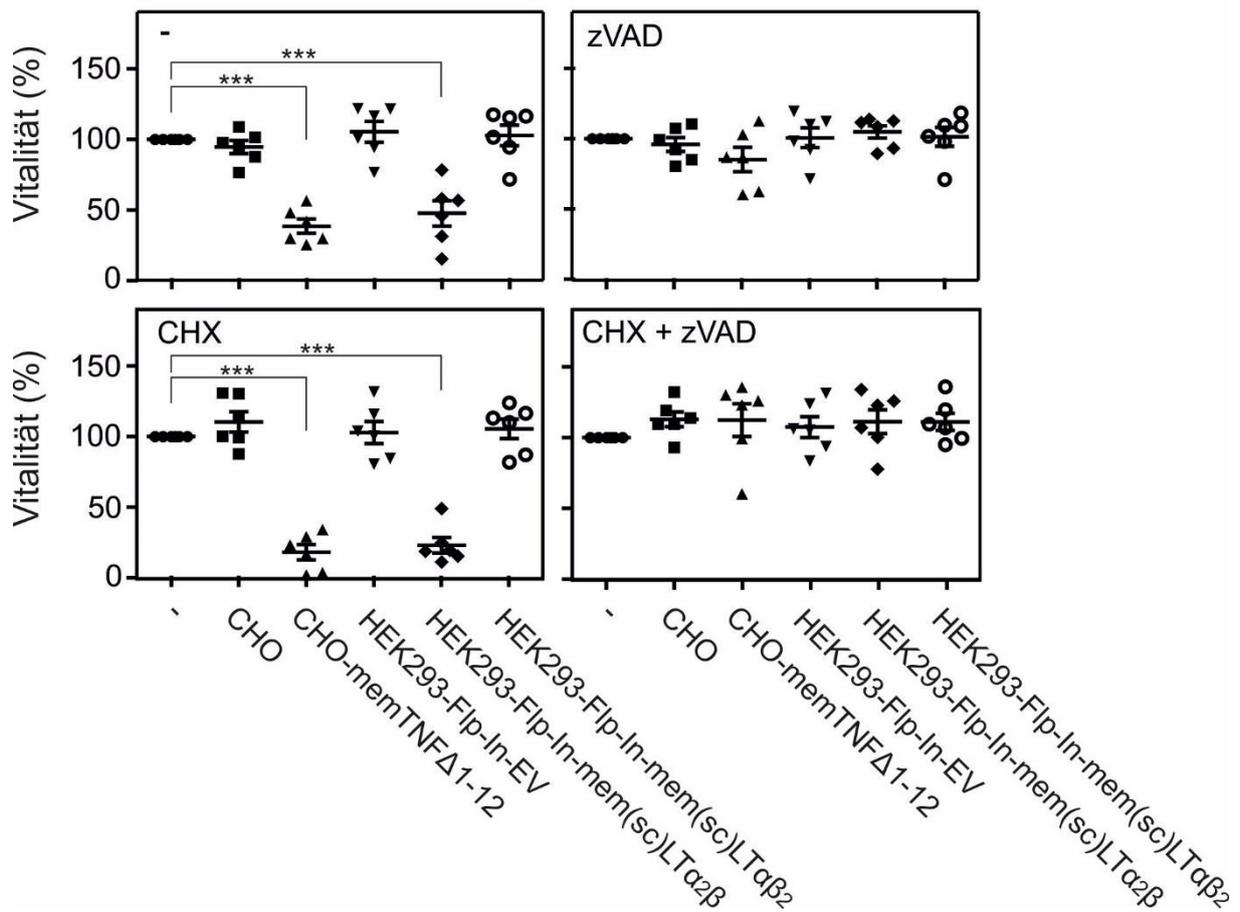


Abbildung 6.18: Aktivierung von Apoptose durch mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ in Kym-1.

Kym-1-Zellen (5×10^4 Zellen/Well) wurden mit stabil exprimierenden memTNF (CHO-memTNF $\Delta 1-12$), HEK293-Flp-In-mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ und -mem(sc)LT $\alpha_2\beta$, sowie deren Kontrollzellen im Verhältnis 1:1 für 18 h bei 37° stimuliert. Die Zellen wurden wie angegeben mit zVAD (20 μ M), CHX (2,5 μ g/ml) oder CHX + zVAD für 30 min vorbehandelt. Mittels Kristallviolett färbung der lebenden Zellen wurden die Sterblichkeitsrate der einzelnen Kokulturen bestimmt. Statistische Auswertungen wurden mithilfe der Software PRISMA durchgeführt. Hierbei wurde die Funktion ANOVA mit dem Bonferroni-Vergleich von den möglichen Paarkombination verwendet. Dargestellt sind die Ergebnisse von sechs voneinander unabhängigen Experimenten. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,1$; ns nicht-signifikant

Des Weiteren konnte die Apoptoseinduktion durch memTNF und mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ anhand von Western Blot Analysen bewiesen werden. In der apoptotischen Signalkaskade spielen Caspasen eine essentielle Rolle in der Signalweitergabe^(93,94), welche bei Initiierung der Apoptose vermehrt prozessiert und somit aktiviert werden. Zusätzlich zur erhöhten Spaltung von Caspasen, kommt es bei der Apoptose auch zur enzymatischen Spaltung der PARP, welche eine Rolle in der DNA-Reparatur spielt und als Marker der Apoptose zählt⁽⁹⁵⁾. Die Stimulationen von Kym-1-Zellen mit

memTNF und mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ exprimierenden Zellen zeigte eine erhöhte Prozessierung der Caspasen 8 und 9 und eine verstärkte Spaltung von PARP verglichen mit dem unstimulierten Ansatz oder den Kokulturansätzen mit Kontroll- und mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ -Zellen (Abbildung 6.19).

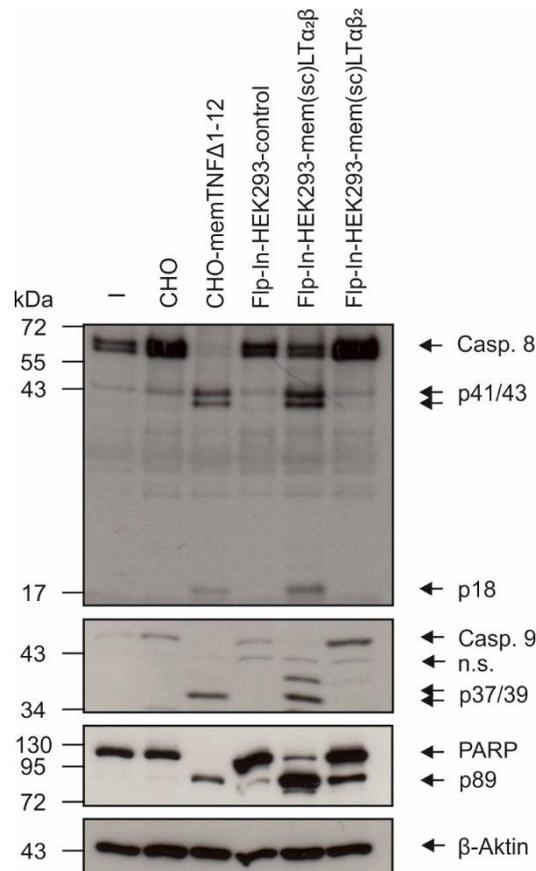


Abbildung 6.19: mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ induziert die apoptotische Signalkaskade.

Kym-1-Zellen (1×10^6 Zellen/Well) wurden in 6-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit CHX ($2,5 \mu\text{g/ml}$) und stabil memTNF, mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ und mem(sc)LT $\alpha_2\beta_2$ exprimierenden Zellen im Verhältnis von 1:1 für 8 h stimuliert, anschließend lysiert und anhand von Western Blots auf die angegebenen Proteine analysiert. Beta-Aktin diente hierbei als Ladekontrolle. Dargestellt sind repräsentativen Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

Es wurde bereits gezeigt, dass HeLa-RIP3-FADD KO -Zellen eine hohe nekroptotische Antwort nach TNFR1-Aktivierung aufweisen ⁽⁹⁶⁾. Durch Kokultivierung dieser Zellen

mit stabil exprimierenden CHO-memTNF Δ 1-12-, HEK293-Flp-In-mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ - und HEK293-Flp-In-mem(sc)LT $\alpha_2\beta_2$ -Zellen, sowie den dazugehörigen Kontrollzellen wurde die nekroptotische Wirkung der membranständigen Liganden auf HeLa-RIP3-FADD_{KO}-Zellen untersucht.

Anhand der visuellen Untersuchung konnte beobachtet werden, dass der unstimulierte Ansatz und die mit den Kontrollzellen stimulierten Zellen kein Zellsterben aufwiesen. Durch die bereits gezeigte nicht vorhandene Bindung von mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ an TNFR1 und TNFR2 wiesen diese Kokulturen, wie zu erwarten, auch kein Zellsterben auf. Die Stimulation mit memTNF und mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ hingegen führte zu einem deutlich sichtbaren Absterben der HeLa-RIP3-FADD_{KO}-Zellen. Zur Untersuchung und Verifizierung, dass es sich hierbei um Nekroptose handelt, wurde zu den Kokulturen zum Einen der Pancaspase-Inhibitors zVAD hinzugefügt, welcher Apoptose verhindert und Nekroptose fördert und zum Anderen Nec-1, einem RIPK1 Inhibitor⁽⁹⁷⁾, welcher die Aktivierung von RIPK1 verhindert und somit die Nekroptose unterbindet. Das mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ induzierte Zellsterben wurde durch zVAD-Hinzugabe nicht inhibiert, durch Hinzugabe von Nec-1 hingegen konnte die Zellen gerettet werden (Abbildung 6.20).

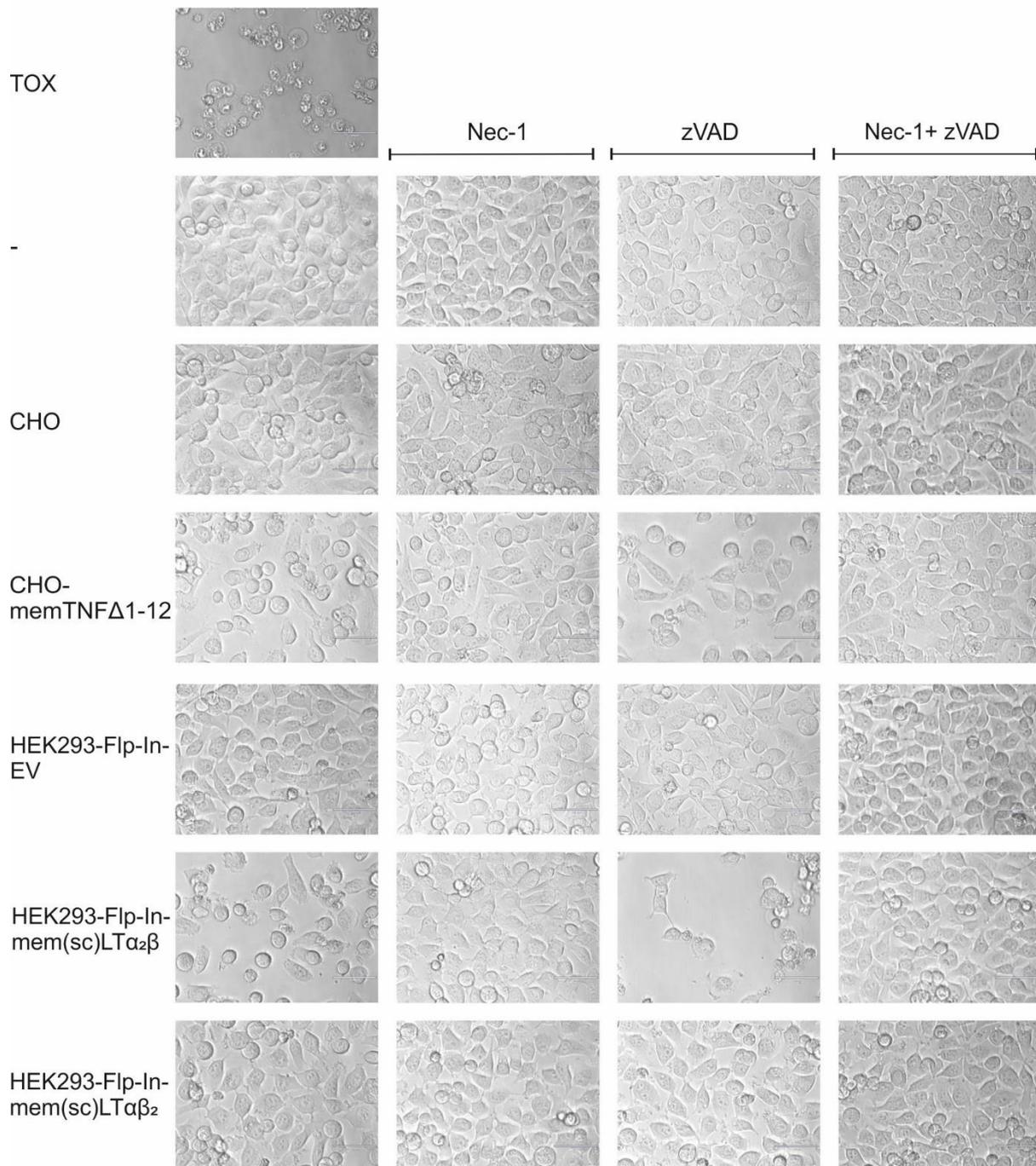


Abbildung 6.20: Membranständiges TNF sowie mem(sc)LTα₂β induzieren in HeLa-RIP3-FADD_{KO}- Zellen Nekroptose

HeLa-RIP3-FADD_{KO}-Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät (5×10^4 Zellen/Well) und am nächsten Tag mit Nec-1 (90 μM), zVAD (20 μM) oder Nec-1 und zVAD für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurden 5×10^4 Zellen der Zelllinien CHO, CHO-memTNFΔ1-12, HEK293-Flp-In-EV, sowie -mem(sc)LTα₂β und -mem(sc)LTα₂β₂ hinzugegeben. Nach Kultivierung über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ wurde die einzelnen Ansätze mit der Sterblichkeitskontrolle (Tox) verglichen und mikroskopisch dokumentiert. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Vergrößerung 40x.

Durch Kristallviolettffärbung der verbleibenden Zellen konnte anschließend gezeigt werden, dass die Kokultivierung mit CHO-memTNF Δ 1-12-Zellen, als auch HEK293-Flp-In-mem(sc)LT α β - Zellen zu einer signifikanten Reduzierung der Vitalität führt, welche durch die Hinzugabe von zVAD nicht verhindert werden konnte. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass CHO-memTNF Δ 1-12- und HEK293-Flp-In-mem(sc)LT α β -Zellen keine Apoptose in HeLa-RIP3-FADD $_{KO}$ -Zellen einleiten. Das Absterben der Zielzellen konnte jedoch durch die Hinzugabe von Nec-1 verhindert werden, was belegt, dass das Sterben der Zellen durch Nekroptose erfolgte (Abbildung 6.21).

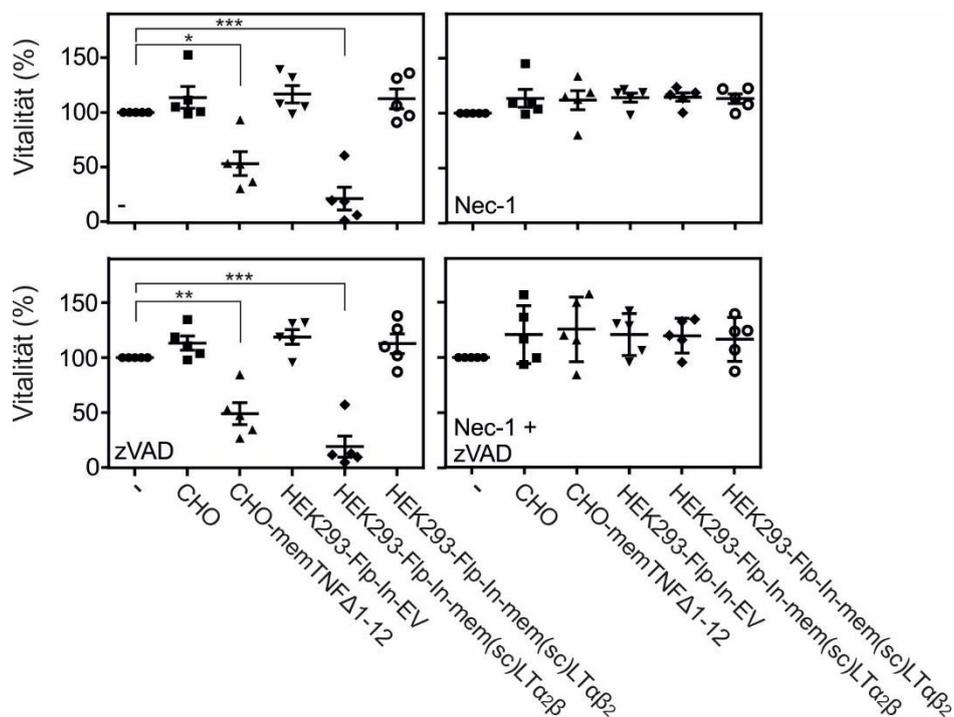


Abbildung 6.21: Mem(sc)LT α β induziert Nekroptose in HeLa-RIP3-FADD $_{KO}$ -Zellen.

HeLa-RIP3-FADD $_{KO}$ -Zellen (5×10^4 Zellen/Well) wurden mit stabil exprimierenden memTNF (CHO-memTNF Δ 1-12), sowie HEK293-Flp-In-mem(sc)LT α β und -mem(sc)LT α β $_2$ und deren Kontrollzellen im Verhältnis von 1:1 für 18 h stimuliert. Anhand von Vorinkubation (30 min) mit Necrostatin-1 (Nec-1; 90 μ M), zVAD (20 μ M) oder Nec-1 + zVAD wurde die Aktivierung der nekroptotischen Signalwege durch die Kokulturzellen untersucht. Mittels Kristallviolettffärbung der Zellen wurden die Sterblichkeitsrate der einzelnen Kokulturen bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software PRISMA. Hierbei wurde die Funktion ANOVA mit dem Bonferroni-Vergleich von den möglichen Paarkombination verwendet. Dargestellt sind die Ergebnisse von fünf voneinander unabhängigen Experimenten. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,1$; ns nicht-signifikant

Des Weiteren wurde die Phosphorylierung von RIPK1 an der Aminosäure S166 untersucht, welches ein Kennzeichen für die nekroptotische Signalkaskade darstellt (96,98,99). Wie zu erwarten wies die Stimulation mit memTNF und mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ eine starke Phosphorylierung von RIPK1 auf, während die Kontrollzellen im Vergleich zu den unstimulierten HeLa-RIP3-FADD_{KO}-Zellen keine entsprechende RIPK1-Phosphorylierung aufwiesen (Abbildung 6.22).

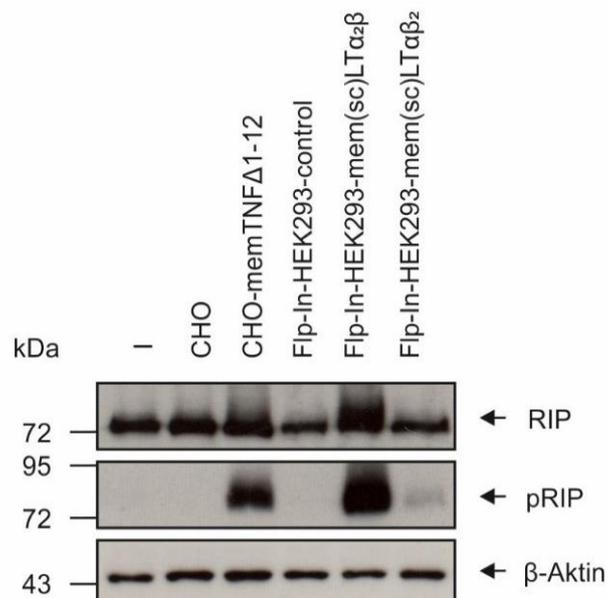


Abbildung 6.22: Mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ induziert die Phosphorylierung von RIP in HeLa-RIP3-FADD_{KO}-Zellen.

1x10⁶ HeLa-RIP3-FADD_{KO}-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit zVAD (20 μ M) und stabil memTNF, mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ und mem(sc)LT $\alpha_2\beta_2$ exprimierenden Zellen im Verhältnis von 1:1 für 8 h stimuliert, anschließend lysiert und anhand von Western Blots auf die angegebenen Proteine analysiert. β -Aktin diente hierbei als Ladekontrolle. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

TNF inhibierende Medikamente finden bereits breit im Gesundheitswesen ihren Einsatz. Neben Infliximab, Adalimumab, Certolizumab pegol oder Golimumab ist Etanercept momentan für die Behandlung von rheumatischer Arthritis zugelassen. Dieses Medikament ist ein Fusionsprotein der Ektodomäne von TNFR2 und dem Fc-Anteil des IgG1-Antikörpers (100-102). Im Gegensatz zu den anderen zugelassenen Medikamenten, welche spezifisch gegen lösliches, als auch membranständiges, TNF

wirken, ist bei Etanercept auch eine spezifische inhibitorische Wirkung von $LT\alpha$ bekannt ⁽¹⁰³⁾. Anhand dessen, dass bereits gezeigt werden konnten, dass $mem(sc)LT\alpha_2\beta$ sowohl die Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 mit TNF, als auch mit $LT\alpha$ teilt, liegt es nahe, dass Etanercept auch die Wirkung von $mem(sc)LT\alpha_2\beta$ inhibieren kann. Um dies zu untersuchen, wurden HeLa- und HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}-Zellen mit löslichem rekombinanten humanen TNF, $LT\alpha$, den HEK293-Flp-In-EV- Zellen, sowie den stabil exprimierenden $mem(sc)LT\alpha_2\beta$ -Zellen in An- und Abwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen von Etanercept stimuliert/kokultiviert und die IL8-Produktion untersucht (Abbildung 6.23). Hierbei zeigte sich, dass Etanercept wie bereits bekannt, an TNF und $LT\alpha$ bindet und somit die Aktivierung des TNFR1 in HeLa-Zellen, als auch die Aktivierung des TNFR2 in HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}-Zellen verhindert. Die Kokultivierung mit den Kontrollzellen (EV) oder der unterschiedlichen Etanerceptkonzentrationen zeigten keinen Einfluss auf die Zielzellen HeLa oder HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}. Bei der Kokultivierung ohne Hinzugabe von Etanercept mit $mem(sc)LT\alpha_2\beta$ -Zellen zeigte sich eine starke IL8-Induktion in HeLa-Zellen, sowie in HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}-Zellen. Steigende Konzentrationen an Etanercept sowohl in HeLa, als auch in HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}-Zellen führte zu einer Verringerung der IL8-Produktion und belegt somit eine inhibitorische Wirkung von Etanercept auch auf $mem(sc)LT\alpha_2\beta$.

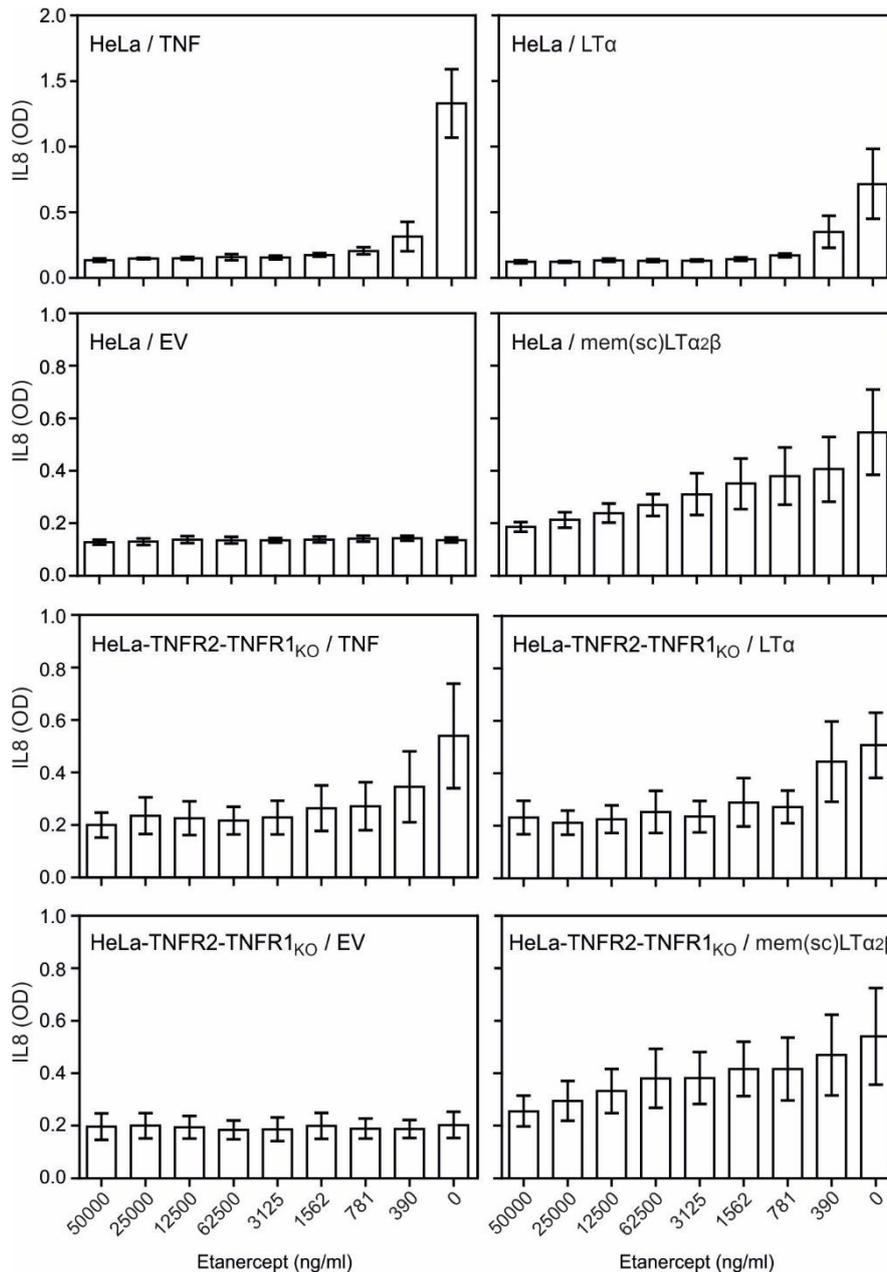


Abbildung 6.23: *LT α , TNF und mem(sc)LT α 2 β werden durch Etanercept inhibiert.*

HeLa- und HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}-Zellen (5×10^4 Zellen/Well) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Etanercept vorinkubiert und anschließend mit löslichem humanem rekombinanten TNF (50 ng/ml), löslichem LT α (50 ng/ml), den HEK293-Flp-In-EV Kontrollzellen oder mem(sc)LT α 2 β – Zellen im Verhältnis von 1:1 für 18 h bei 37°C stimuliert. Die IL8-Produktion wurde anschließend anhand eines IL8-ELISAs untersucht und mittels der Software PRISM analysiert. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

6.4. Mem(sc)LT $\alpha_2\beta$, sowie mem(sc)LT $\alpha\beta_2$ aktivieren MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*)-Expression in murinen Zellen

Aufgrund der wichtigen Rolle von TNFR1 und TNFR2 in der Entwicklung von u.a. Immunerkrankungen, ist die Charakterisierung von LT $\alpha_2\beta$ bezüglich dieser Rezeptoren ein möglicher essentieller Bestandteil in der Entwicklung von Therapiemöglichkeiten. Um in Zukunft eine tiefergehende Charakterisierung in präklinischen Modellen zu ermöglichen, wurde mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ hinsichtlich ihrer Eigenschaften auf murine Zellen untersucht. Da bereits für LT $\alpha\beta_2$ herausgefunden wurde, dass dieses sowohl membranständig als auch löslich vorliegen kann, stellte sich desweiteren die Frage, inwieweit sich die Funktionalität von löslichem zu membranständigem LT $\alpha_2\beta$ unterscheidet.

Bereits anhand der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ an die humanen Rezeptoren TNFR1, TNFR2 und LT β R binden kann. Dadurch kommt es zur TNFR1- und TNFR2-Aktivierung, insbesondere Apoptose, Nekroptose und induzierten IL8- Expression. Hierdurch konnte bewiesen werden, dass mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ ein neuer Agonist von TNFR2 ist. Um zu untersuchen, ob humanes LT $\alpha_2\beta$ in mausbasierten Modell einsetzbar ist, wurde die murine Duktale Pankreaskarzinomzelllinie Panc02 ⁽¹⁰⁴⁾ für erste Experimente verwendet. Diese Zelllinie exprimiert neben murinen TNFR1 und TNFR2 ⁽¹⁰⁵⁾ auch den murinen LT β R endogen ⁽¹⁰⁶⁾ (Abbildung 6.24).

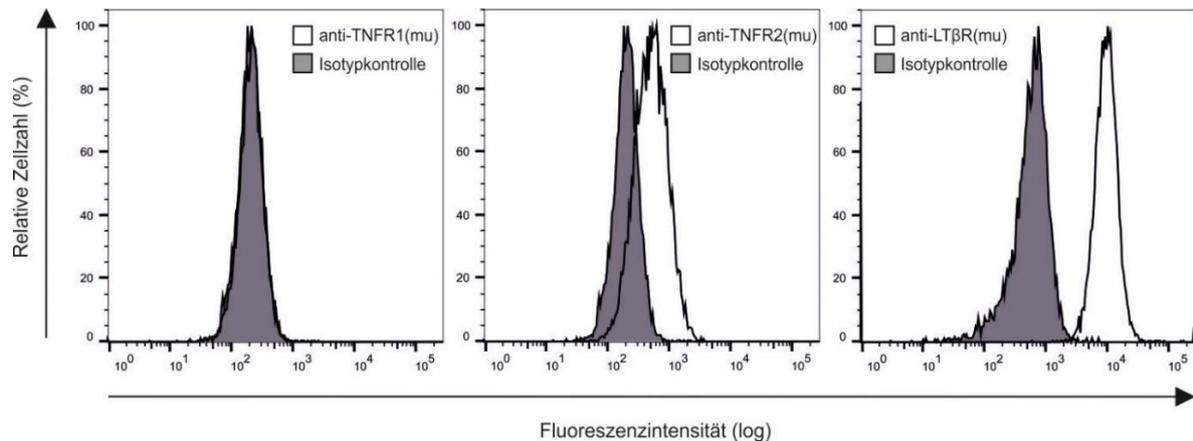


Abbildung 6.24: Expression von TNFR1, TNFR2 und LTβR in murinen Panc02

Panc02-Zellen wurden für 1 h bei 4°C mit PE-markierten Antikörpern gegen den murinen TNFR1 (TNFR1(mu)) und murinen TNFR2 (TNFR2(mu)), einem APC-markierten Antikörper gegen den murinen LTβR (LTβR(mu)) oder entsprechenden Isotypkontrollen inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Für die Untersuchung der funktionellen Eigenschaften der humanen mem(sc)LTαβ-Konstrukte auf murine Zellen, wurden Panc02-Zellen mit den stabil exprimierenden HEK293-Flp-In-mem(sc)LTα₂β, -mem(sc)LTαβ₂ und deren Kontrollzellen (EV) kokultiviert und anschließend auf Expression von murinem MCP-1 untersucht. MCP-1 gehört zu der Familie der CC-Chemokine und ist ein Schlüsselchemokin welches die Migration und Infiltration von Monozyten und Makrophagen reguliert (¹⁰⁷). Anhand der MCP-1-Expression der Panc02-Zellen konnte eine aktivierende Wirkung von mem(sc)LTα₂β, als auch von mem(sc)LTαβ₂ detektiert werden. Sowohl die Erhöhung der Zellzahl von mem(sc)LTα₂β, als auch mem(sc)LTαβ₂ führte zu einer Erhöhung der MCP-1-Konzentration (Abbildung 6.25). Durch die nicht vorhandene MCP-1-Induktion in den Kokulturen mit den HEK293-Flp-In-EV-Zellen konnte gezeigt werden, dass die MCP-1 Induktion auf die Interaktion der Panc02-Zellen mit mem(sc)LTα₂β- und mem(sc)LTαβ₂-Zellen zurückzuführen ist und nicht aufgrund der Kokultivierung der beiden Zelltypen per se zustande kam.

Hierdurch konnte gezeigt werden, dass mem(sc)LTαβ-Konstrukte auch in murinen Modellen einsetzbar sind und diese weiterführende Experimente ermöglichen.

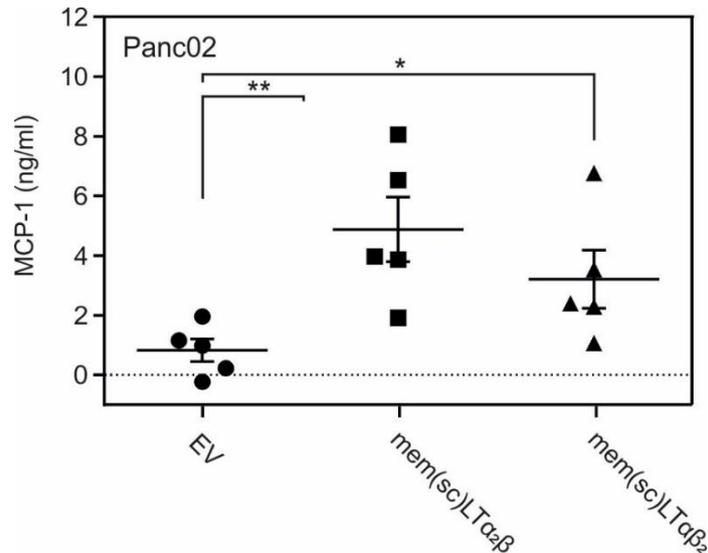


Abbildung 6.25: Mem(sc)LTα₂β sowie mem(sc)LTα₂β₂ aktivieren MCP-1 in Panc02.

Panc02-Zellen wurden in 96-Well-Platten mit 2×10^4 -Zellen/Well ausgesät. Am nächsten Tag wurden diese mit HEK293-Flp-In-EV, -mem(sc)LTα₂β und -mem(sc)LTα₂β₂ im Verhältnis von 1:1 für 18 h kokultiviert. Anschließend wurde die MCP-1-Expression mittels eines MCP-1-ELISAs bestimmt. Statistische Auswertungen wurden mittels der Software PRISM durchgeführt. Hierbei wurde die Funktion ANOVA mit dem Bonferroni-Vergleich von den möglichen Paarkombinationen verwendet. Dargestellt sind die Ergebnisse von fünf voneinander unabhängigen Experimenten. ** $p < 0,01$; * $p < 0,1$; ns nicht-signifikant

6.5. Lösliches (sc)LTα₂β (=s(sc)LTα₂β) aktiviert TNFR1 und TNFR2 vergleichsweise wie TNF

Wie bereits für LTα und TNF bekannt ist, binden beide Liganden mit hoher Affinität sowohl an TNFR1 als auch an TNFR2⁽⁵³⁾, jedoch wird nur der TNFR1 durch lösliches TNF oder LTα aktiviert, während TNFR2 inaktiv bleibt⁽¹⁰⁸⁾. Wie bereits gezeigt, kann mem(sc)LTα₂β an TNFR1 und TNFR2 binden und diese aktivieren. Um nun zu untersuchen, ob diese Heterotrimeren auch in ihrer löslichen Form aktiv sind, wurden lösliche „single-chain“-Konstrukte von LTα₂β und zum Vergleich mit den anderen beiden LTα-enthaltenen Trimeren, auch von LTα und LTαβ₂ generiert. Durch die Fusionierung mit einem GpL-Tag können diese löslichen Konstrukte auch auf ihre Fähigkeit an die Rezeptoren zu binden, untersucht werden (Abbildung 6.26).

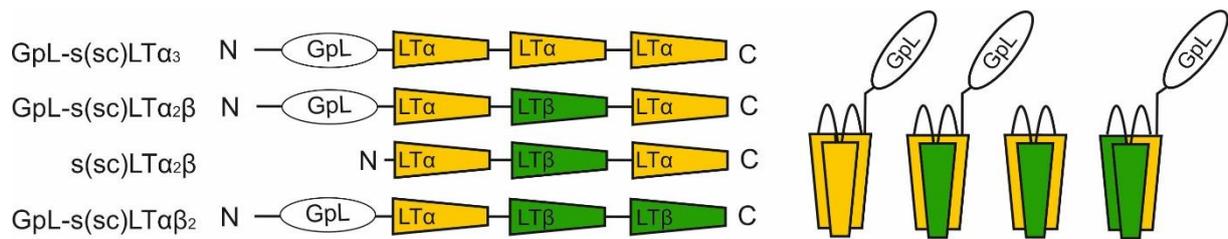


Abbildung 6.26: Schema einzelkettige (single chain = sc) lösliche LTαβ-Konstrukte

Lösliche (sc)LTαβ-Varianten wurden durch Fusionierung der löslichen LTβ extrazellulären (=ed) Domäne und von löslichen LTα ohne dessen Signalsequenz generiert. Hierfür wurden drei LTα Protomere zu (sc)LTα, zwei LTα Protomere mit einem LTβed Protomere zu (sc)LTα₂β und ein LTα Protomer mit zwei LTβed-Protomeren zu (sc)LTαβ₂ durch Linkersequenzen miteinander verknüpft. Für die Untersuchung anhand Bindungsstudien, wurden die (sc)-Konstrukte an ihrem N-Terminus mit einer *Gaussia princeps* Luziferase fusioniert. Durch die Linkersequenzen lagern sich die Protomere zu den gewünschten Homo- bzw. Heterotrimeren zusammen.

Die mit GpL-fusionierten löslichen (sc)-Trimere (soluble = s(sc)) wurden zunächst anhand von Bindungsstudien untersucht (Abbildung 6.27). Wie bereits anhand der membranständigen Trimere herausgefunden, konnte auch für GpL-s(sc)LTαβ₂ nur eine Bindung an LTβR beobachtet werden, während GpL-s(sc)LTα₃ und GpL-s(sc)LTα₂β sowohl an TNFR1, als auch TNFR2 banden. Zusätzlich konnte für GpL-s(sc)LTα₂β, wie bereits für die membranständige Varianten, eine Bindung an LTβR festgestellt werden. Anhand der Bindungsstudie konnte des weiteren sowohl für die Bindung an TNFR1-GPI, als auch für die Bindung and TNFR2-GFP eine verstärkte Bindung von GpL-s(sc)LTα₂β zu GpL-s(sc)LTα₃ detektiert werden. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass GpL-s(sc)LTα₂β und GpL-s(sc)LTα₃ unterschiedlich an die gemeinsamen Rezeptoren binden. Es ist zu erkennen, dass mehr von den GpL-s(sc)LTα₂β-Trimeren von den Rezeptoren gebunden werden können. Dies lässt vermuten, dass ein GpL-s(sc)LTα₂β-Trimer nicht die Interaktion mit drei Rezeptormolekülen benötigt um eine Bindung einzugehen.

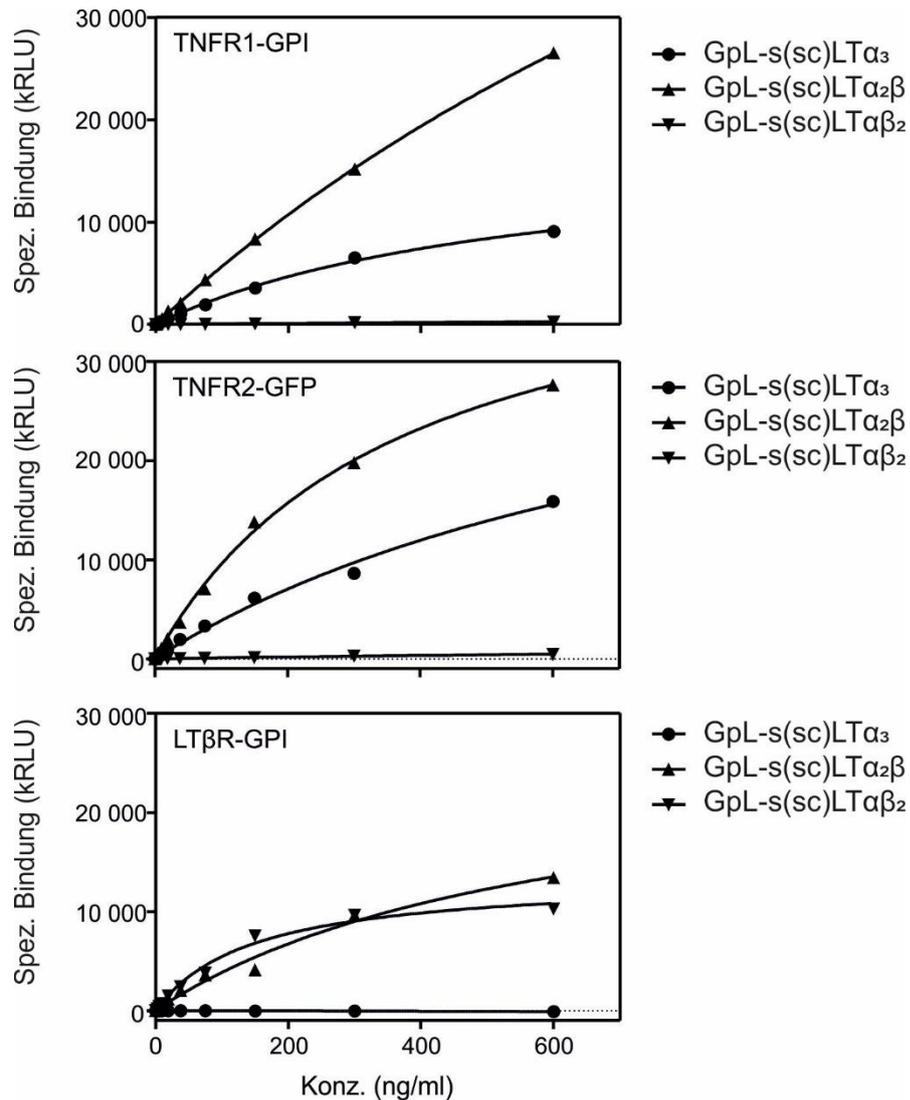


Abbildung 6.27: Bindungseigenschaften von GpL-s(sc)LTα₃, -s(sc)LTα₂β, -s(sc)LTαβ₂ an transient TNFR1-, LTβR-GPI und TNFR2-GFP exprimierende Zellen.

Transient transfizierte HEK293T-Zellen für EV, TNFR1-GPI, TNFR2-GFP und LTβR-GPI wurden für 1 h bei 37°C mit Zellüberständen von GpL-s(sc)LTα₃, GpL-s(sc)LTα₂β, GpL-s(sc)LTαβ₂ inkubiert. Nach Entfernen von überschüssigen Liganden durch waschen mit PBS, wurde die *Gaussia princeps* Luziferaseaktivität der gebundenen Liganden gemessen und deren spezifische Bindung miteinander verglichen.

Für lösliche s(sc)LTα₂β und s(sc)LTαβ₂ Moleküle stellt sich hierbei die Frage, inwieweit eine über Trimerisierung hinausgehende Oligomerisierung vorliegt und inwiefern diese Oligomerisierung zu „homotrimeren“ Domänen führen kann.

Vor allem für TNFRSF-Rezeptoren, die nur durch membranständige Trimere aktiviert werden, so wie im Fall von TNFR2⁽¹⁰⁸⁾, ist es interessant zu untersuchen, inwiefern s(sc)LTα₂β, als reiner Trimer oder aggregierter Oligomer vorliegt und dieses

Auswirkungen auf die Aktivierungsfähigkeit der Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 hat. Hierfür wurde anhand einer präparativen Gelfiltration aufgereinigtes s(sc)LT $\alpha_2\beta$ auf das Vorhandensein von Oligomeren und Trimeren untersucht (Abbildung 6.28). Anhand der Gelfiltration konnte eine starke Bildung an Oligomeren beobachtet werden. Zum Einen liegt hierdurch der Großteil der s(sc)LT $\alpha_2\beta$ -Trimere als membranständig-imitierende Form vor, zum Anderen kann hierdurch nicht ausgeschlossen werden, dass sich reine Homotrimere-Bindungsstellen bilden. Um nun erste Eindrücke über die Wirkungsweise einzelner s(sc)LT $\alpha_2\beta$ Trimeren zu untersuchen, wurden die Fraktionen der Oligomere und der reinen Trimere gesammelt. Nach Überprüfung der Reinheit bezüglich Trimeren und Oligomeren (Abbildung 6.28) wurden diese auf ihre Funktionalität getestet (Abbildung 6.29).

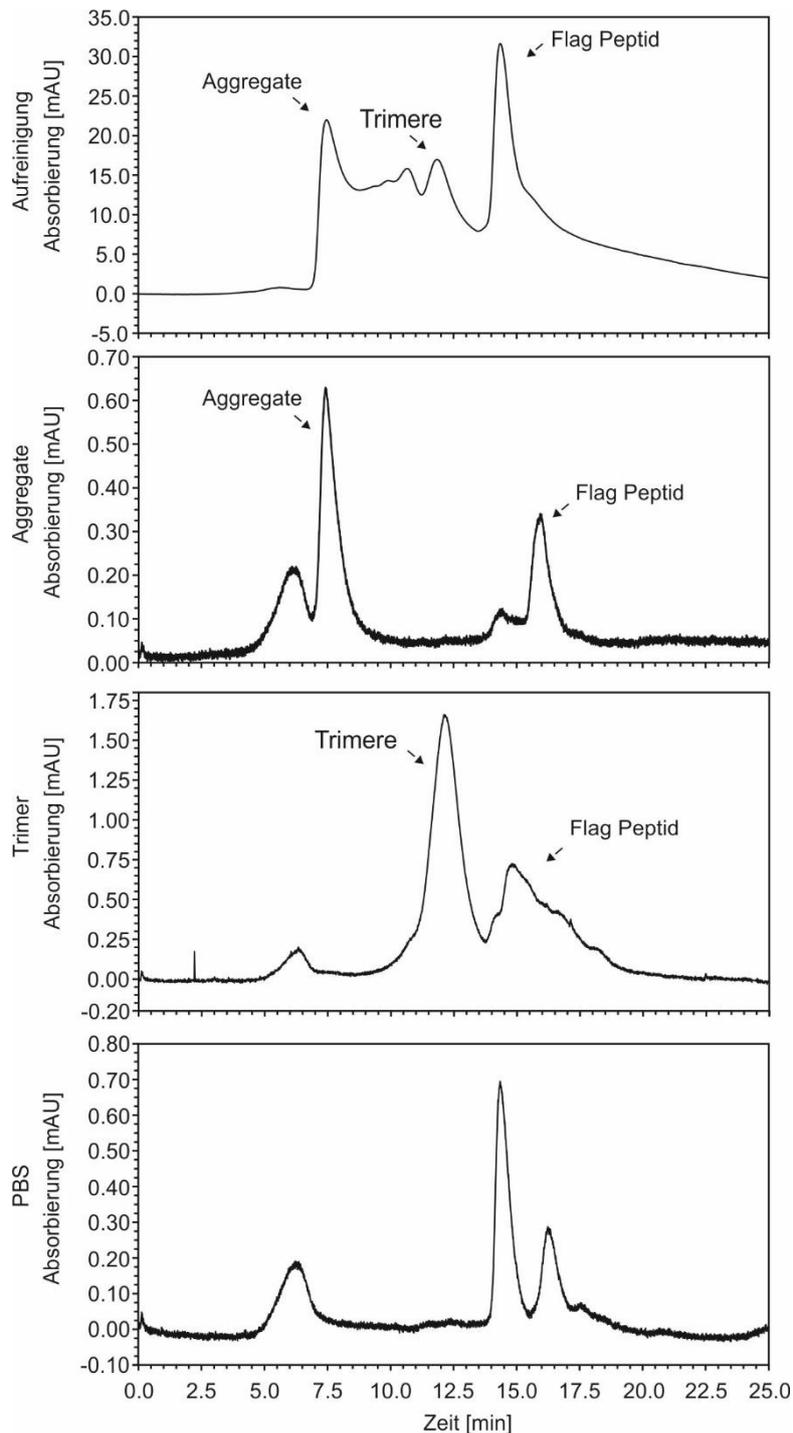


Abbildung 6.28: HPLC Graphen von $s(sc)LT\alpha_2\beta$.

Aufgereinigtes lösliches $(sc)LT\alpha_2\beta$ (soluble = $s(sc)LT\alpha_2\beta$) liegt sowohl als aggregierte Trimere, als auch einzelne Trimere in Zellüberständen vor. Durch Auftragung des aufgereinigten Proteins konnten aggregierte Trimere und reine „Trimere“ in Fraktionen aufgetrennt und in Pools zusammengeführt werden. Überzählige Ausschläge bei der HPLC-Analyse sind sowohl auf das zum Aufreinigen verwendete Flag-Peptid, als auch auf PBS zurückzuführen und wurden als Hintergrundsignal behandelt. Dargestellt ist eine repräsentative Aufreinigung von zwei voneinander unabhängigen Aufreinigungen. Technische Hilfe bei der Bedienung der HPLC wurde durch Tengyu Zhang bereitgestellt.

Sowohl aggregierte als auch monomere $s(sc)LT\alpha_2\beta$ -„Trimere“ wurden auf ihre aktivierende Wirkung von TNFR1 und TNFR2 durch Stimulation von HeLa und HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}-Zellen und der resultierenden IL8 Expression untersucht. Sowohl die aggregierten $s(sc)LT\alpha_2\beta$ -Trimere, als auch die monomeren „Trimere“ zeigten eine vergleichbare TNFR1-Aktivierung der HeLa-Zellen. Interessanterweise war dies nicht der Fall bei HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO}-Zellen. Hier konnte beobachtet werden, dass nur die Oligomere von $s(sc)LT\alpha_2\beta$ eine aktivierende Wirkung auf den TNFR2 besaßen, die Stimulation mit den reinen „Trimeren“ zeigte eine stark verringerte bzw. eine marginale Wirkung auf den TNFR2 (Abbildung 6.29). Dies zeigt, dass zur Aktivierung von TNFR2 durch $LT\alpha_2\beta$, dieses als membranständig bzw. aggregierte und somit membranständig-imitierende Trimere vorliegen müssen. Desweiteren zeigt sich hierbei bereits, dass $s(sc)LT\alpha_2\beta$ -Trimere in ihrer Wirkungsweise eher vergleichbar mit der Funktionalität von TNF als der Funktionalität von $LT\alpha$ sind.

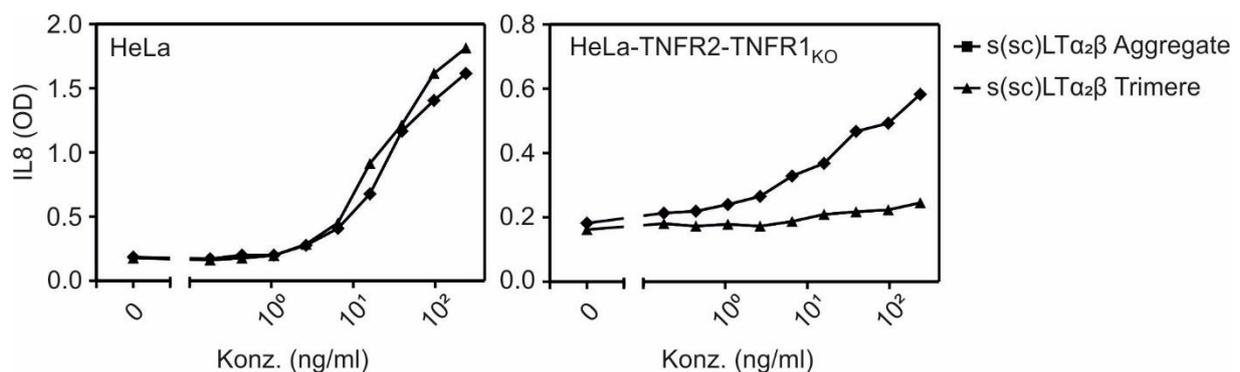


Abbildung 6.29: $s(sc)LT\alpha_2\beta$ -Oligomeren können TNFR2 aktivieren.

IL8-ELISA von $s(sc)LT\alpha_2\beta$ Oligomeren und Trimeren. Zur Untersuchung der Aktivität von löslichen (sc) $LT\alpha_2\beta$ Trimeren und den membranständig-imitierenden aggregierten Oligomeren auf TNFR1 und TNFR2, wurden HeLa und HeLa-TNFR2-TNFR1_{KO} mit aggregierten $s(sc)LT\alpha_2\beta$ als auch mit $s(sc)LT\alpha_2\beta$ Trimeren für 18 h bei 37°C stimuliert und daraufhin auf ihre IL8-Produktion untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von fünf voneinander unabhängigen Experimenten.

7. Diskussion

Der Tumor Nekrose Faktor nimmt eine Schlüsselrolle unter den proinflammatorischen und immunregulatorischen Zytokinen ein. Über die Bindung an seine zwei Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2, kann TNF entweder den Zelltod und die Inflammation einleiten oder zur Zellproliferation und dem Zellüberleben beitragen aber auch anti-inflammatorisch wirken. Aufgrund seines weiten Spektrums an Aufgaben führt die Dysregulation von TNF unter anderem zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen. Dies ist auch der Grund weshalb die Interaktion von TNF-TNFR1 und TNF-TNFR2 ein wichtiger Ansatzpunkt für die Entwicklung von Therapiemöglichkeiten darstellt.

Neben TNF kann auch das TNF-Homolog $LT\alpha$, auch als $TNF\beta$ bezeichnet, TNFR1 und TNFR2 binden. Forschungsergebnisse zeigten bereits, dass $LT\alpha$ ein ähnliches Potential zur Aktivierung von TNFR1 besitzt wie lösliches TNF (¹⁰⁹). $LT\alpha$ kann auch $LT\alpha\beta_2$ -Heteromere bilden, die den $LT\beta R$ aktivieren, der für die Bildung von lymphoiden Organen wichtig ist. Dadurch ist es nicht verwunderlich, dass $LT\alpha$ eine zentrale Rolle in der Inflammation, der Abwehr von Pathogenen oder bei der Entwicklung der EAE und der RA inne hat. Die initialen Studien zu $LT\alpha$ zeigten, dass auch das $LT\alpha_2\beta$ -Heterotrimer an den TNFR1 binden kann. Jedoch wurde nicht getestet, ob dieses Heterotrimer ebenfalls die Fähigkeit hat TNFR1 zu aktivieren und auch andere Eigenschaften von $LT\alpha$, wie z.B. die Bindung von TNFR2, aufweist. Diese Charakteristiken wurden in dieser Arbeit untersucht.

7.1. Bindung von $LT\alpha_2\beta$ an TNFR1, TNFR2 und $LT\beta R$ im Vergleich zu $LT\alpha\beta_2$

Homotrimere besitzen durch ihren symmetrischen Aufbau dreimal denselben Interaktionsbereich für Rezeptoren. Hierbei bindet ein Rezeptormolekül an jeden Interaktionsbereich des Ligandentrimers, wodurch es zu einem Ligand-Rezeptor-Komplex aus drei Ligandenmolekülen und drei Rezeptormolekülen kommt. Seit den 90er Jahren ist bereits bekannt, dass $LT\alpha$ an die Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 bindet. Es wurde herausgefunden, dass $LT\beta$ -Homotrimere instabil und funktionell inaktiv vorliegt (^{69,70}). Die Inaktivität des $LT\beta$ -Homotrimers konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (Abbildung 6.2B). Aufgrund der Instabilität bzw. Inaktivität des $LT\beta$ -

Homotrimers wurde nach einem Liganden für den $LT\beta R$ gesucht. Hierbei wurde festgestellt, dass die THD der $LT\alpha$ - und $LT\beta$ -Moleküle miteinander gemischte Trimere, sogenannte Heterotrimere, bilden können. Bei diesen Heterotrimeren lagern sich entweder zwei $LT\alpha$ -Protomere und ein $LT\beta$ -Protomer ($LT\alpha_2\beta$) zusammen oder aber umgekehrt ein $LT\alpha$ -Protomer mit zwei $LT\beta$ -Protomeren ($LT\alpha\beta_2$). Innerhalb dieser Konstellationen kommt es zu einer Asymmetrie wodurch die Heterotrimere drei unterschiedliche Rezeptorinteraktionsstellen aufweisen. Die zwei verschiedenen Homotrimere $LT\alpha_2\beta$ und $LT\alpha\beta_2$ besitzen entweder die homomere Bindungsstelle $\alpha\alpha'$ ($LT\alpha_2\beta$) oder $\beta\beta'$ ($LT\alpha\beta_2$) und jeweils die heteromeren Bindungsstellen $\alpha\beta$ und $\beta\alpha$ (Abbildung 7.1).

Im Vergleich mit $LT\alpha$ -Homotrimeren bindet $LT\alpha\beta_2$ nicht an TNFR1 und TNFR2, wohingegen für $LT\alpha_2\beta$ eine starke Bindung an diese Rezeptoren detektiert wurde (Abbildung 6.13). Während $LT\alpha\beta_2$ und $LT\alpha$ keine übereinstimmende Rezeptorinteraktionsstelle haben, unterscheiden sich die Heterotrimere $LT\alpha_2\beta$ und $LT\alpha\beta_2$ nur in ihrer homomeren Bindungsstelle. Aufgrund dessen, dass $LT\alpha\beta_2$ nicht an den TNFR1 und TNFR2 bindet, kann davon ausgegangen werden, dass für die Bindung an TNFR1 und TNFR2 die homomere Bindungsstelle $\alpha\alpha'$ zur Interaktion präferiert wird und notwendig ist (Abbildung 7.1).

Bezüglich der Bindung von Liganden und Rezeptoren der TNFRSF wird seit den 90er Jahren angenommen, dass sie sich in einem Verhältnis von 3:3 (Ligandenmoleküle : Rezeptormoleküle) zusammenlagern^(17,34). So wurde herausgefunden, dass bei den $LT\alpha$ /TNFR1- und TRAIL/TRAILR2-Paarungen die Bindung von einem Rezeptormolekül sehr stabil und hoch affin ist. Für das zweite und dritte gebundene Rezeptormolekül ist dies jedoch nicht mehr der Fall. Je mehr Interaktionsstellen besetzt sind, desto niedriger affin wird die Bindung des nächsten Rezeptormoleküls und desto schneller dissoziiert dieses wieder^(110,111). Es sind jedoch bereits mehrere Liganden-Rezeptoren-Paarungen bekannt, bei denen dieses 3:3 Verhältnis nicht zutrifft. So wurde für CD40L/CD40 und LIGHT/ $LT\beta R$ gezeigt, dass jeweils nur zwei Rezeptormoleküle an ein Ligandentriemer binden^(33,112), während die dritte Interaktionsstelle des Ligandentrimers nicht besetzt wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mehr $LT\alpha_2\beta$ -Trimere durch TNFR2 und TNFR1 gebunden werden können, verglichen mit $LT\alpha$ (Abbildung 6.27). Dies lässt darauf schließen, dass für $LT\alpha_2\beta$ bereits die Bindung von einem Rezeptormolekül an die Interaktionsstelle $\alpha\alpha'$

ausreicht, um eine stabile Bindung zu erzielen. Da $LT\alpha\beta_2$ nicht an TNFR1 und TNFR2 bindet, kann davon ausgegangen werden, dass auch $LT\alpha_2\beta$ nicht über die beiden heteromeren Interaktionsstellen ($\alpha\beta$ und $\beta\alpha$) eine Bindung mit TNFR1 und TNFR2 eingeht. Man kann desweiteren schlussfolgern, dass in diesem Fall die Stöchiometrie im Verhältnis von 3:1 (Ligandenmolekül : Rezeptormolekül) genügt, um eine Aktivierung zu ermöglichen.

Neben der Bindung von $LT\alpha_2\beta$ an TNFR1 und TNFR2 konnte auch eine Bindung an den $LT\beta R$ beobachtet werden. Untersuchungen der Bindung von sc-Konstrukten von $LT\alpha\beta_2$ an $LT\beta R$ und Strukturanalysen der Interaktionskomplexe zeigten bereits, dass für die Interaktion von $LT\alpha\beta_2$ mit dem $LT\beta R$ zwei der drei unterschiedlichen Interaktionsoberflächen verantwortlich sind. Zum Einen binden $LT\beta R$ -Moleküle an die homomere Interaktionsstelle $\beta\beta'$ und zum Anderen an die $\alpha\beta$ -Interaktionsstelle. Mutationen in einer der beiden Interaktionsstellen können die Bindungsfähigkeit mindern. Fehlen beide Interaktionsstellen zeigt sich keine Bindung. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass $LT\beta R$ -Moleküle mit einer geringen Affinität an die $\beta\beta'$ -Interaktionsstelle binden, aber mit einer hohen Affinität mit der $LT\alpha$ - $LT\beta$ -Interaktionsstelle interagieren. Für $LT\alpha\beta_2$ wurde bereits gezeigt, dass die Störung von einer der beiden aktiven Interaktionsstellen zur Inaktivierung der Signaltransduktion des NF κ B-Signalweges führt ⁽⁴⁰⁾. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es nicht verwunderlich, dass $LT\alpha_2\beta$ an den $LT\beta R$ binden kann, da dieses Heterotrimer dieselben $\alpha\beta$ und $\beta\alpha$ -Interaktionsbereiche wie $LT\alpha\beta_2$ besitzt. Für die Aktivierung des NF κ B-Signalweges über den $LT\beta R$ ist eine Dimerisierung durch Bindung an die $\alpha\beta$ - und $\beta\beta'$ -Interaktionsstelle des Liganden notwendig. Es lässt sich schlussfolgern, dass $LT\alpha_2\beta$ an den $LT\beta R$ binden, ihn jedoch aufgrund der fehlenden $\beta\beta'$ -Interaktionsstelle nicht aktivieren kann (Abbildung 7.1).

Analysen aus den 90er Jahren zeigten bereits, dass bei der Bildung von $LT\beta$ - $LT\alpha$ -Heterotrimeren die Bildung des $LT\alpha\beta_2$ Heterotrimers präferiert wird und $LT\alpha_2\beta$ als Minderheit vorliegt ^(23,85). Da $LT\alpha_2\beta$ an den $LT\beta R$ bindet, ihn höchstwahrscheinlich jedoch nicht aktivieren kann, ist es interessant herauszufinden, ob dieses Heteromer auch bei der Regulation der $LT\beta R$ -Aktivierung eine Rolle spielt.

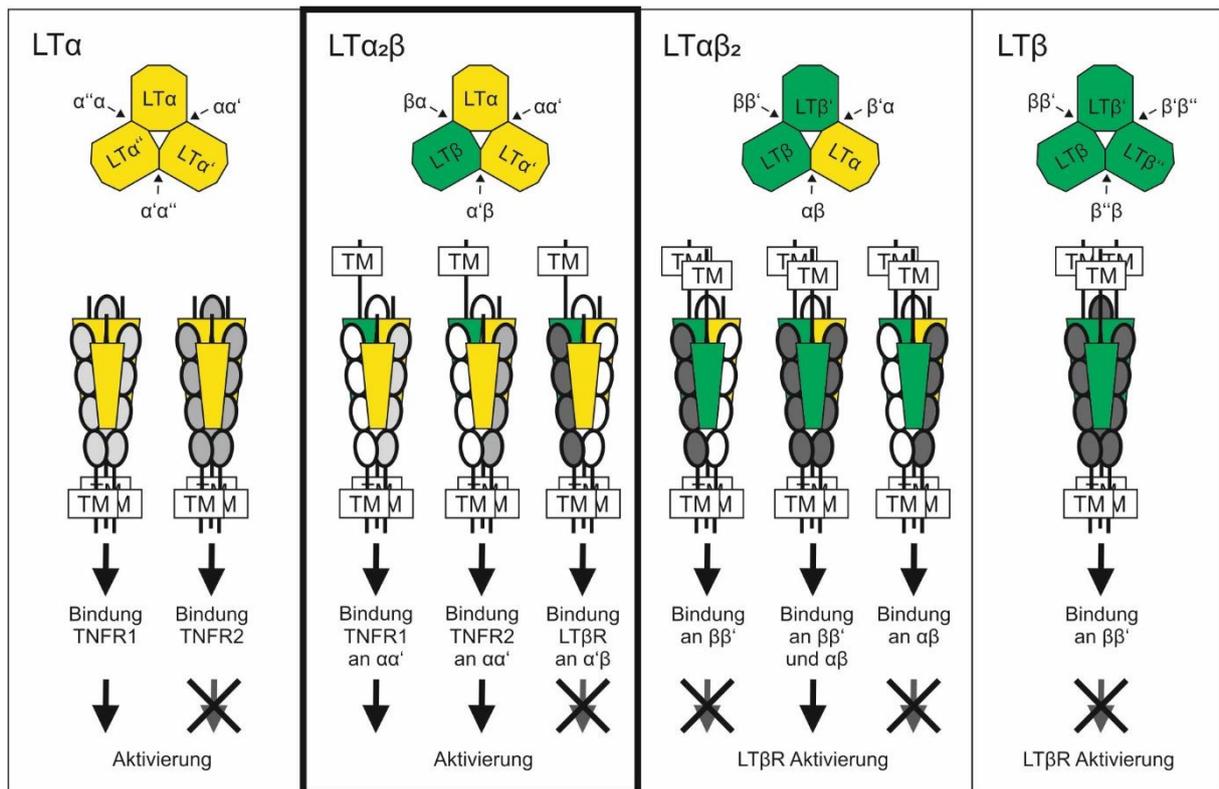


Abbildung 7.1: Schema der Interaktion zwischen $LT\alpha$, $LT\alpha_2\beta$, $LT\alpha\beta_2$, $LT\beta$ mit ihren Rezeptoren.

Das Schema zeigt die möglichen Trimerisierungen von $LT\alpha$ (gelb)- und membranständigen $LT\beta$ (grün)-Protomeren mit ihren Interaktionsstellen. Dargestellt sind die möglichen Bindungen der membranständigen Rezeptormoleküle von TNFR1 (hellgrau), TNFR2 (grau) und $LT\beta R$ (dunkelgrau) und deren Notwendigkeit zur Rezeptoraktivierung. Weiße Rezeptormoleküle verdeutlichen nicht besetzte Interaktionsstellen. Erkenntnisse dieser Dissertation sind durch schwarze Umrandung hervorgehoben.

7.1. Aktivierung von TNFR1 und TNFR2 durch $LT\alpha_2\beta$

TNFR1 und TNFR2 sind Vertreter der zwei größeren Untergruppen der TNFRSF. TNFR1 besitzt eine Todesdomäne und gehört zur Untergruppe der Todesrezeptoren. Diese besitzen aufgrund ihrer konservierten Todesdomäne die Fähigkeit Zelltod-assoziierte Signalwege zu aktivieren. TNFR2 hingegen zählt zu der Untergruppe der TRAF-interagierenden TNFRSF Rezeptoren. Aufgrund der fehlenden Todesdomäne kann TNFR2 nicht direkt die Zelltod-assoziierten Signalwege aktivieren. Indirekt kann dies dennoch geschehen, da eine TNFR2-Aktivierung zur Stimulation des NF κ B-Signalwegs und der Aktivierung von diversen Kinasen führt. Dies kann zur Folge

haben, dass TNF produziert wird, wodurch es zur Aktivierung des TNFR1 und schließlich zur Stimulation von Zelltod-assoziierten Signalwegen kommt (^{57,89}).

Neben ihren unterschiedlichen Aktivitäten haben TNFR1 und TNFR2 auch unterschiedliche Aktivierungsmechanismen durch ihre Liganden. Studien zeigten, dass TNF sowohl als membranständiger, als auch als löslicher Ligand an seine Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 bindet (^{34,89}). Trotz der hohen Bindungsaffinität von löslichem und membranständigem TNF für TNFR1 und TNFR2, konnte jedoch nur membranständiges TNF den TNFR2 robust aktivieren, während sowohl lösliches als auch membranständiges TNF in der Lage sind den TNFR1 zu aktivieren (¹⁹). Es zeigte sich, dass zur Aktivierung von TNFR2 ein sekundäres Aggregieren des löslichen Liganden notwendig ist (⁴⁹). Diese Arbeit konnte zum Einen darlegen, dass $LT\alpha_2\beta$ nicht nur ein Agonist für TNFR1 und TNFR2 ist, sondern lieferte zum Anderen erste Hinweise darauf, dass dieser Ligand zur Aktivierung von TNFR2 membrangebunden vorliegen muss, wohingegen TNFR1 auch durch lösliches $LT\alpha_2\beta$ aktiviert werden kann (Abbildung 6.29). Dies steht im Einklang mit der Funktionsweise und der Aktivierung von TNFR1 und TNFR2 durch TNF.

Neben TNF und $LT\alpha_2\beta$ bindet auch $LT\alpha$ an TNFR1 und TNFR2. Im Gegensatz zu TNF konnte dieser Ligand bis dato nur als löslicher Ligand nachgewiesen werden. $LT\alpha$ verhält sich wie lösliches TNF, wodurch es nur bei Bindung an den TNFR1 zu einer starken Aktivierung von Signalwegen kommt. TNFR2 kann aufgrund seiner Aktivierungseigenschaften nicht durch lösliches $LT\alpha$ aktiviert werden. Im Vergleich dazu liegt $LT\alpha_2\beta$, durch die Zusammenlagerung von zwei Protomeren des löslichen $LT\alpha$ s mit einem membranständigen $LT\beta$ -Protomer, membrangebunden vor. Hierdurch verhält sich $LT\alpha_2\beta$ wie membranständiges TNF. Dies ermöglicht die Aktivierung von TNFR1 und TNFR2. Diese Arbeit konnte zeigen, dass $LT\alpha$ nicht nur bei der Aktivierung des TNFR1 eine Rolle spielt, sondern auch in Form von $LT\alpha_2\beta$ bei der Aktivierung des TNFR2-Rezeptors.

In 2010 wiesen Young und Kollegen nach, dass $LT\alpha\beta_2$ nicht nur membranständig, sondern auch in löslicher Form vorliegen kann. Wie TNF und andere Transmembranproteine, wird $LT\alpha\beta_2$ hier durch die Metalloproteinase ADAM17 aktiv von der Membran gespalten (^{21,22}). Da sowohl $LT\alpha\beta_2$ als auch $LT\alpha_2\beta$ durch das $LT\beta$ -Protomer an die Membran gebunden werden, ist es durchaus vorstellbar, dass auch $LT\alpha_2\beta$ durch Spaltung in löslicher Form vorliegen kann. In dieser Arbeit konnte gezeigt

werden, dass lösliches $LT\alpha_2\beta$ den TNFR2 nicht aktivieren kann. Hier wäre es interessant zu untersuchen inwieweit natürlich vorkommendes $LT\alpha_2\beta$ als löslicher Ligand vorliegt und ob lösliches $LT\alpha_2\beta$ eine inhibierende Wirkung auf die TNFR2-Aktivierung durch TNF einnehmen kann.

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass membranständiges $LT\alpha_2\beta$ an den TNFR1 und den TNFR2 binden und diese aktivieren kann. Der Vergleich mit $LT\alpha\beta_2$ lieferte das Ergebnis, dass hierfür die Bindung an ein Rezeptormolekül und eine Stöchiometrie von 3:1 (Ligandenmolekül : Rezeptormolekül) ausreicht. Jedoch ist bereits bekannt, dass für die meisten TNFRSF-Aktivierungen eine Trimerisierung der Rezeptormoleküle notwendig ist ⁽⁴⁹⁾. Dies lässt schlussfolgern, dass die $LT\alpha_2\beta$ /TNFR2-Paarung eine komplexere Signalaktivierung aufweist im Vergleich zur TNF/TNFR2-Paarung.

TNFR1 und TNFR2 spielen eine Hauptrolle in der Regulation der erworbenen und adaptiven Immunantwort und sind essentieller Teil in der Entwicklung und dem Verlauf von Autoimmunerkrankungen ^(20,113). Aus diesem Grund sind diese Rezeptoren von großem Interesse bei der Entwicklung von inhibitorischen als auch aktivierenden Medikamenten. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise darauf, dass bei Untersuchungen von TNFR1- oder TNFR2-assoziierten Signalwegen oder mit TNFR1- oder TNFR2-assoziierten Erkrankungen im Hinblick auf die Entwicklung von Behandlungsformen nicht nur die Auswirkungen von TNF- oder $LT\alpha$ -Stimulationen betrachtet werden dürfen, sondern auch die Funktion von $LT\alpha_2\beta$ mit einbezogen werden muss.

7.2. $LT\alpha_2\beta$ - und $LT\alpha\beta_2$ -Studien in mausbasierten Modellen

Rheumatische Arthritis oder multiple Sklerose sind Erkrankungen bei denen die TNFR1- und TNFR2-gesteuerten Signalwege eine wichtige Rolle spielen. Aus diesem Grund ist es wichtig und höchst interessant die jeweilige Beteiligung von TNF, $LT\alpha$ und $LT\alpha_2\beta$ dabei zu untersuchen. Allerdings ist die nähere Erforschung der unterschiedlichen Beteiligung von diesen Liganden mit Hilfe von *in vivo* Experimenten oder in der Pathobiologie schwierig. Insbesondere die nähere Untersuchung von $LT\alpha_2\beta$ stellt eine Herausforderung dar, da es zum heutigen Stand der Forschung keine

bekannten Antikörper gibt, die es erlauben endogen exprimiertes $LT\alpha$, $LT\alpha_2\beta$ und $LT\alpha\beta_2$ voneinander zu unterscheiden. Bekannte Antikörper gegen $LT\alpha$ detektieren sowohl $LT\alpha$ als auch $LT\alpha_2\beta$ und $LT\alpha\beta_2$, während ein Antikörper gegen $LT\beta$ sowohl $LT\alpha_2\beta$ als auch $LT\alpha\beta_2$ markiert. Um $LT\alpha_2\beta$ endogen zu exprimieren sind sowohl $LT\alpha$ als auch $LT\beta$ notwendig, wodurch es notgedrungen zu einer Bildung von $LT\alpha_2\beta$ - und $LT\alpha\beta_2$ -Heterotrimeren kommt. Bis dato ist nur $LT\alpha\beta_2$ mit seiner Bindung und Wirkung mit dem $LT\beta R$ ausführlich erforscht. Forschungsergebnisse von Crowe *et al.* und Browning *et al.* zeigten, dass es bei der Expression von $LT\alpha$ und $LT\beta$ zu einer stärkeren Bildung von $LT\alpha\beta_2$ kommt, wohingegen $LT\alpha_2\beta$ nur als Minderheit vorliegt^(23,85,86). Bis dato wurde nicht untersucht, ob unterschiedliche Konditionen das Verhältnis der $LT\alpha\beta_2/LT\alpha_2\beta$ -Bildung verändern und somit die Bildung von $LT\alpha_2\beta$ begünstigt werden kann. Aufgrund dessen, dass eine Veränderung und/oder das Ausschalten von $LT\alpha$ oder $LT\beta$ automatisch auch die Biologie sowohl des $LT\alpha_2\beta$ -, als auch des $LT\alpha\beta_2$ -Heteromers beeinflusst, können *in vivo*-Studien von $LT\alpha_2\beta$ nicht durch das direkte Ausschalten der $LT\alpha$ - oder $LT\beta$ -Expression erreicht werden. Deshalb sind nur indirekte *in vivo*-Studien der Wirkungsweise und Aktivierung von membranständigem $LT\alpha_2\beta$ mittels TNFR2 durchführbar und zwar über Knock-out-Experimente. Unter dem Aspekt, dass $LT\alpha$ keine aktivierende Wirkung auf den TNFR2 hat, können vergleichende *in vivo*-Experimente in Form von TNF-Knock-out-Mäusen mit TNF-TNFR2-Doppelknock-out-Mäusen zur indirekten Untersuchung der membranständigen $LT\alpha_2\beta$ -Wirkung herangezogen werden. Um solche Experimente durchführen zu können, muss zunächst erläutert werden, inwieweit sich das murine $LT\alpha_2\beta$ in seinem Bindungs- und Aktivierungsverhalten analog zum humanen $LT\alpha_2\beta$ verhält.

Humanes und murines $LT\alpha$ und $LT\beta$ zeigen eine hohe Homologie zueinander. Für humanes $LT\alpha$ und $LT\beta$, sowie murines $LT\alpha$, beträgt die Übereinstimmung der humanen mit dem murinen Liganden $\geq 70\%$. Bei murinen $LT\beta$ liegt eine Homologie von 60% zu der humanen Variante vor. Dies kommt aufgrund einer verlängerten stalk-Region zustande, welche keine Rolle bei der Bindung an den jeweiligen Rezeptor spielt. Eine Homologie von über 60% ist auch beim Vergleich von murinen und humanen TNFR1 (64%) bzw. TNFR2 (62%) zu beobachten (s. Anhang 9.2). Zur Charakterisierung von murinem $LT\alpha\beta$ wurde bereits 1997 die Bindung von murinem $LT\alpha\beta$ sowohl an den humanen, als auch an den murinen TNFR1 gezeigt. Experimente mit den humanen und murinen $LT\beta R$ wiesen jedoch unterschiedliche

Bindungsaffinitäten des murinen $LT\alpha\beta$ s auf. Für den humanen $LT\beta R$ konnte eine niedrige Affinität und für den murinen $LT\beta R$ eine hohe Affinität nachgewiesen werden⁽⁶⁹⁾.

In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die humanen $mem(sc)LT\alpha_2\beta$ - und $mem(sc)LT\alpha\beta_2$ -Liganden die Produktion von MCP-1 in der murinen Zelllinie Panc02 aktivieren können. Aufgrund der Ähnlichkeit der humanen und murinen Liganden liegt die Vermutung nahe, dass nicht nur murine $LT\alpha\beta$ -Konstrukte an die humanen und murinen Rezeptoren binden können, sondern dass auch die humanen sc -Konstrukte an den jeweiligen murinen Rezeptoren binden und diesen aktivieren können. Um dies zu verifizieren sind weitere Experimente notwendig, in denen die einzelnen möglichen Rezeptoren blockiert werden, um somit eine spezifische Aktivierung durch humanes $mem(sc)LT\alpha_2\beta$ oder humanes $mem(sc)LT\alpha\beta_2$ nachzuweisen.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass $LT\alpha_2\beta$ nicht nur TNFR1, sondern auch TNFR2 und $LT\beta R$ binden kann. Sowohl lösliches, als auch membransständiges $LT\alpha_2\beta$ aktiviert den TNFR1, wohingegen dieses Heterotrimer für die Aktivierung des TNFR2 membranständig vorliegen muss. Diese Arbeit zeigt, dass mit $LT\alpha_2\beta$ ein neuer Agonist für TNFR2 gefunden wurde, wodurch die $LT\alpha/LT\beta$ -Biologie noch komplexer wird. Die Ergebnisse dieser Dissertation liefern den ersten Ansatzpunkt für weitergehende Erforschungen der komplexen Signalaktivierung durch $LT\alpha$ und $LT\beta$.

8. Literaturverzeichnis

- 1 Aggarwal BB, Gupta SC & Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* **119**, 651-665 (2012).
- 2 Conlon TM, John-Schuster G, Heide D, Pfister D, Lehmann M, Hu Y *et al.* Inhibition of LTbetaR signalling activates WNT-induced regeneration in lung. *Nature* **588**, 151-156 (2020).
- 3 Hirose T, Fukuma Y, Takeshita A & Nishida K. The role of lymphotoxin-alpha in rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* **67**, 495-501 (2018).
- 4 Madsen PM, Desu HL, de Rivero Vaccari JP, Florimon Y, Ellman DG, Keane RW *et al.* Oligodendrocytes modulate the immune-inflammatory response in EAE via TNFR2 signaling. *Brain Behav Immun* **84**, 132-146 (2020).
- 5 Piao W, Xiong Y, Famulski K, Brinkman CC, Li L, Toney N *et al.* Regulation of T cell afferent lymphatic migration by targeting LTbetaR-mediated non-classical NFkappaB signaling. *Nat Commun* **9**, 3020 (2018).
- 6 Seymour HE, Worsley A, Smith JM & Thomas SH. Anti-TNF agents for rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol* **51**, 201-208 (2001).
- 7 Tsakiri N, Papadopoulos D, Denis MC, Mitsikostas DD & Kollias G. TNFR2 on non-haematopoietic cells is required for Foxp3+ Treg-cell function and disease suppression in EAE. *Eur J Immunol* **42**, 403-412 (2012).
- 8 Granger GA, Shacks SJ, Williams TW & Kolb WP. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. *Nature* **221**, 1155-1157 (1969).
- 9 Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N & Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3666-3670 (1975).
- 10 Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, Bringman TS, Henzel WJ, Jarrett JA *et al.* Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* **312**, 721-724 (1984).
- 11 Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA *et al.* Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**, 724-729 (1984).
- 12 Ashkenazi A & Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308 (1998).
- 13 Idriss HT & Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* **50**, 184-195 (2000).
- 14 Smith CA, Farrah T & Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**, 959-962 (1994).
- 15 Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV & Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* **17**, 331-367 (1999).
- 16 Bodmer JL, Schneider P & Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* **27**, 19-26 (2002).
- 17 Locksley RM, Killeen N & Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501 (2001).
- 18 Siegmund D, Lang I & Wajant H. Cell death-independent activities of the death receptors CD95, TRAILR1, and TRAILR2. *FEBS J* **284**, 1131-1159 (2017).
- 19 Wajant H. Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. *Cell Death Differ* **22**, 1727-1741 (2015).
- 20 Wajant H, Pfizenmaier K & Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**, 45-65 (2003).
- 21 Young J, Yu X, Wolslegel K, Nguyen A, Kung C, Chiang E *et al.* Lymphotoxin-alfaheterotrimers are cleaved by metalloproteinases and contribute to synovitis in rheumatoid arthritis. *Cytokine* **51**, 78-86 (2010).

- 22 Zunke F & Rose-John S. The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1864**, 2059-2070 (2017).
- 23 Browning JL, Douglas I, Ngam-ek A, Bourdon PR, Ehrenfels BN, Miatkowski K *et al.* Characterization of surface lymphotoxin forms. Use of specific monoclonal antibodies and soluble receptors. *J Immunol* **154**, 33-46 (1995).
- 24 Hansen HP, Recke A, Reineke U, Von Tresckow B, Borchmann P, Von Strandmann EP *et al.* The ectodomain shedding of CD30 is specifically regulated by peptide motifs in its cysteine-rich domains 2 and 5. *FASEB J* **18**, 893-895 (2004).
- 25 Nagata S, Ise T, Onda M, Nakamura K, Ho M, Raubitschek A *et al.* Cell membrane-specific epitopes on CD30: Potentially superior targets for immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7946-7951 (2005).
- 26 Mackay F, Schneider P, Rennert P & Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* **21**, 231-264 (2003).
- 27 Tripathi A & Bankaitis VA. Molecular Docking: From Lock and Key to Combination Lock. *J Mol Med Clin Appl* **2** (2017).
- 28 Eck MJ & Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* **264**, 17595-17605 (1989).
- 29 Cha SS, Sung BJ, Kim YA, Song YL, Kim HJ, Kim S *et al.* Crystal structure of TRAIL-DR5 complex identifies a critical role of the unique frame insertion in conferring recognition specificity. *J Biol Chem* **275**, 31171-31177 (2000).
- 30 Hymowitz SG, Christinger HW, Fuh G, Ultsch M, O'Connell M, Kelley RF *et al.* Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol Cell* **4**, 563-571 (1999).
- 31 Mongkolsapaya J, Grimes JM, Chen N, Xu XN, Stuart DI, Jones EY *et al.* Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nat Struct Biol* **6**, 1048-1053 (1999).
- 32 Liu Y, Hong X, Kappler J, Jiang L, Zhang R, Xu L *et al.* Ligand-receptor binding revealed by the TNF family member TALL-1. *Nature* **423**, 49-56 (2003).
- 33 An HJ, Kim YJ, Song DH, Park BS, Kim HM, Lee JD *et al.* Crystallographic and mutational analysis of the CD40-CD154 complex and its implications for receptor activation. *J Biol Chem* **286**, 11226-11235 (2011).
- 34 Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C *et al.* Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* **73**, 431-445 (1993).
- 35 Bossen C, Cachero TG, Tardivel A, Ingold K, Willen L, Dobles M *et al.* TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood* **111**, 1004-1012 (2008).
- 36 Compaan DM & Hymowitz SG. The crystal structure of the costimulatory OX40-OX40L complex. *Structure* **14**, 1321-1330 (2006).
- 37 Liu C, Walter TS, Huang P, Zhang S, Zhu X, Wu Y *et al.* Structural and functional insights of RANKL-RANK interaction and signaling. *J Immunol* **184**, 6910-6919 (2010).
- 38 Liu W, Zhan C, Cheng H, Kumar PR, Bonanno JB, Nathenson SG *et al.* Mechanistic basis for functional promiscuity in the TNF and TNF receptor superfamilies: structure of the LIGHT:DcR3 assembly. *Structure* **22**, 1252-1262 (2014).
- 39 Schuepbach-Mallepell S, Das D, Willen L, Vigolo M, Tardivel A, Lebon L *et al.* Stoichiometry of Heteromeric BAFF and APRIL Cytokines Dictates Their Receptor Binding and Signaling Properties. *J Biol Chem* **290**, 16330-16342 (2015).
- 40 Sudhamsu J, Yin J, Chiang EY, Starovasnik MA, Grogan JL & Hymowitz SG. Dimerization of LTbetaR by LTalpha1beta2 is necessary and sufficient for signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 19896-19901 (2013).
- 41 Zhan C, Patskovsky Y, Yan Q, Li Z, Ramagopal U, Cheng H *et al.* Decoy strategies: the structure of TL1A:DcR3 complex. *Structure* **19**, 162-171 (2011).

- 42 Hymowitz SG, Patel DR, Wallweber HJ, Runyon S, Yan M, Yin J *et al.* Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *J Biol Chem* **280**, 7218-7227 (2005).
- 43 Liu Y, Xu L, Opalka N, Kappler J, Shu HB & Zhang G. Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands. *Cell* **108**, 383-394 (2002).
- 44 Ta HM, Nguyen GT, Jin HM, Choi J, Park H, Kim N *et al.* Structure-based development of a receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) inhibitor peptide and molecular basis for osteopetrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 20281-20286 (2010).
- 45 Wiley SR, Cassiano L, Lofton T, Davis-Smith T, Winkles JA, Lindner V *et al.* A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. *Immunity* **15**, 837-846 (2001).
- 46 Compaan DM, Gonzalez LC, Tom I, Loyet KM, Eaton D & Hymowitz SG. Attenuating lymphocyte activity: the crystal structure of the BTLA-HVEM complex. *J Biol Chem* **280**, 39553-39561 (2005).
- 47 Liu W, Garrett SC, Fedorov EV, Ramagopal UA, Garforth SJ, Bonanno JB *et al.* Structural Basis of CD160:HVEM Recognition. *Structure* **27**, 1286-1295 e1284 (2019).
- 48 Yu G, Boone T, Delaney J, Hawkins N, Kelley M, Ramakrishnan M *et al.* APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nat Immunol* **1**, 252-256 (2000).
- 49 Kucka K & Wajant H. Receptor Oligomerization and Its Relevance for Signaling by Receptors of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily. *Front Cell Dev Biol* **8**, 615141 (2020).
- 50 Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL & Lenardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* **288**, 2351-2354 (2000).
- 51 Brown SA, Cheng E, Williams MS & Winkles JA. TWEAK-independent Fn14 self-association and NF-kappaB activation is mediated by the C-terminal region of the Fn14 cytoplasmic domain. *PLoS One* **8**, e65248 (2013).
- 52 Kanazawa K & Kudo A. Self-assembled RANK induces osteoclastogenesis ligand-independently. *J Bone Miner Res* **20**, 2053-2060 (2005).
- 53 Lang I, Fullsack S, Wyzgol A, Fick A, Trebing J, Arana JA *et al.* Binding Studies of TNF Receptor Superfamily (TNFRSF) Receptors on Intact Cells. *J Biol Chem* **291**, 5022-5037 (2016).
- 54 Wajant H. Principles and mechanisms of CD95 activation. *Biol Chem* **395**, 1401-1416 (2014).
- 55 Grell M. Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *J Inflamm* **47**, 8-17 (1995).
- 56 Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B *et al.* The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **83**, 793-802 (1995).
- 57 Grell M, Zimmermann G, Gottfried E, Chen CM, Grunwald U, Huang DC *et al.* Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J* **18**, 3034-3043 (1999).
- 58 Hendriks J, Planelles L, de Jong-Odding J, Hardenberg G, Pals ST, Hahne M *et al.* Heparan sulfate proteoglycan binding promotes APRIL-induced tumor cell proliferation. *Cell Death Differ* **12**, 637-648 (2005).
- 59 Ingold K, Zumsteg A, Tardivel A, Huard B, Steiner QG, Cachero TG *et al.* Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *J Exp Med* **201**, 1375-1383 (2005).
- 60 Aoki K, Kurooka M, Chen JJ, Petryniak J, Nabel EG & Nabel GJ. Extracellular matrix interacts with soluble CD95L: retention and enhancement of cytotoxicity. *Nat Immunol* **2**, 333-337 (2001).
- 61 Vij N, Roberts L, Joyce S & Chakravarti S. Lumican regulates corneal inflammatory responses by modulating Fas-Fas ligand signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 88-95 (2005).
- 62 Herrero R, Kajikawa O, Matute-Bello G, Wang Y, Hagimoto N, Mongovin S *et al.* The biological activity of FasL in human and mouse lungs is determined by the structure of its stalk region. *J Clin Invest* **121**, 1174-1190 (2011).

- 63 Richter C, Messerschmidt S, Holeiter G, Tepperink J, Osswald S, Zappe A *et al.* The tumor necrosis factor receptor stalk regions define responsiveness to soluble versus membrane-bound ligand. *Mol Cell Biol* **32**, 2515-2529 (2012).
- 64 Cabal-Hierro L, Rodriguez M, Artime N, Iglesias J, Ugarte L, Prado MA *et al.* TRAF-mediated modulation of NF- κ B AND JNK activation by TNFR2. *Cell Signal* **26**, 2658-2666 (2014).
- 65 Liu T, Zhang L, Joo D & Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* **2** (2017).
- 66 Browning JL, Ngam-ek A, Lawton P, DeMarinis J, Tizard R, Chow EP *et al.* Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* **72**, 847-856 (1993).
- 67 Hochman PS, Majeau GR, Mackay F & Browning JL. Proinflammatory responses are efficiently induced by homotrimeric but not heterotrimeric lymphotoxin ligands. *J Inflamm* **46**, 220-234 (1995).
- 68 Kucka K, Lang I, Zhang T, Siegmund D, Medler J & Wajant H. Membrane lymphotoxin-alpha2beta is a novel tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 (TNFR2) agonist. *Cell Death Dis* **12**, 360 (2021).
- 69 Browning JL, Sizing ID, Lawton P, Bourdon PR, Rennert PD, Majeau GR *et al.* Characterization of lymphotoxin-alpha beta complexes on the surface of mouse lymphocytes. *J Immunol* **159**, 3288-3298 (1997).
- 70 Williams-Abbott L, Walter BN, Cheung TC, Goh CR, Porter AG & Ware CF. The lymphotoxin-alpha (LTalpha) subunit is essential for the assembly, but not for the receptor specificity, of the membrane-anchored LTalpha1beta2 heterotrimeric ligand. *J Biol Chem* **272**, 19451-19456 (1997).
- 71 Browning JL, Miatkowski K, Griffiths DA, Bourdon PR, Hession C, Ambrose CM *et al.* Preparation and characterization of soluble recombinant heterotrimeric complexes of human lymphotoxins alpha and beta. *J Biol Chem* **271**, 8618-8626 (1996).
- 72 Dillon SR, Harder B, Lewis KB, Moore MD, Liu H, Bukowski TR *et al.* B-lymphocyte stimulator/a proliferation-inducing ligand heterotrimers are elevated in the sera of patients with autoimmune disease and are neutralized by atacicept and B-cell maturation antigen-immunoglobulin. *Arthritis Res Ther* **12**, R48 (2010).
- 73 Roschke V, Sosnovtseva S, Ward CD, Hong JS, Smith R, Albert V *et al.* BLyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *J Immunol* **169**, 4314-4321 (2002).
- 74 Wang HY, Ma CA, Zhao Y, Fan X, Zhou Q, Edmonds P *et al.* Antibody deficiency associated with an inherited autosomal dominant mutation in TWEAK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 5127-5132 (2013).
- 75 Brenner D, Blaser H & Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol* **15**, 362-374 (2015).
- 76 Wajant H & Scheurich P. TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway. *FEBS J* **278**, 862-876 (2011).
- 77 Gilmore TD. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680-6684 (2006).
- 78 Hayden MS & Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* **132**, 344-362 (2008).
- 79 Scheidereit C. I κ B kinase complexes: gateways to NF- κ B activation and transcription. *Oncogene* **25**, 6685-6705 (2006).
- 80 Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853-6866 (1999).
- 81 Smale ST. Hierarchies of NF- κ B target-gene regulation. *Nat Immunol* **12**, 689-694 (2011).
- 82 Vallabhapurapu S & Karin M. Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* **27**, 693-733 (2009).
- 83 Sun SC. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* **17**, 545-558 (2017).

- 84 Kucka K, Medler J & Wajant H. Analysis of Ligand-Receptor Interactions Using Bioluminescent TNF Superfamily (TNFSF) Ligand Fusion Proteins. *Methods Mol Biol* **2248**, 185-200 (2021).
- 85 Crowe PD, VanArsdale TL, Walter BN, Dahms KM & Ware CF. Production of lymphotoxin (LT alpha) and a soluble dimeric form of its receptor using the baculovirus expression system. *J Immunol Methods* **168**, 79-89 (1994).
- 86 Crowe PD, VanArsdale TL, Walter BN, Ware CF, Hession C, Ehrenfels B *et al.* A lymphotoxin-beta-specific receptor. *Science* **264**, 707-710 (1994).
- 87 Medvedev AE, Espevik T, Ranges G & Sundan A. Distinct roles of the two tumor necrosis factor (TNF) receptors in modulating TNF and lymphotoxin alpha effects. *J Biol Chem* **271**, 9778-9784 (1996).
- 88 Weiss T, Grell M, Hessabi B, Bourteele S, Muller G, Scheurich P *et al.* Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80: requirement of the TNF receptor-associated factor-2 binding site. *J Immunol* **158**, 2398-2404 (1997).
- 89 Wajant H & Siegmund D. TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Front Cell Dev Biol* **7**, 91 (2019).
- 90 Xie X, Peng J, Chang X, Huang K, Huang J, Wang S *et al.* Activation of RhoA/ROCK regulates NF-kappaB signaling pathway in experimental diabetic nephropathy. *Mol Cell Endocrinol* **369**, 86-97 (2013).
- 91 Park YR, Sultan MT, Park HJ, Lee JM, Ju HW, Lee OJ *et al.* NF-kappaB signaling is key in the wound healing processes of silk fibroin. *Acta Biomater* **67**, 183-195 (2018).
- 92 Flick DA & Gifford GE. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* **68**, 167-175 (1984).
- 93 Fan TJ, Han LH, Cong RS & Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **37**, 719-727 (2005).
- 94 McIlwain DR, Berger T & Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a008656 (2013).
- 95 Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G & Murcia JM. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem* **273**, 33533-33539 (1998).
- 96 Fullsack S, Rosenthal A, Wajant H & Siegmund D. Redundant and receptor-specific activities of TRADD, RIPK1 and FADD in death receptor signaling. *Cell Death Dis* **10**, 122 (2019).
- 97 Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X *et al.* Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* **4**, 313-321 (2008).
- 98 Laurien L, Nagata M, Schunke H, Delanghe T, Wiederstein JL, Kumari S *et al.* Autophosphorylation at serine 166 regulates RIP kinase 1-mediated cell death and inflammation. *Nat Commun* **11**, 1747 (2020).
- 99 Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S *et al.* Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* **1**, 489-495 (2000).
- 100 Marotte H & Cimaz R. Etanercept - TNF receptor and IgG1 Fc fusion protein: is it different from other TNF blockers? *Expert Opin Biol Ther* **14**, 569-572 (2014).
- 101 Mohan AK, Cote TR, Block JA, Manadan AM, Siegel JN & Braun MM. Tuberculosis following the use of etanercept, a tumor necrosis factor inhibitor. *Clin Infect Dis* **39**, 295-299 (2004).
- 102 Steeland S, Libert C & Vandenbroucke RE. A New Venue of TNF Targeting. *Int J Mol Sci* **19** (2018).
- 103 Lis K, Kuzawinska O & Balkowiec-Iskra E. Tumor necrosis factor inhibitors - state of knowledge. *Arch Med Sci* **10**, 1175-1185 (2014).
- 104 Corbett TH, Roberts BJ, Leopold WR, Peckham JC, Wilkoff LJ, Griswold DP, Jr. *et al.* Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Res* **44**, 717-726 (1984).

- 105 Alam MS, Gaida MM, Bergmann F, Lasitschka F, Giese T, Giese NA *et al.* Selective inhibition of the p38 alternative activation pathway in infiltrating T cells inhibits pancreatic cancer progression. *Nat Med* **21**, 1337-1343 (2015).
- 106 Fernandes MT, Dejardin E & dos Santos NR. Context-dependent roles for lymphotoxin-beta receptor signaling in cancer development. *Biochim Biophys Acta* **1865**, 204-219 (2016).
- 107 Deshmane SL, Kremlev S, Amini S & Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* **29**, 313-326 (2009).
- 108 Medler J & Wajant H. Tumor necrosis factor receptor-2 (TNFR2): an overview of an emerging drug target. *Expert Opin Ther Targets* **23**, 295-307 (2019).
- 109 Etemadi N, Holien JK, Chau D, Dewson G, Murphy JM, Alexander WS *et al.* Lymphotoxin alpha induces apoptosis, necroptosis and inflammatory signals with the same potency as tumour necrosis factor. *FEBS J* **280**, 5283-5297 (2013).
- 110 Mascarenhas NM & Kastner J. Are different stoichiometries feasible for complexes between lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor receptor 1? *BMC Struct Biol* **12**, 8 (2012).
- 111 Reis CR, van Assen AH, Quax WJ & Cool RH. Unraveling the binding mechanism of trivalent tumor necrosis factor ligands and their receptors. *Mol Cell Proteomics* **10**, M110 002808 (2011).
- 112 Eldredge J, Berkowitz S, Corin AF, Day ES, Hayes D, Meier W *et al.* Stoichiometry of LTbetaR binding to LIGHT. *Biochemistry* **45**, 10117-10128 (2006).
- 113 Varfolomeev E & Vucic D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine* **101**, 26-32 (2018).

9. Anhang

9.1. Aminosäuresequenzen

Tabelle 9: Aufbau der Fusionsproteine

| | |
|---------------------------------|--|
| α TNFR1(H398)-F-HC-FAB1 | L ^a -Mfe1-F ^b -EcoR1-V _H (US 2013/0251707 A1_7)-BamH1-Bgl2-C _H (aa 118-227 [3U30_C])-Xba1 |
| α TNFR1(H398)-F-LC | L ^a -Mfe1-F ^b -EcoR1-V _L (US 2013/0251707 A1_8)-BamH1-C _L (aa 105-213 [5EU7_C])-Xba1 |
| α TNFR2(C4)-IgG1-HC | L ^a -V _H -C _H (Medler et al. 2019) |
| α TNFR2(C4)-F-LC | L ^a -F ^b -V _L -C _L (Medler et al. 2019) |
| α LTBR(BHA-10)-F-HC-FAB1 | L ^a -Mfe1-F ^b -EcoR1-V _H (Medler et al. 2017)-BamH1-C _H (aa 118-227 [3U30_C])-Xba1 |
| α LTBR(BHA-10)-F-LC | L ^a -Mfe1-F ^b -EcoR1-V _L (Medler et al. 2017)-BamH1-C _L (aa 105-213 [5EU7_C])-Xba1 |
| TNFR1(ed)-F-GpL(w/o) | TNFR1 (aa 1-211 [NP_001056.1])-GSAG-EcoR1-F ^b -GpL ⁱ |
| TNFR2(ed)-F-GpL(w/o) | TNFR2 (aa 1-257 [NP_001057.1])-GSAG-EcoR1-F ^b -GpL ⁱ |
| LTBR(ed)-2xF-GpL(w/o) | LTBR (aa 1-222 [NM_002342.3])-BamH1-F ^b -EcoR1-F ^b -Xho1-GpL ⁱ |
| TNFR1(ed)-GPI | TNFR1 (aa 1-211 [NP_001056.1])-Sal1-GPI (aa 157-259 [NP_003832.3]) |
| LTBR-GPI | LTBR (aa 1-220 [NP_002342.3])-Sal1-GPI (aa 157-259 [NP_003832.3]) |
| memLTβ | LTβ (NM_002341) |
| LTα-F | L ^a -BamH1-F ^b -EcoR1-LTα ^e |
| sclTα ₂ β-F | L ^a -BamH1-F ^b -Mfe1-GGGG-LTα ^d -LK ^c -LTβ ^f -LK ^c -EcoR1-LTα ^e |
| GpL-F-sclTα ₃ | L ^a -BamH1-GpL ⁱ -SGAGS-F ^b -EcoR1-ILEGGG-LTα ^d -GGGSVEGGG-LTα ^e -GGGSVDYQF-LTα ^e |
| GpL-F-sclTα ₂ β | L ^a -BamH1-GpL ⁱ -SGAGS-F ^b -Mfe1-GGGG-LTα ^d -LK ^c -LTβ ^f -LK ^c -EcoR1-LTα ^d |
| GpL-F-sclTαβ ₂ | L ^a -BamH1-GpL ⁱ -SGAGS-F ^b -Mfe1-GGGG-LTα ^d -LK ^c -LTβ ^f -LK ^c -EcoR1-LTβ ^f |
| GpL-F-LTβ | L ^a -GpL ⁱ -SGA-BamH1-F ^b -LTβ ^h -EcoR1- |
| memLTα ₂ β | LTβ ^g -LK ^c -VEGGG-LTα ^d -GGGSVDYQF-LTα ^e |
| memLTαβ ₂ | LTβ ^g -LK ^c -VEGGG-LTα ^d -GGGVYQF-LTβ ^f |

L^a = Leader: MNFGSLIFLVLKGVQCEVKLVPR

F^b = Flag: DYKDDDDK

LK^c = Linker: GGGSGGGSGGGSGGGG

LTα^d = LTα: aa 34-205 [NP_000586.2]

LTα^e = LTα: aa 35-205 [NP_000586.2]

LTβ^f = LTβ: aa 76-244 [NP_002332.1]

LTβ^g = LTβ: aa 1-244 [NP_002332.1]

LTβ^h = LTβ: aa 76-244 [NP_002332.1]

GpLⁱ = GpL(w/o): aa 18-185 [AAG54095.1]

Medler et al. 2019 doi: 10.1038/s41419-019-1456-x

Medler et al. 2017 doi: 10.1080/19420862.2016.1274844

9.2. Vergleiche von humanen und murinen TNFL und TNFR

Aminosäuresequenzen entstammen der Datenbank Uniprot vom 03.04.2021

9.2.1. LT α

Homologie: LT α (mu) (P09225) (70 %), LT α (h) (P01374) (71 %)

Schwarz markiert: Murine Übereinstimmung

Blau markiert: Humane Übereinstimmung

Rot markiert: keine Übereinstimmung

| | | | | | | | |
|------------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| LT α (mu) | MTLLGRLHLL | RVLGTPPVFL | LGLLLALPL- | GAQGLSGVRF | --SAARTAHP | LPQKHLTHGI | 57 |
| LT α (h) | MTPPERLFLP | RVCGTTLHLL | LLGLLLVLLP | GAQGLPGVGL | TPSAAQTARQ | HPKMHLAHST | 60 |
| LT α (mu) | LKPA AHLVGY | PSKQNSLLWR | ASTDRAFLRH | GFSLSNNSLL | IPTSGLYFVY | SQVVFSGESC | 117 |
| LT α (h) | LKPA AHLIGD | PSKQNSLLWR | ANTDRAFLQD | GFSLSNNSLL | VPTSGIYFVY | SQVVFSGKAY | 120 |
| LT α (mu) | SPRAIPTPIY | LAHEVQLFSS | QYPFHVPLLS | AQKSVYPGLQ | GPWVRSMYQG | AVFLLSKGDQ | 177 |
| LT α (h) | SPKATSSPLY | LAHEVQLFSS | QYPFHVPLLS | SQKMYVYPGLQ | EPWLHSMYHG | AAFQLTQGDQ | 180 |
| LT α (mu) | LSTHTDGI SH | LHFSPSSVFF | GAFAL | 202 | | | |
| LT α (h) | LSTHTDGI PH | LVLSPSTVFF | GAFAL | 205 | | | |

9.2.2. LT β

Homologie: LT β (mu) (60 %) (P41155), LT β (h) (Q06643) (76 %)

Schwarz markiert: Murine Übereinstimmung

Blau markiert: Humane Übereinstimmung

Rot markiert: keine Übereinstimmung

| | | | | | | | |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
| LT β (mu) | MGTRGLQGLG | GRPQGRGCLL | LAVAGATSLV | TLLLAVPITV | LAVLALVPOD | QRRVEKIIG | 60 |
| LT β (h) | MGALGLEGRG | GRLQGRGSLL | LAVAGATSLV | TLLLAVPITV | LAVLALVPOD | QGGLVTETAD | 60 |
| LT β (mu) | SGAQAQKRLD | DSKPSCILPS | PSSLSETPDP | RLHPQRSNAS | RNLA STSQGP | VAQSSREASA | 120 |
| LT β (h) | PGAQAQQGL- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 69 |
| LT β (mu) | WMTILSPAAD | STPDPGVQQL | PKGEPETDLN | PELPAAHLIG | AWMSGQGLSW | EASQEEAFRL | 180 |
| LT β (h) | ----- | -----GFQKL | PEEPETDLS | PGLPAAHLIG | APLKGQGLGW | ETTKEQAFLT | 114 |
| LT β (mu) | SGAQFSPTHG | LALPQDGVYY | LYCHVGYRGR | TPP-AGRSRA | RS LTLRSALY | RAGGAYGRGS | 239 |
| LT β (h) | SGTQFSDAEG | LALPQDGLYY | LYCLVGYRGR | APPGGGDPQG | RSVTLRS SLY | RAGGAYGPGT | 174 |
| LT β (mu) | PELLLEGAET | VTPVVDPI-- | -GYGSLWYTS | VGFGGLAQLR | SGERVYVNIS | HPDMVDYRRG | 296 |
| LT β (h) | PELLLEGAET | VTPVLDPARR | QGYGPLWYTS | VGFGGLVQLR | RGERVYVNIS | HPDMVDFARG | 234 |
| LT β (mu) | KTFFGAVMVG | 306 | | | | | |
| LT β (h) | KTFFGAVMVG | 244 | | | | | |

9.2.5. LTβR

Homologie: LTβR(mu) (P50284) (67 %), LTβR(h) (P36941) (68 %)

Schwarz markiert: Murine Übereinstimmung

Blau markiert: Humane Übereinstimmung

Rot markiert: keine Übereinstimmung

| | | | | | | | |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| LTβR(mu) | MRLPRASSPC | GLAWGPLLIG | LSGLLVASQP | QLVPPYRIEN | QTCWDQDKEY | YEPMHDVCCS | 60 |
| LTβR(h) | MLLPWATSAP | GLAWGPLVLG | LFGLLAASQP | QAVPPYASEN | QTCRDQEKEY | YEPQHRICCS | 60 |
| LTβR(mu) | RCPPEFVFA | VCSRSQDTCV | KTCPHNSYNE | HWNHLSTCQL | CRPCDIVLGF | EEVAPCTSDR | 120 |
| LTβR(h) | RCPPGTYVSA | KCSRIRDTCV | ATCAENSYNE | HWNYLITCQL | CRPCDFVMGL | EEIAPCTSKR | 120 |
| LTβR(mu) | KAECRCQPGM | SCVYLDNECV | HCEEERLVLC | QPGTEAEVTD | EIMDTDVNCV | PCKPGHFQNT | 180 |
| LTβR(h) | KTQCRCQPGM | FCAAWALECT | HC--EELSDC | PPGTEAELKD | EVGKGNNHCV | PCKAGHFQNT | 178 |
| LTβR(mu) | SSPRARCQPH | TRCEIQGLVE | AAPGTSYSDT | ICKNPPEP-- | ----GAMLLL | AILLSLVLFL | 234 |
| LTβR(h) | SSPSARCQPH | TRCENQGLVE | AAPGTAQSDT | TCKNPLEPLP | PEMSGTMLML | AVLLPLAFFL | 238 |
| LTβR(mu) | LFTTVLACAW | MRHPSLCRKL | GTLKLRHPEG | EESPPCPA-- | --PRADPHFP | DLAEP LLPMS | 290 |
| LTβR(h) | LLATVFSCIW | KSHPSLCRKL | GSLKRRPQG | EGPNPVAGSW | EPPKAHPYFP | DLVQPLLPIS | 298 |
| LTβR(mu) | GDLSPSPAGP | PTAPSLEEVV | LQQQSPLVQA | RELEAEPGEH | GQVAHGANGI | HVTGGSVTVT | 350 |
| LTβR(h) | GDVSPVSTGL | PAAPVLEAGV | PQQQSPLDLT | REPQLEPGEQ | SQVAHGTNGI | HVTGGSMTIT | 358 |
| LTβR(mu) | GNIYIYNGPV | LGGTRGPGDP | PAPPEPPYPT | PEEGAPGPSE | LSTPYQEDGK | AWHLAETETL | 410 |
| LTβR(h) | GNIYIYNGPV | LGGPPGPGDL | PATPEPPYPI | PEEGDPGPPG | LSTPHQEDGK | AWHLAETEHC | 418 |
| LTβR(mu) | G | 411 | | | | | |
| LTβR(h) | G | 419 | | | | | |

9.3. Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----------------|---|--------|
| Abbildung 3.1: | Liganden der TNFSF..... | - 9 - |
| Abbildung 3.2: | CRD-Module der TNFRSF..... | - 10 - |
| Abbildung 3.3: | Untergruppen der TNFR | - 12 - |
| Abbildung 3.4: | Aufbau der TNF THD | - 13 - |
| Abbildung 3.5: | Interaktion LT α -TNFR1-Protomere | - 15 - |
| Abbildung 3.6: | Aufbau und Bindestellen des CD40L-Trimers..... | - 16 - |
| Abbildung 3.7: | Aktivierungsschema der TNFR-Kategorien..... | - 19 - |
| Abbildung 3.8: | Interaktionsflächen von Homo- und Heteromeren..... | - 21 - |
| Abbildung 3.9: | NF κ B -System..... | - 24 - |
| Abbildung 6.1: | Schema Homo- und Heterotrimere von Lymphotoxin α und löslichem GpL-Lymphotoxin- β | - 50 - |
| Abbildung 6.2: | sLT β wird gebildet, bindet aber nicht an LT β R. | - 52 - |
| Abbildung 6.3: | Bindungsfähigkeit von Überständen LT α + GpL-sLT β kotransfizierter Zellen an transient TNFR1, TNFR2 und LT β R transfizierten HEK293T-Zellen..... | - 54 - |
| Abbildung 6.4: | Expressionsanalyse von TNFR1, TNFR2 und LT β R in HeLa-TNFR2 und Kym-1. | - 56 - |
| Abbildung 6.5: | Bindungsfähigkeit von LT α + GpL-sLT β Heterotrimeren an endogen exprimierte Rezeptoren..... | - 57 - |
| Abbildung 6.6: | Schema Homo- und Heterotrimere von Lymphotoxin α und membranständigen Lymphotoxin β | - 58 - |
| Abbildung 6.7: | Detektion von memLT β -gebundenem LT α | - 60 - |
| Abbildung 6.8: | Membrangebundene Heterotrimere von LT α und memLT β binden sowohl an LT β R, als auch an TNFR1 und TNFR2..... | - 61 - |
| Abbildung 6.9: | Expression von TNFR1, TNFR2 und LT β R in verschiedenen HeLa-Varianten..... | - 62 - |
| Abbildung 6.10: | Koexpression von membranständigem LT β und löslichem LT α führt zur Bildung von Heterotrimeren, die die IL8-Produktion in HeLa, HeLa-TNFR2 und HeLa-TNFR2-TNFR1 $_{KO}$ stimulieren..... | - 64 - |
| Abbildung 6.11: | Schema mem(sc)LT $\alpha_2\beta$, mem(sc)LT $\alpha\beta_2$ und memTNF..... | - 65 - |
| Abbildung 6.12: | Stabile Expression von mem(sc)LT $\alpha_2\beta$, mem(sc)LT $\alpha\beta_2$ in HEK293-Flp-In-Zellen, sowie memTNF in CHO-Zellen..... | - 66 - |
| Abbildung 6.13: | mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ bindet LT β R, sowie TNFR1 und TNFR2..... | - 67 - |
| Abbildung 6.14: | mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ aktiviert TNFR1 und TNFR2..... | - 69 - |
| Abbildung 6.15: | Charakterisierung von HEK293-Flp-In-Zellen..... | - 70 - |
| Abbildung 6.16: | Mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ aktiviert TNFR2..... | - 71 - |
| Abbildung 6.17: | Membranständiges TNF sowie mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ führt zur Apoptose in Kym-1 Zellen..... | - 73 - |
| Abbildung 6.18: | Aktivierung von Apoptose durch mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ in Kym-1. | - 75 - |
| Abbildung 6.19: | mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ induziert die apoptotische Signalkaskade. | - 76 - |
| Abbildung 6.20: | Membranständiges TNF sowie mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ induzieren in HeLa-RIP3-FADD $_{KO}$ - Zellen Nekroptose | - 78 - |
| Abbildung 6.21: | Mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ induziert Nekroptose in HeLa-RIP3-FADD $_{KO}$ -Zellen. | - 79 - |
| Abbildung 6.22: | Mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ induziert die Phosphorylierung von RIP in HeLa-RIP3-FADD $_{KO}$ -Zellen..... | - 80 - |
| Abbildung 6.23: | LT α , TNF und mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ werden durch Etanercept inhibiert..... | - 82 - |
| Abbildung 6.24: | Expression von TNFR1, TNFR2 und LT β R in murinen Panc02..... | - 84 - |
| Abbildung 6.25: | Mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ sowie mem(sc)LT $\alpha\beta_2$ aktivieren MCP-1 in Panc02..... | - 85 - |

| | | |
|-----------------|--|------|
| Abbildung 6.26: | Schema einzelkettige (single chain = sc) lösliche LT $\alpha\beta$ - Konstrukte | 86 - |
| Abbildung 6.27: | Bindungseigenschaften von GpL-s(sc)LT α_3 , -s(sc)LT $\alpha_2\beta$, -s(sc)LT $\alpha\beta_2$ an transient TNFR1-, LT β R-GPI und TNFR2-GFP exprimierende Zellen. . | 87 - |
| Abbildung 6.28: | HPLC Graphen von s(sc)LT $\alpha_2\beta$ | 89 - |
| Abbildung 6.29: | s(sc)LT $\alpha_2\beta$ -Oligomeren können TNFR2 aktivieren..... | 90 - |
| Abbildung 7.1: | Schema der Interaktion zwischen LT α , LT $\alpha_2\beta$, LT $\alpha\beta_2$, LT β mit ihren Rezeptoren..... | 94 - |

9.4. Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------|---|---------|
| Tabelle 1: | Auflistung der verwendeten Liganden mit der Konstruktbezeichnung und Lokalisation/ Detektion..... | - 26 - |
| Tabelle 2: | Auflistung der verwendeten Rezeptoren mit der Konstruktbezeichnung und Lokalisation/ Detektion..... | - 27 - |
| Tabelle 3: | Auflistung der verwendete Antikörper mit den Konstruktbezeichnungen der schweren und leichten Kette | - 27 - |
| Tabelle 4: | Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Laborgeräten mit Herstellerangabe | - 28 - |
| Tabelle 5: | Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen mit deren Rezeptur | - 31 - |
| Tabelle 6: | Auflistung der verwendeten Antikörper mit Angaben zum Wirt, Hersteller, Artikelnummer und Anwendung..... | - 33 - |
| Tabelle 7: | Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits mit Herstellerangaben..... | - 35 - |
| Tabelle 8: | Auflistung der verwendeten Computersoftware..... | - 38 - |
| Tabelle 9: | Aufbau der Fusionsproteine | - 105 - |

9.5. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| % | Prozent |
| (full) | „full length“ = vollständige (Länge) |
| (h) | human |
| (mem) | membranständig |
| °C | Grad Celsius |
| μ | micro |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| μm | Mikrometer |
| μM | Mikromolar |
| A | Ampere |
| AB | Antikörper |
| ABTS | 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) |
| ADAM17 | „a disintegrin and metalloprotease 17“ |
| AG | Arbeitsgruppe |
| APC | Allophycocyanin |
| anti-LTα | Antikörper gegen Lymphotoxin alpha |
| anti-LTβR-Fab | Antikörperfragment gegen LTβR |
| anti-TNFR1-Fab | Antikörperfragment gegen TNFR1 |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| Baff | „B-cell activating factor“ |
| BaffR | „B-cell activating factor receptor“ |
| BTLA | „B- and T-lymphocyte attenuator“ |
| Bzw. | beziehungsweise |
| Casp. 8 | Caspase 8 |
| Casp. 9 | Caspase 9 |
| Caspase | „Cysteinyll aspartat specific proteinase“ |
| CD | „Cluster of differentiation“ |
| CD40 | „Cluster of differentiation“ 40 |

| | |
|-----------------|---|
| CD40L | Ligand des CD40-Rezeptors |
| CD95 | „Cluster of differentiation 95“ |
| CHO | „Chinese Hamster Ovary“-Zelllinie |
| CHO-memTNFΔ1-12 | membranständiges TNF-exprimierende CHO-Zellen |
| CHX | Cycloheximid |
| cIAP1/2 | „Cellular inhibitor of apoptosis protein 1 / 2“ |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CRD | „Cysteine rich domain“ |
| Crisp cas | „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“ Methode zum Genom-Editing |
| Da | Dalton |
| DcR3 | „Decoy Receptor 3“ |
| DD | „Death domain“ = Todesdomäne |
| DMEM | „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | „Deoxyribonucleic acid“ = Desoxyribonukleinsäure (=DNS) |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DR5 | „death receptor“ 5 = Todesrezeptor 5 |
| EAE | Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis |
| ECL | „Enhanced Chemiluminescence“ |
| ed | „extracellular domain“ = extrazelluläre Domäne |
| ELISA | „Enzyme-linked immunosorbent assay“ |
| Endkonz. | Endkonzentration |
| <i>et al.</i> | „et alii; et aliae; et alia“ |
| etc. | „et cetera“ |
| EV | „empty vector“ = Leervektor |
| Fab | „fragment antigen binding“ = Antikörperfragment |
| FACS | „Fluorescence Activated Cell Sorting“ = Durchflusszytometrie |
| FADD | „Fas-associated protein with death domain“ |
| FBS | Fötale Bovines Serum (=FCS) |
| Fc | „Fragment crystallizable“ = Teil des Antikörpers |

| | |
|-------------------------------|---|
| FCS | „Fetal Calf Serum“ = Fötales Bovines Serum (FBS) |
| FLAG | Polypeptid Protein-Tag (DYKDDDDK) |
| Flp-In/FRT | System zum Genom-Editing bestehend aus der Flippase (=Flp) und der FRT-Zielsequenz |
| Fn14 | „Fibroblast growth factor-inducible“ |
| g | Gramm |
| GFP | „green fluorescent protein“ = grün fluoreszierendes Protein |
| GPI | <u>G</u> lycosyl <u>p</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol |
| GpL | <i>Gaussia princeps</i> Luziferase |
| GpL-s(sc)LT $\alpha_2\beta$ | GpL-fusioniertes lösliches LT α -LT α -LT β |
| GpL-s(sc)LT α_3 | GpL-fusioniertes lösliches LT α -LT α -LT α |
| GpL-s(sc)LT $\alpha\beta_2$ | GpL-fusioniertes lösliches LT α -LT β -LT β |
| h | „hour“ = Stunde(n) |
| H ₂ O | Wasserstoffhydroxid = Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HC | „heavy chain“ = schwere Kette eines Antikörpers |
| HCl | Chlorwasserstoff, Salzsäure |
| HPLC | „high performance liquid chromatography“ = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| HRP | „Horseradish peroxidase“ |
| HVEM | „Herpesvirus entry mediator“ |
| IgG | Immunglobulin G |
| IgG1 | Immunglobulin G1 |
| IKK | „Inhibitor of NF κ B kinase“ |
| IL | Interleukin |
| IL8 | Interleukin 8 |
| I κ B | „inhibitor of κ B“ |
| k | Kilo |
| kDa | Kilodalton |
| ko | „knock-out“ = Ausschalten eines Gens |
| Konz. | Konzentration |
| kRLU | „relative light units“ x 1000 |

| | |
|---------------------------|--|
| l | Liter |
| LC | „light chain“ = leichte Kette eines Antikörpers |
| log | logarithmisch |
| LT α | Lymphotoxin alpha |
| LT $\alpha_2\beta$ | Lymphotoxin $\alpha_2\beta$ |
| LT $\alpha\beta$ | Mischung aus Lymphotoxin $\alpha_2\beta$ und Lymphotoxin $\alpha\beta_2$ |
| LT $\alpha\beta_2$ | Lymphotoxin $\alpha\beta_2$ |
| LT β | Lymphotoxin β |
| LT β R | Lymphotoxin β Rezeptor |
| LT β Red-GpL | GpL-fusionierte extrazelluläre Domäne des Lymphotoxin β Rezeptors |
| LT β R-GPI | GPI-fusionierter Lymphotoxin β Rezeptor |
| m | mili |
| M | Molarität (Mol/Liter) |
| M2 | anti-Flag mAB |
| mA | Miliampere |
| MCP-1 | monocyte chemoattractant protein-1 |
| Mem(sc)LT $\alpha_2\beta$ | membranständiges LT β -LT α -LT α |
| Mem(sc)LT $\alpha\beta_2$ | membranständiges LT β -LT α -LT β |
| memLT $\alpha_2\beta$ | membranständiges Lymphotoxin $\alpha_2\beta$ aus memLT β und LT α |
| memLT $\alpha\beta_2$ | membranständiges Lymphotoxin $\alpha\beta_2$ aus memLT β und LT α |
| memLT β | membranständiges Lymphotoxin β |
| memTNF | membranständiges TNF |
| mg | Miligramm |
| min | Minute(n) |
| ml | Mililiter |
| mM | Milimolar |
| mol | Stoffmenge |
| mu | murin |
| MW | „Molecular weight“ |
| n | Anzahl/Wiederholungen |

| | |
|-------------------------|--|
| n | nano |
| NaCl | Natriumchlorid |
| Nec-1 | Necrostatin-1 |
| NFκB | „nuclear factor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells“ |
| ng/ml | nanogramm pro milliliter |
| nm | Nanometer |
| ns | nicht spezifisch |
| OD | „optical density“ = optische Dichte |
| OPG | Osteoprotegerin |
| p | phosphoryliert |
| PARP | Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase |
| PBS | „Phosphate Buffered Saline“ |
| PCR | „ <u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction“ = Polymerase-Kettenreaktion |
| PE | Phycoerythrin |
| PEI | Polyethylenimin |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |
| pH | „Pondus Hydrogenii/ potential Hydrogenii“ |
| PLAD | „pre-ligand assembly domain“ |
| pRIP | phosphoryliertes RIP1 |
| R | Resistenz |
| RA | Rheumatoide Arthritis |
| RANK | „Receptor Activator of NF-κB“ |
| RIP1 | „receptor-interacting protein 1“ |
| RLU | „relative light units“ = relative Lichteinheiten |
| rpm | „rounds per minute“ |
| RPMI1640 | „Roswell Park Memorial Institute“ (=RPMI) |
| RT | Raumtemperatur |
| s | „soluble“ = Löslich |
| s(sc)LTα ₂ β | lösliches LTα-LTα-LTβ |
| S166 | Serin an Position 166 eines Moleküls |
| Sav-HRP | „Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate“ |

| | |
|---------------------|--|
| sc | „single-chain“ = einzelkettig |
| SDS | „Sodium dodecyl sulfate“ |
| SDS-PAGE | „Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“ |
| sLT $\alpha_2\beta$ | lösliches Lymphotoxin $\alpha_2\beta$ aus löslichem LT α und löslichem LT β |
| sLT α_3 | lösliches Lymphotoxin α |
| sLT $\alpha\beta_2$ | lösliches Lymphotoxin $\alpha\beta_2$ aus löslichem LT α und löslichem LT β |
| spez. | Spezifisch |
| T | Tween-20 |
| TBS | „Tris Buffered Saline“ |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| THD | „TNF homology domain“ |
| TL1A | „TNF ligand 1A“ |
| TM | Transmembrandomäne |
| TNC | Tenascin-C |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| TNFR1 | Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 |
| TNFR1ed-GpL | GpL-fusionierte extrazelluläre Domäne des TNFR1 |
| TNFR1-GPI | GPI-fusionierte extrazelluläre Domäne des TNFR1 |
| TNFR2 | Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 2 |
| TNFR2ed-GpL | GpL-fusionierte extrazelluläre Domäne des TNFR2 |
| TNFR2-GFP | GFP-fusionierter TNFR2 |
| TNFRSF | Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Superfamilie |
| TNFSF | Tumor Nekrose Faktor Superfamilie |
| TNF- α | Tumor Nekrose Faktor α |
| TNF β | Tumor Nekrose Faktor β |
| Tox | Toxizität |
| TRADD | „TNFR1 associated death domain protein“ |
| TRAF | TNF Rezeptor-assoziiertes Faktor |
| TRAIL | „Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand“ |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |

| | |
|-------|---|
| TWEAK | „TNF-like <u>weak</u> inducer of apoptosis” |
| Tween | Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurate |
| Ub | Ubiquitin |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| v/v | „volume/volume percent” |
| Vs | Versus |
| w/v | „weight/volume percent” |
| WB | Western Blot |
| WT | Wildtyp, wildtypisch |
| YFP | „Yellow fluorescent protein” |
| zVAD | N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp |

9.6. Publikationsverzeichnis

Zur Dissertation gehörend:

Kucka K., Lang I., Zhang T., Siegmund D., Medler J., Wajant H. (2021)
Membrane lymphotoxin-a2b is a novel tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 (TNFR2) agonist
Cell Death Dis. doi: 10.1038/s41419-021-03633-8.

Unabhängig von der Dissertation entstanden:

Kucka K., Wajant H. (2021)
Receptor Oligomerization and Its Relevance for Signaling by Receptors of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily
Front Cell Dev Biol. doi: 10.3389/fcell.2020.615141

Kucka K., Medler J., Wajant H. (2021)
Analysis of Ligand-Receptor Interactions Using Bioluminescent TNF Superfamily (TNFSF) Ligand Fusion Proteins
Methods Mol Biol. doi: 10.1007/978-1-0716-1130-2_13

Prada JP., Wangorsch G., **Kucka K.**, Lang I., Dandekar T., Wajant H. (2021)
A system-biology model of the tumor necrosis factor (TNF) interactions with TNF receptor 1 and 2
Bioinformatics doi: 10.1093/bioinformatics/btaa844

Banaszek A., Bumm TGP., Nowotny B., Geis M., Jacob K., Wölfl M., Trebing J., **Kucka K.**, Kouhestani D., Gogishvili T., Krenz B., Lutz J., Raschke L., Hönemann D., Neuweiler H., Heiby JC., Bargou RC., Wajant H., Einsele H., Riethmüller G., Stuhler G. (2019)
On-target restoration of a split T cell-engaging antibody for precision immunotherapy
Nat Commun. doi: 10.1038/s41467-019-13196-0

9.7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. Harald Wajant für die Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit und der hervorragenden wissenschaftlichen Leitung und Betreuung während der Promotion. Danke für deine Hilfsbereitschaft und Ratschläge hinsichtlich der Lösung von auftretenden Problemen und Komplikationen während meiner Promotion.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Müller und Herrn Prof. Dr. Thomas Dandekar für die Bereitschaft und Betreuung meiner Promotion als Zweit- und Drittgutachter danken.

Ein großes Dankeschön gilt meinen ehemaligen und aktuellen Kollegen und Kolleginnen aus der Abteilung für Molekulare Innere Medizin. Durch euch war meine Promotion eine unvergessliche Reise in meinem Leben. Besonders in den Zeiten, in denen es nicht so läuft wie man es geplant hat, wart ihr mir eine große Hilfe. Vor allem gilt mein Dank Tengyu für die Hilfe mit dem Endgegner HPLC.

Außerdem ein dickes Dankeschön an meine guten Feen, die es geschafft haben, neben ihrer Arbeit noch meine Dissertation durchzulesen und zu korrigieren.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meines Studiums und meiner Promotion unterstützt und begleitet haben.

Insbesondere möchte ich meinem Fels in der Brandung, meinem Freund Jens, für seine Unterstützung, seine Geduld und seine innere Ruhe danken. Während den aufreibenden Zeiten der Promotion warst du meine Ruhepol, mein Rückzugsort. Vielen Dank!