

Aus der Abteilung für Molekulare Innere Medizin
der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Leiter der Abteilung: Prof. Dr. Harald Wajant



CD40-restringierte Aktivierung der TRAIL- Todesrezeptoren durch bifunktionelle rekombinante Proteine

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Ruth Inge Aumüller
aus Landshut
Würzburg, Mai 2014

Referent: Univ.-Prof. Dr. Harald Wajant

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Edgar Serfling

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2014

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Meinen Liebsten

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Liganden der TNFSF	1
1.2	Rezeptoren der TNFSF	2
1.3	TRAIL und seine Rezeptoren	5
1.3.1	TRAIL	5
1.3.2	TRAIL-Rezeptoren.....	5
1.3.2.1	Todesrezeptoren für TRAIL: TRAILR1 und TRAILR2	6
1.3.2.2	Köderrezeptoren für TRAIL: TRAILR3, TRAILR4 und OPG	7
1.4	TRAIL-vermittelte intrazelluläre Signalwege	8
1.4.1	TRAIL-vermittelte Apoptose.....	8
1.4.2	Inhibitorische Proteine der Apoptose.....	10
1.4.3	TRAIL-vermittelte NFκB-, JNK- und p38MAPK-Aktivierung.....	12
1.5	Die Rolle von TRAIL im Immunsystem	14
1.6	CD40 und sein Ligand CD40L	15
1.6.1	CD40	15
1.6.2	CD40L	16
1.7	CD40-vermittelte intrazelluläre Signalwege.....	16
1.8	Die Rolle von CD40 im Immunsystem	17
1.9	Ziel der Arbeit	19
2	Materialien	20
2.1	Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien.....	20
2.2	Antikörper und Antiseren	21
2.3	Eukaryotische Zellen	22
2.4	Plasmide.....	22
2.5	Lösungen und Puffer	22
2.6	Geräte, Verbrauchsmaterialien.....	23
2.7	Kits	24
3	Methoden	25
3.1	Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien	25
3.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	25
3.1.2	Konservierung eukaryotischer Zellen	25

3.2	Produktion rekombinanter Proteine	25
3.2.1	Produktion rekombinanter Proteine durch transiente Transfektion von HEK293-Zellen.....	25
3.2.2	Produktion rekombinanter Proteine mithilfe stabil transfizierter HEK293-Zellen	26
3.3	Aufreinigung rekombinanter Proteine durch Affinitätschromatographie.....	26
3.4	Zytotoxizitätsassay	27
3.5	Bestimmung der IL8-Produktion	27
3.6	Herstellung von Zelllysaten.....	28
3.7	Western Blot.....	29
3.7.1	SDS-Page.....	29
3.7.2	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose.....	29
3.7.3	Immundetektion	29
3.8	Silberfärbung	30
3.9	Nachweis zytotoxischer Aktivität am digitalen Lichtmikroskop.....	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Generierung rekombinanter TRAIL-Fusionsproteine	32
4.2	Produktion und Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL.....	33
4.3	Vergleich der Aktivität von gereinigtem und ungereinigtem scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL.....	35
4.4	Bedeutung der Bindung der scFv:CD40-Domäne an zellständiges CD40 für die Aktivität des TRAIL-Fusionsproteins.....	36
4.4.1	Blockade des CD40-Rezeptors vermindert die Aktivität von scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL.....	36
4.4.2	In CD40-exprimierenden, nicht aber in CD40-negativen Zellen, induziert scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL dosisabhängig Apoptose	39
4.5	scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL aktiviert den NFκB-Signalweg	41
4.6	Visualisierung morphologischer Merkmale der Apoptose in scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL stimulierten CD40-exprimierenden Tumorzellen.....	43
4.7	scFv:CD40-Flag-scTRAIL aktiviert immobilisationsabhängig die Apoptose	45
4.8	Detektion charakteristischer Caspasesubstrate.....	48
5	Diskussion	51

5.1	scFv:CD40-TRAIL aktiviert CD40-restringiert die Todesrezeptoren TRAILR1 und TRAILR2	51
5.2	Ein alternatives TRAIL-Konstrukt besitzt immobilisationsabhängig zytotoxische Fähigkeiten	55
5.3	Perspektive des mAb CD40 in der Anti-Tumor-Forschung.....	56
5.4	Einschränkungen der Anwendung von scFv:CD40 und TRAIL in der Krebs-Therapie.....	57
6	Zusammenfassung	59
7	Literaturverzeichnis	61
8	Anhang	70
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	70
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	75
8.3	Tabellenverzeichnis.....	76
8.4	DNA- und Aminosäuresequenzen der Fusionsproteine.....	76
8.4.1	scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL.....	76
8.4.2	scFv:CD40-Fc-Flag-GpL.....	78
8.4.3	scFv:CD40-Flag-scTRAIL.....	80
9	Danksagung	

1 Einleitung

Die Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNFSF) umfasst eine Vielzahl von TNF (Tumornekrosefaktor)-Rezeptoren (TNFR) und TNF-Liganden (TNFL), die verschiedene Funktionen innerhalb des Immunsystems erfüllen. Diese pleiotropen Moleküle steuern neben der Proliferation von Zellen, auch deren Differenzierung und kontrollieren sowohl das Zellüberleben als auch den Zelltod durch Apoptose (programmierter Zelltod) (Smith et al., 1994). Exprimiert von verschiedenen Zellen des Körpers, sind TNFL und TNFR nicht nur primäre Mediatoren des Immunsystems, sondern stehen auch in engem Zusammenhang mit bestimmten pathologischen Vorgängen im menschlichen Körper, wie dem septischen Schock und verschiedenen Autoimmunerkrankungen. Aktuell umfasst die TNFSF 29 Rezeptoren und 19 Liganden (Tabelle 1, S. 3) (Bodmer et al., 2002).

1.1 Liganden der TNFSF

Im menschlichen Genom wurden bis heute 18 Gene ermittelt, die für 19 Liganden der TNFSF kodieren (Bodmer et al., 2002). Charakteristisch für alle Liganden mit Ausnahme des LT α (Lymphotoxin α), das nur als lösliches Molekül exprimiert wird, ist der Aufbau aus einem intrazellulären N-Terminus, der Transmembrandomäne und dem extrazellulären C-Terminus, welcher die TNF-Homologie Domäne (TNF-homology domain, THD) beinhaltet. Die stark konservierte THD umfasst ca. 150 Aminosäuren (AS) und zeigt unter den TNFL eine Sequenzhomologie von 25-30 % (Bodmer et al., 2002). Typischerweise besteht die THD aus zwei β -Faltblättern, welche die Topologie ähnlich einer Biskuitrolle (jelly roll) annehmen. Funktionell ist die THD für die Trimerisierung und die Rezeptorbindung verantwortlich (Fesik, 2000; Bodmer et al., 2002). Zusätzlich befindet sich zwischen der THD und der Transmembrandomäne die sogenannte stalk-Region, welche Erkennungssequenzen für verschiedene Metalloproteasen enthält. Mithilfe dieser Enzyme entstehen mittels Proteolyse aus membrangebundenen Liganden lösliche Varianten (Smith et al., 1994; Bodmer et al., 2002). Lösliche TNFL können aber auch durch alternatives

Spleißen entstehen (Bodmer et al., 2002). Obwohl beide Ligandenformen, die membranständige und die davon abgeleitete lösliche Variante, ihre korrespondierenden Rezeptoren binden, unterscheiden sie sich häufig in ihrer Bioaktivität (Wajant et al., 2001).

Einige Liganden der TNFSF können nur an einen einzigen Rezeptor binden, während andere TNFL mehrere Rezeptoren binden und aktivieren. So wurde z.B. gezeigt, dass TNF an Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) und TNFR2 binden kann, sowie dass TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) an TRAIL-Rezeptor 1 (TRAILR1), TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4 und OPG (Osteoprotegerin) bindet (Bodmer et al., 2002). Dagegen aktiviert z.B. der TNFL TWEAK (TNF-related weak inducer of apoptosis) ausschließlich Fn14 (fibroblast growth factor-inducible molecule 14) (Locksley et al., 2001; Wajant et al., 2005).

1.2 Rezeptoren der TNFSF

Die Rezeptoren der TNFSF sind größtenteils TypI-Transmembranproteine mit charakteristischen homologen Sequenzen, den cysteinreichen Domänen (CRD), im extrazellulären N-terminalen Bereich der Moleküle (Mallett, Barclay, 1991; Smith et al., 1994; Naismith, Sprang, 1998; Bodmer et al., 2002). Die Rezeptoren BAFFR (B-cell-activating factor receptor), BCMA (B-cell maturation antigen), TACI (transmembrane activator and cyclophilin ligand interactor) und XEDAR (X-linked ectodermal dysplasia receptor) bilden eine Ausnahme unter den TNFR, da sie als TypIII-Transmembranproteine exprimiert werden (Bodmer et al., 2002). Eine CRD, welche ca. 40 AS umfasst, enthält typischerweise sechs Cysteinreste an definierten Positionen und wird über drei Disulfidbrücken stabilisiert (Armitage, 1994; Bodmer et al., 2002). Funktionell sind die CRDs bedeutend für die Präassemblierung inaktiver ligandenfreier Rezeptorkomplexe, aber auch für die Ligandenbindung (Smith et al., 1994).

Tabelle 1: Liganden der TNFSF mit ihren entsprechenden Nicht-Todesrezeptoren und Todesrezeptoren (Bodmer et al., 2002)

Ligand	Todesrezeptor/en	Nicht-Todesrezeptor/en
TRAIL <i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>	TRAILR1, TRAILR2	TRAILR3, TRAILR4, OPG
RANKL <i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>		OPG, RANK
TWEAK <i>TNF-related weak inducer of apoptosis</i>		Fn14
TNF <i>Tumor necrosis factor</i>	TNFR1	TNFR2
TL1A <i>TNF-ligand-related molecule 1</i>	DR3	DcR3
LT α <i>Lymphotoxin alpha</i>	TNFR1	TNFR2, LT β R
LT α 1 β 2 <i>Lymphotoxin alpha1/beta2</i>		LT β R
LIGHT <i>Herpes virus entry mediator ligand</i>		HVEM, DcR3
CD95/FasL <i>Apoptosis-mediating surface antigen Fas ligand</i>	CD95	DcR3
CD40L <i>B-cell activating molecule</i>		CD40
CD30L <i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 8</i>		CD30
CD27L <i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 7</i>		CD27
4-1BBL <i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 9</i>		4-1BB
OX40L <i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 4</i>		OX40
GITRL <i>Glucocorticoid-induced TNF-related ligand</i>		GITR
APRIL <i>A proliferation-inducing ligand</i>		TACI, BCMA
BAFF <i>B-cell-activating factor</i>		BAFFR
EDA-A1 <i>Ectodermal dysplasia protein 1</i>	EDAR	
EDA-A2 <i>Ectodermal dysplasia protein 2</i>		XEDAR

Die Anzahl der CRDs variiert unter den TNFR zwischen ein bis sechs CRDs pro Rezeptor, z.B. besitzt der Rezeptor CD40 vier CRDs (Banner et al., 1993; Naismith, Sprang, 1998). Zusätzlich befindet sich N-terminal die sogenannte PLAD (pre-ligand assembly domain), welche ligandenunabhängig die Anordnung der Rezeptoren zu trimeren Komplexen vermittelt (Chan et al., 2000).

Aufgrund einer fehlenden enzymatischen Aktivität vermitteln alle TNFR intrazelluläre Signale durch Rekrutierung diverser Adapterproteine. Die Rezeptoren der TNFSF können in drei Untergruppen unterteilt werden: die Gruppe der Todesrezeptoren (death receptor, DR), die Köderrezeptoren (decoy receptor, DcR) und die TRAF (TNFR-associated factors)-bindenden Rezeptoren. Die Gruppe der DRs umfasst acht Rezeptoren: CD95 (cluster of differentiation 95), DR3, DR6, EDAR (ectodysplasin A receptor), NGFR (nerve growth factor receptor), TNFR1, TRAILR1 und TRAILR2 (Bodmer et al., 2002; Wajant et al., 2003). Charakteristisches Kennzeichen der DRs ist die zytoplasmatische Todesdomäne (death domain, DD), welche durch Rekrutierung von Adapterproteinen diesen Rezeptoren erlaubt, Apoptose zu stimulieren (Tartaglia et al., 1993; Nagata, 1997). Die Gruppe der DcRs setzt sich aus DcR3, TRAILR3, TRAILR4 und OPG zusammen. Es sind lösliche oder GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-verankerte Membranproteine, bzw. im Falle des TRAILR4 ein DR mit defekter Todesdomäne, die keine intrazellulären Signale aktivieren, sondern die Aktivität anderer TNFR regulieren. Das charakteristische Kennzeichen der TRAF-bindenden Rezeptoren ist ein homologer zytoplasmatischer Bereich, der in Wechselwirkung mit den Proteinen der TRAF-Familie steht (Lavrik et al., 2005). Von einigen Rezeptoren der TNFSF sind lösliche Varianten nachweisbar, die entweder durch alternatives Spleißen transmembrankodierender Exons oder durch proteolytische Prozessierung generiert werden (Goodwin et al., 1993). Dazu zählen: TNFR1, TNFR2, CD27, CD30 sowie CD40 (Gruss, Dower, 1995). Neben Apoptose stimulieren Rezeptoren der TNFSF auch nicht-apoptotische Signale; u.a. die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB (nuclear factor kappa B) und den JNK (c-Jun N-terminal kinase)-Signalweg (Locksley et al., 2001). Die verschiedenen Signalwege werden im Kapitel 1.4 genauer beschrieben.

1.3 TRAIL und seine Rezeptoren

1.3.1 TRAIL

TRAIL (Apo2L) ist ein Mitglied der TNFSF und weist eine besonders hohe Sequenzhomologie gegenüber CD95L (28 %) auf (Wiley et al., 1995). Die genetische Information für TRAIL liegt auf dem Chromosom 3 an Position 3q26 (Wiley et al., 1995; Pitti et al., 1996). Zunächst membrangebunden exprimiert, kann das TypII-Transmembranprotein mittels proteolytischer Prozessierung in seine lösliche Form überführt werden (Bodmer et al., 2002). Zur Stabilisierung seiner trimeren Molekülanordnung besitzt der Ligand ein internes Zinkatom, welches jeweils mit Cystein²³⁰ jeder Ligandenuntereinheit verbunden ist (Bodmer et al., 2000; Hymowitz et al., 2000). Das pleiotrope Zytokin ist an der Regulierung einer Vielzahl immunologischer Vorgänge im Körper beteiligt (Mariani et al., 1997). Neben Apoptose stimuliert TRAIL auch anti-apoptotische Signalwege, die u.a. zur NFκB-, p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase)- und JNK-Aktivierung führen (Falschlehner et al., 2007). TRAIL wird vorwiegend von immunologischen Zellen exprimiert, dennoch ist seine mRNA ubiquitär vorzufinden, u.a. in Milz, Prostata, Ovarien, Herz, Kolon, Lunge und Leukozyten des peripheren Blutes (Almasan, Ashkenazi, 2003; Kelley, Ashkenazi, 2004). TRAIL hat eine große Bedeutung in der Anti-Tumortherapieforschung, da eine Vielzahl von Tumorzellen eine hohe Sensitivität gegenüber seinen zytotoxischen Aktivitäten zeigt, während normalen Zellen eine Empfindlichkeit für TRAIL weitestgehend fehlt (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999).

1.3.2 TRAIL-Rezeptoren

Bis heute wurden fünf Rezeptoren für TRAIL charakterisiert: TRAILR1 (DR4) (Pan et al., 1997b), TRAILR2 (DR5) (Walczak et al., 1997), TRAILR3 (DcR1), TRAILR4 (DcR2) (Degli-Esposti et al., 1997a) und OPG (Emery et al., 1998) (Abbildung 1). Die genetische Information für die fünf Rezeptoren liegt auf dem humanen Chromosom 8 an der Position 8p21-22 (Degli-Esposti et al., 1997b). Während TRAILR1 und TRAILR2 über ihre zytoplasmatischen DDs Apoptose induzieren, zählen TRAILR3, TRAILR4 und OPG zur Gruppe der DcRs. Die

mRNA für die Rezeptoren TRAILR1, TRAILR2 und TRAILR4 wird ubiquitär exprimiert (Wiley et al., 1995; Pan et al., 1997a; Walczak et al., 1997).

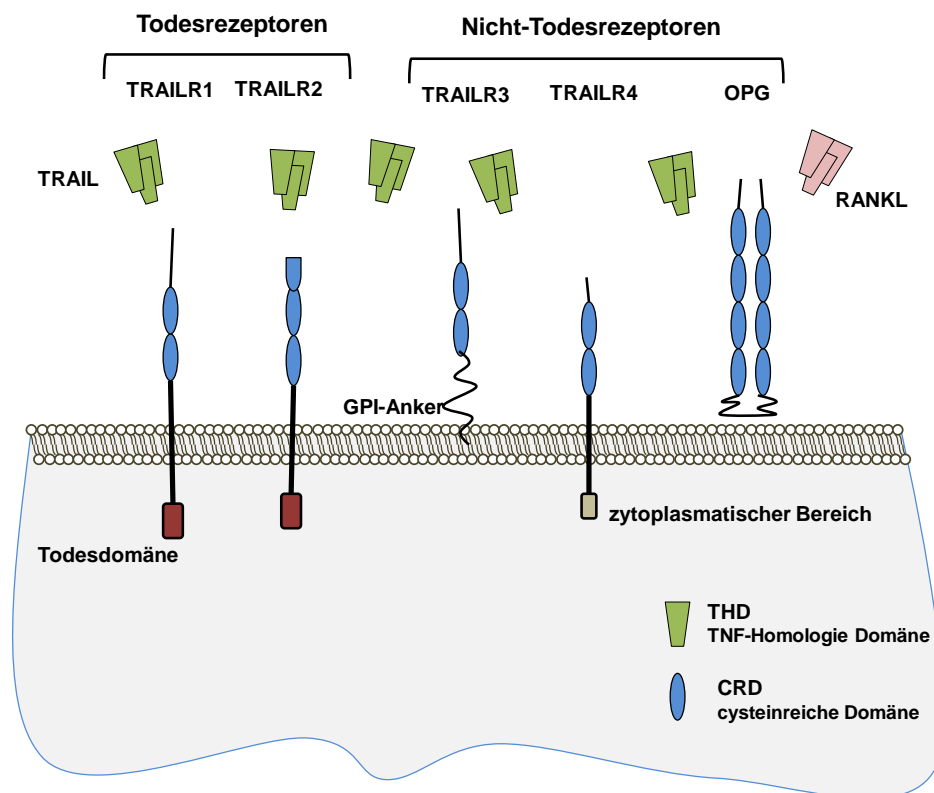


Abbildung 1: Die TRAIL-Rezeptoren

1.3.2.1 Todesrezeptoren für TRAIL: TRAILR1 und TRAILR2

Die Todesrezeptoren TRAILR1 und TRAILR2 sind durch die charakteristische zytoplasmatische Todesdomäne gekennzeichnet, deren Homologie gegenüber anderen Todesrezeptoren bei 19-28 % liegt (Pan et al., 1997b; Walczak et al., 1997). Typischerweise setzen sich beide Oberflächenrezeptoren aus dem extrazellulären N-Terminus, welcher jeweils zwei CRDs beinhaltet, der Transmembrandomäne und dem zytoplasmatischen Bereich zusammen (Pan et al., 1997b; Walczak et al., 1997). Im Vergleich zeigen der TRAILR1 und der TRAILR2 eine Homologie von 85 %, wobei der TRAILR2 im transmembranen Bereich AS-Sequenzen besitzt, welche dem TRAILR1 fehlen (Walczak et al., 1997). Von TRAILR2 wurden zwei alternative Spleißvarianten nachgewiesen

(TRICK2a + TRICK2b), deren N-terminale AS-Sequenzen um 29 AS voneinander abweichen (Screaton et al., 1997).

1.3.2.2 Köderrezeptoren für TRAIL: TRAILR3, TRAILR4 und OPG

Der Köderrezeptor TRAILR3, der aufgrund einer fehlenden intrazellulären Domäne auch TRID (TRAIL-receptor without an intracellular domain) genannt wird, ist über GPI in der Zellmembran verankert (Degli-Esposti et al., 1997b). TRAILR3 ist nicht ubiquitär im Gewebe vorzufinden, sondern wird hauptsächlich auf peripheren Blutlymphozyten und der Milz exprimiert (Degli-Esposti et al., 1997b). Der Mangel einer intrazellulären Domäne und die große Sequenzhomologie gegenüber dem TRAILR1 und dem TRAILR2 werfen die Vermutung auf, dass TRAILR3 durch TRAIL-Bindung die Apoptose reguliert bzw. inhibiert (Degli-Esposti et al., 1997a).

Der vierte TRAIL-Rezeptor, der Köderrezeptor TRAILR4, kann aufgrund einer unvollständigen intrazellulären DD keine apoptoseinduzierenden Signalproteine rekrutieren (Degli-Esposti et al., 1997a; Schneider et al., 1997). Durch die Verbindung der N-terminalen Domänen von TRAILR4 mit TRAILR2, welche die erste CRD beider Rezeptoren enthält, können sich inaktive Rezeptorkomplexe bilden, so dass TRAILR4 die TRAIL-vermittelte Apoptose inhibiert (Smulski et al., 2013).

Der Rezeptor OPG wird neben DcR3 als einziger TNFR in löslicher Form exprimiert (Emery et al., 1998). OPG ist nicht nur ein Köderrezeptor für TRAIL, sondern auch für RANKL (receptor activator of nuklaer factor- κ B ligand, OPGL). Bindet RANKL an den agonistischen Rezeptor RANK, welcher auf Osteoklasten exprimiert wird, werden diese aktiviert und infolgedessen die Knochenresorption gesteigert (Schoppet et al., 2002). OPG steigert daher die Knochendichte durch Inhibition der Proliferation unreifer Osteoklasten (Simonet et al., 1997).

1.4 TRAIL-vermittelte intrazelluläre Signalwege

Die Mitglieder der TNFSF spielen eine bedeutende Rolle bei der Regulierung einer Vielzahl immunologischer Vorgänge im Körper. Aufgrund der fehlenden enzymatischen Fähigkeiten der TNFR werden intrazelluläre Signale durch Rekrutierung verschiedener Adapterproteine vermittelt. Die pleiotropen Liganden können neben Apoptose auch weitere Signalwege einleiten, wie die Aktivierung von NFκB, JNK und p38MAPK (Wajant et al., 2003). In den folgenden Kapiteln werden die TRAIL-vermittelte Apoptose und die NFκB-Aktivierung genauer beschrieben.

1.4.1 TRAIL-vermittelte Apoptose

Grundsätzlich kann zwischen verschiedenen Mechanismen, welche zum Zelltod führen, unterschieden werden: vor allem die Nekrose, der traumatische Zelltod, sowie die Apoptose, der programmierte Zelltod. Während der Apoptose schrumpft die Zelle, die DNA wird in Fragmente definierter Größe zerlegt und der Zellinhalt in leicht phagozytierbare apoptotische Vesikel verpackt, welche von Makrophagen entsorgt werden (Arends et al., 1990). Die Apoptose läuft entzündungsfrei und schnell ab, wodurch das umliegende Gewebe nicht beeinträchtigt wird. Im Gegensatz dazu kommt es bei Nekrose, z.B. nach Kontakt mit Toxinen, zum Anschwellen der Zelle. Diese entleert nach Verlust der Plasmamembranintegrität ihren Zellinhalt und es kommt zur Entzündung im umliegenden Gewebe.

Der Signalweg der Apoptose soll anhand der TRAIL-Todesrezeptoren erläutert werden. Nach der Aktivierung der TRAIL-Todesrezeptoren akkumulieren die zytoplasmatischen DDs der Rezeptoren und initiieren die Rekrutierung des Adapterproteins FADD (Fas-associated death domain) (Chinnaiyan et al., 1995; Boldin et al., 1996; Ashkenazi, Dixit, 1998). Das Protein FADD wiederum rekrutiert die Initiatorcaspasen-8 und -10 und es entsteht der DISC (death-inducing signaling complex) (Kischkel et al., 1995; Muzio et al., 1996). Im DISC kommt es aufgrund der räumlichen Nähe zur Dimerisierung von zwei Procaspasen, welche nach zweistufiger autoproteolytischer Prozessierung katalytisch aktive,

heterotetramere Moleküle bilden, die ins Zytoplasma freigesetzt werden (Salvesen, Dixit, 1999; Boatright et al., 2003).

Reife Caspase-8 prozessiert und aktiviert im Zytoplasma weitere sogenannte Effektorcaspasen, z.B. Procaspase-3. Diese Effektorcaspasen spalten im weiteren Verlauf der Apoptose verschiedene Proteine, u.a. Laminine und Zytokeratine. Dadurch werden diverse morphologische Veränderungen, welche letztendlich zum Zelltod führen, eingeleitet (Muzio et al., 1996). Caspase-3 und die verwandte Caspase-7 bauen z.B. das Enzym PARP (poly (ADP-ribose) polymerase 1), welches an der DNS (Desoxyribonukleinsäure)-Reparatur und der Transkription beteiligt ist, proteolytisch ab, um weitere Reparaturmechanismen auszuschalten (Kaufmann et al., 1993). Die beschriebene Signalkaskade kennzeichnet den extrinsischen Weg der Apoptose (Wajant et al., 2005). Der intrinsische Signalweg dagegen kann durch verschiedene intrazelluläre Stresssituationen, wie z.B. durch UV-Strahlen induzierte DNS-Schäden, aktiviert werden. Zusätzlich wird der intrinsische Apoptoseweg nach Caspase-8-abhängiger Spaltung des pro-apoptotischen Moleküls BID (Bcl-2 homology domain 3-interacting domain death agonist) zu tBID (truncated BID) aktiviert (Wajant et al., 2005). Das Protein tBID aktiviert nach Translokation ins Mitochondrium die pro-apoptotischen Proteine Bak (Bcl-2 antagonist/killer) und Bax (Bcl-2-associated X protein) (Chipuk et al., 2010). Diese wiederum bewirken die Freisetzung von Cytochrom C und anderen apoptotischen Signalproteinen wie SMAC/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI) aus den Mitochondrien (Cory et al., 2003). Cytochrom C, Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) und ATP (Adenosintriphosphat) bilden im Anschluss einen Proteinkomplex, das sogenannte Apoptosom (Kelley, Ashkenazi, 2004). Dieser katalytische Komplex bewirkt die Aktivierung der Procaspase-9, welche im weiteren Verlauf die Effektorcaspasen-3 und -6 prozessiert, wodurch der extrinsische mit dem intrinsischen Signalweg gekoppelt ist (Abbildung 2) (Li et al., 1997).

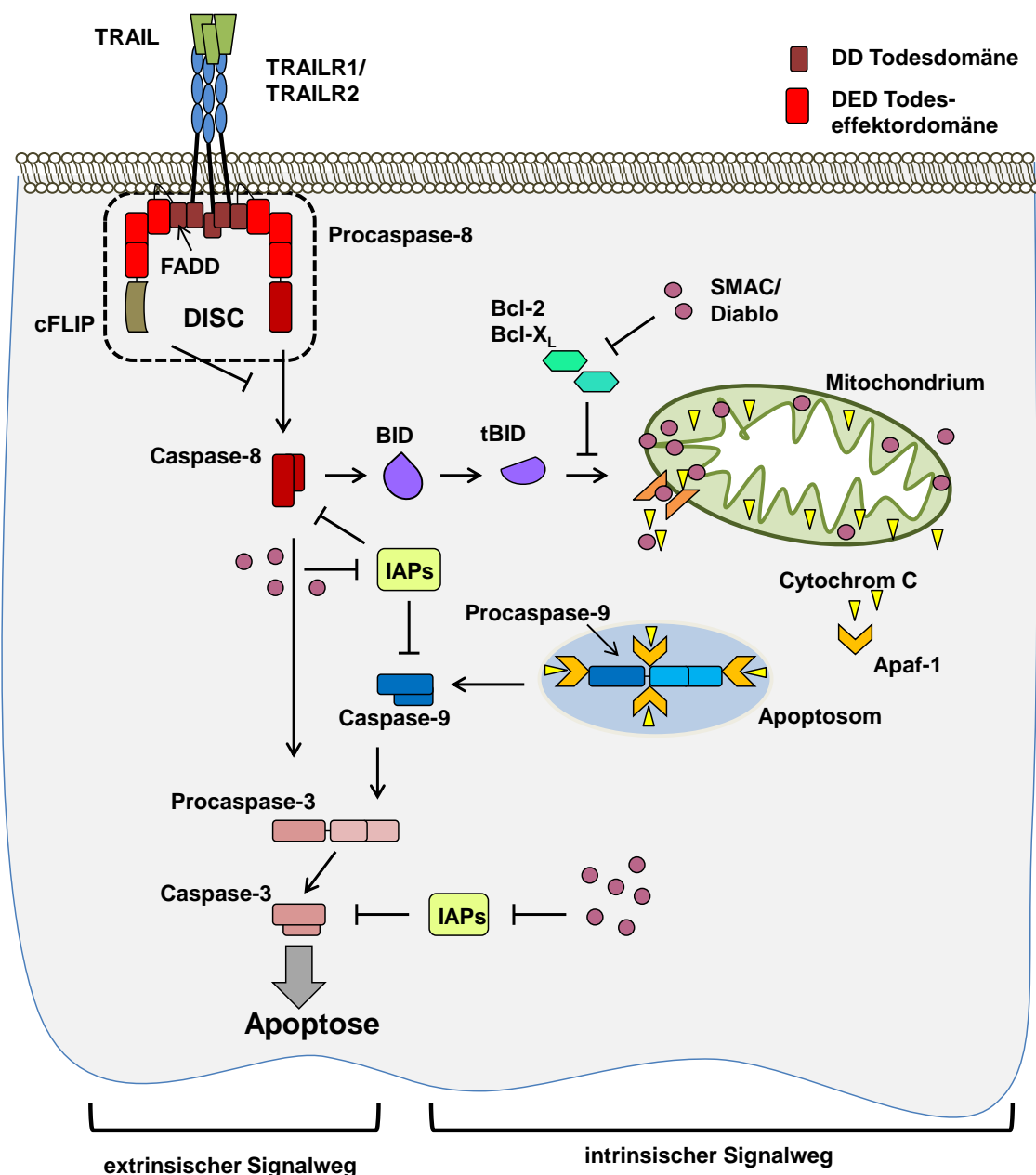


Abbildung 2: Die TRAIL-vermittelte Apoptose

Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalwegs der Apoptose und inhibitorischer Proteine.

1.4.2 Inhibitorische Proteine der Apoptose

Das apoptotische Signal kann auf verschiedenen Stufen der Signalkaskade durch inhibitorische Proteine reguliert werden. Ein Inhibitor der Todesrezeptor-induzierten Caspasekaskade ist das Protein cFLIP (cellular FLICE-like inhibitory

protein), welches in verschiedenen Spleißvarianten vorliegt (cFLIP_{Long} und cFLIP_{Short}), die jeweils N-terminal zwei Todes-Effektor-Domänen (death effector domain, DED) aufweisen (Thome et al., 1997; Irmeler et al., 1997). Die Proteine besitzen eine hohe Sequenzhomologie zur Caspase-8 und konkurrieren mit dieser um die Bindung an die DEDs von FADD im DISC. So wird die Rekrutierung von Caspase-8 verhindert, bzw. die Bildung inaktiver FLIP-Caspase-8-Dimere im DISC gefördert, so dass die proteolytische Aktivierung der Procaspase-8 verhindert und folglich die Apoptose unterbrochen wird (Irmeler et al., 1997).

Die IAPs umfassen eine weitere Gruppe von anti-apoptotischen Proteinen, dazu zählen u.a. cIAP1 (cellular IAP 1), cIAP2 und XIAP (X-linked IAP) (Lavrik et al., 2005). Mittels Anlagerung blockieren die IAPs die katalytischen Zentren von Caspasen und verhindern die Spaltung zellulärer Proteine während der Apoptoseinduktion (Danial, Korsmeyer, 2004). Die Mitglieder der IAP-Familie sind in der Lage an aktive Caspasen, Procaspasen sowie Initiator- und Effektorcaspasen zu binden (Roy et al., 1997). Die IAPs selbst werden durch pro-apoptotische Proteine, welche im Intermembranraum der Mitochondrien gespeichert sind, negativ reguliert. Dazu zählt das Protein SMAC/Diablo.

Die Bcl-2-Familie bildet eine weitere apoptoseregulierende Proteingruppe, welche sich aus 16 Mitgliedern zusammensetzt (Henshall, Engel, 2013). Davon besitzen fünf anti-apoptotische Eigenschaften: Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), Bcl-X_L (Bcl-2-like protein), Bcl-w (Bcl-2-like-2), Mcl1 (myleoid cell leukemia 1) und A1/Bff-1 (Bcl-2-related gene A1) (Cory et al., 2003). Weitere Mitglieder wie Bak und Bax vermitteln pro-apoptotische Signale. Charakteristisch für die anti-apoptotischen Proteine sind vier Bcl-2-Homologie Domänen und ein transmembraner Bereich, welcher die Moleküle beispielweise in der Membran von Mitochondrien verankert (Chipuk et al., 2010). Bcl-2 und Bcl-X_L binden die pro-apoptotischen Protein Bak und Bax und blockieren den intrinsischen Signalweg der Apoptose (Abbildung 2, S. 10) (Chipuk et al., 2010).

1.4.3 TRAIL-vermittelte NFκB-, JNK- und p38MAPK-Aktivierung

Neben Apoptose kann TRAIL, ebenso wie CD95L und TNF, weitere Signalwege stimulieren. Diese können zur Aktivierung von JNK, p38MAPK oder NFκB, welche Proliferation und Zelldifferenzierung induzieren, führen (Wajant et al., 2003; Varfolomeev et al., 2005). Durch Aktivierung der NFκB-Transkriptionsfaktoren werden anti-apoptotische Proteine, wie z.B. cFLIP, XIAP und Bcl-2-X_L, induziert, wodurch die Apoptose negativ reguliert wird (van Antwerp et al., 1998). Dies kann zur Apoptoseresistenz führen und damit in klinischer Hinsicht die toxische Wirkung von TRAIL beeinflussen (Almasan, Ashkenazi, 2003; Falschlehner et al., 2007).

Neben endogenen Stimuli wie TNFL und Interleukinen können auch exogene Stimuli wie Bakterien, Viren und UV-Strahlen den NFκB-Signalweg aktivieren. In inaktiver Form liegen Transkriptionsfaktoren der NFκB-Familie im Zytosol kovalent gebunden an inhibitorische Proteine der IκB (inhibitor of kappa B)-Familie vor, welche die NLS (Kernlokalisationssequenz) von NFκB maskieren (Verma et al., 1995). Werden die Rezeptoren TRAILR1 oder TRAILR2 durch TRAIL stimuliert, wird wie oben dargelegt das Adapterprotein FADD rekrutiert und es entsteht zusammen mit Procaspase-8 der DISC, wodurch Apoptose induziert wird. Zusätzlich kann sich aber nach Freisetzung von FADD und Caspase-8 im Zytosol auch ein zweiter Signalkomplex, bestehend aus Caspase-8, FADD, TRAF2 und der Kinase RIP1 (receptor interacting protein 1), bilden (Piras et al., 2011). Über Caspase-8, TRAF2 und FADD werden der JNK- und der p38MAPK-Signalweg aktiviert (Abbildung 3). RIP1, FADD und Caspase-8 aktivieren weiterhin Mitglieder der MAP3K-Familie (mitogen-activated protein kinase kinase kinase), wie z.B. NIK (NFκB-inducing kinase), MEKK1 (mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 1) oder MEKK2. Diese Kinasen aktivieren im weiteren Verlauf den IKK (IκB kinase)-Komplex (Zandi et al., 1997; Devin et al., 2000).

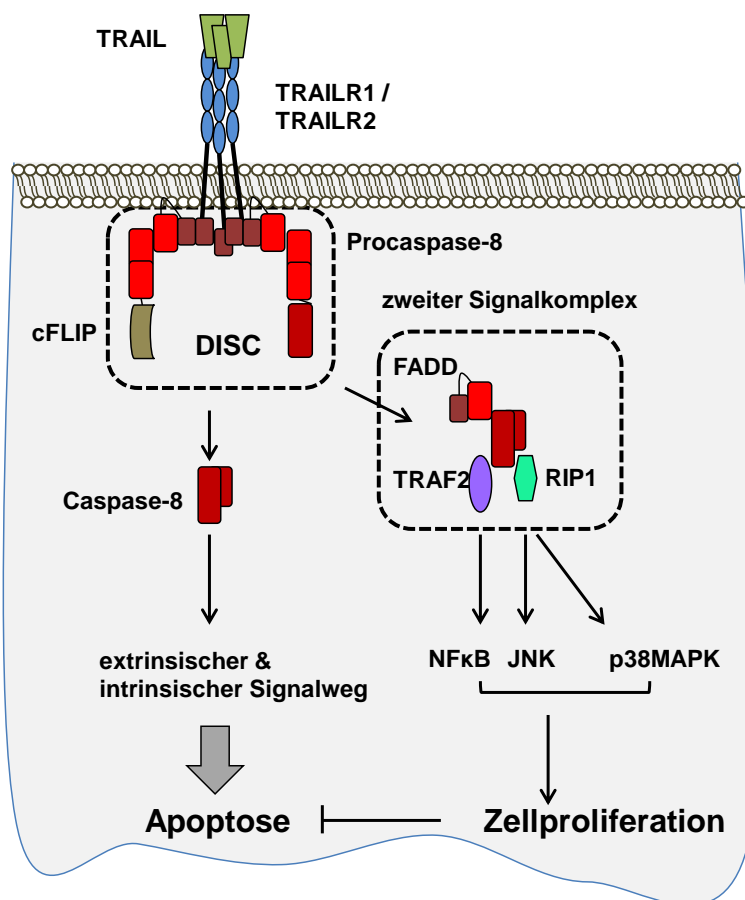


Abbildung 3: TRAIL-vermittelte Aktivierung alternativer Signalwege

Nach Anordnung eines zweiten Signalkomplexes im Zytosol werden NFκB, JNK und p38MAPK aktiviert.

Die Phosphorylierung von IκB-Proteinen durch den Enzymkomplex IKK löst nach Polyubiquitinylierung deren Degradation durch die 26S-Untereinheit des Proteasoms aus, wodurch letztendlich die NLS von NFκB demaskiert wird (Heller, Krönke, 1994; Skaug et al., 2009). Anschließend transloziert der Transkriptionsfaktor NFκB zum Zellkern und induziert die Transkription verschiedener Gene, die z.B. für IL8 (Interleukin 8), TNF und COX2 (Cyclooxygenase 2) kodieren (Beg et al., 1993; Verma et al., 1995).

1.5 Die Rolle von TRAIL im Immunsystem

Obwohl TRAIL ubiquitär im Gewebe vorzufinden ist, wird der Ligand nur von Zellen des Immunsystems exprimiert (Kelley, Ashkenazi, 2004). Dabei kommen dem Liganden verschiedene Aufgaben im Immunsystem zu. TRAIL ist wichtig für die zytotoxische Aktivität von dendritischen Zellen (DZ), natürlichen Killerzellen (NK) und CD4⁺ T-Lymphozyten (Takeda et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen nach Tumorkontakt verstärkt TRAIL exprimieren und folglich Apoptose in transformierten Kolonzellen induzieren können (Herbeuval et al., 2003). Zudem ist TRAIL an der Immunabwehr von Virusinfektionen beteiligt. Verschiedene Interferone induzieren nach Virenkontakt die Expression von TRAIL und fördern so den Zelluntergang infizierter Zellen (Almasan, Ashkenazi, 2003). Auch Monozyten vermitteln anti-tumorale Aktivitäten über die Expression von TRAIL, nachdem sie von verschiedenen Interferonen stimuliert wurden (Griffith et al., 1999).

Eine Vielzahl von Tumoren erlangt durch die Mutation des p53-Suppressorgens, welches in nicht-transformierten Zellen den Zellzyklus reguliert, ein apoptoseresistentes Stadium (Vogelstein et al., 2000). Therapien, basierend auf Liganden der TNFSF, vermitteln die Apoptose primär p53-unabhängig (Kelley, Ashkenazi, 2004). Allerdings kann die TRAIL-induzierte Apoptose in manchen Fällen durch p53-aktivierende Agenzien verstärkt werden, da der TRAILR2 stark durch p53 induziert wird. Verschiedene Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren die selektive Toxizität von rekombinantem TRAIL auf veränderte Zellen *in vitro* und *in vivo* verdeutlicht. Lösliches TRAIL induziert z.B. auf einer Vielzahl von Tumorzellen p53-unabhängig Apoptose, unterdrückt das Tumorwachstum in xenotransplantierten Mäusen und ruft nur unwesentliche Nebenwirkungen in Affen und Mäusen hervor (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass lösliches TRAIL in Mäusen, Javaneraffen und Schimpansen in Kombination mit Chemotherapeutika keine unerwünschten toxischen Reaktionen auslöst (Ashkenazi et al., 1999). In weiteren Studien wurde eine Toxizität von TRAIL gegenüber menschlichen Hepatozyten beobachtet, allerdings waren diese auf hochaggregierte rekombinante TRAIL-Varianten zurückzuführen (Lawrence et al.,

2001; Koschny et al., 2007). In Phase I einer klinischen Studie wurden an malignen Neubildungen erkrankte Patienten mit rekombinatem löslichem TRAIL therapiert. Dabei wurden bei *in vitro* effektiven apoptotischen Dosen von TRAIL nur mäßige Nebeneffekte hervorgerufen (Herbst et al., 2010). Allerdings sind auch die therapeutischen Effekte eher gering. Letzteres, aber eventuell auch die gute Verträglichkeit von löslichem TRAIL, könnten durch den Umstand bedingt sein, dass lösliches TRAIL, im Gegensatz zu Membran-TRAIL, den TRAILR2 nur sehr schlecht aktiviert.

1.6 CD40 und sein Ligand CD40L

1.6.1 CD40

Der Rezeptor CD40 zählt zur Gruppe der Nicht-Todesrezeptoren der TNFSF, seine genetische Information ist auf dem Chromosom 20 im Bereich q11–q13 lokalisiert (Gordon, 1995). Der extrazelluläre Bereich des Rezeptors beinhaltet vier CRDs, wobei nur CRD2 und CRD3 an der Ligandenbindung beteiligt sind (Naismith et al., 1995; An et al., 2011). Zunächst membrangebunden exprimiert ist CD40 nach proteolytischer Prozessierung auch in löslicher Form vorzufinden (Bodmer et al., 2002). Der Rezeptor ist auf antigenpräsentierenden Zellen (APZ), auf hämatopoetischen Progenitorzellen (CD43⁺), auf Thymuszellen und auf Epithelzellen nachweisbar (Alderson et al., 1993; Banchereau et al., 1994; van Kooten, Banchereau, 1996; Eliopoulos et al., 2000; Vonderheide, 2007). Außerdem wird CD40 von fast 100 % malignen B-Zellen und von 75 % epithelialen sowie soliden Tumoren exprimiert (Gordon, 1995; Vonderheide, 2007). CD40 spielt eine bedeutende Rolle in der T-Zell-abhängigen B-Zell-Aktivierung und ist notwendig für die Entwicklung der humoralen und zellulären Immunantwort (Grell et al., 1999). Dabei führt die CD40-vermittelte B-Zell-Aktivierung zur Proliferation, zum Isotypenwechsel, zur Bildung von Keimzentren und zur Generierung von Gedächtniszellen (Noelle, 1996).

1.6.2 CD40L

Der CD40L (CD154) zählt zu den Liganden der TNFSF und wird als TypII-Transmembranprotein exprimiert (Banchereau et al., 1994). CD40L liegt zelloberflächengebunden sowie löslich vor. Beide Formen sind meist als nicht-kovalente Homotrimere nachweisbar (Smulski et al., 2013). Exprimiert wird CD40L überwiegend von aktivierten T-Lymphozyten und Thrombozyten, wobei der Ligand in geringen Mengen auch auf NK, Monozyten und aktivierten CD8⁺-Zellen nachweisbar ist (van Kooten, Banchereau, 2000; Vonderheide, 2007).

1.7 CD40-vermittelte intrazelluläre Signalwege

CD40 besitzt, wie alle Rezeptoren der TNFSF, keinerlei enzymatische Aktivität und löst folglich über Rekrutierung nachgeschalteter Adapterproteine intrazelluläre Signale aus (van Kooten, Banchereau, 1996). Nach ligandenabhängiger Rezeptoroligomerisierung lagern sich Adapterproteine der TRAF-Familie, wie z.B. TRAF1, 2, 3, und 6 oder das Enzym JAK3 (Janus Kinase 3) an die zytoplasmatische Domäne des CD40 an. Im Folgenden kommt es über weitere Signalproteine und Kinasen zur Aktivierung von NFκB, p38MAPK, JNK und ERK (extracellular regulated kinase), wodurch die Transkription einer Vielzahl von Genen induziert wird (Abbildung 4) (Rothe et al., 1995; Noelle, 1996; van Kooten, Banchereau, 1996; Pullen et al., 1999; Vonderheide, 2007). Nach Aktivierung von NFκB kommt es u.a. zur Transkription immunmodulatorischer und anti-apoptotischer Moleküle.

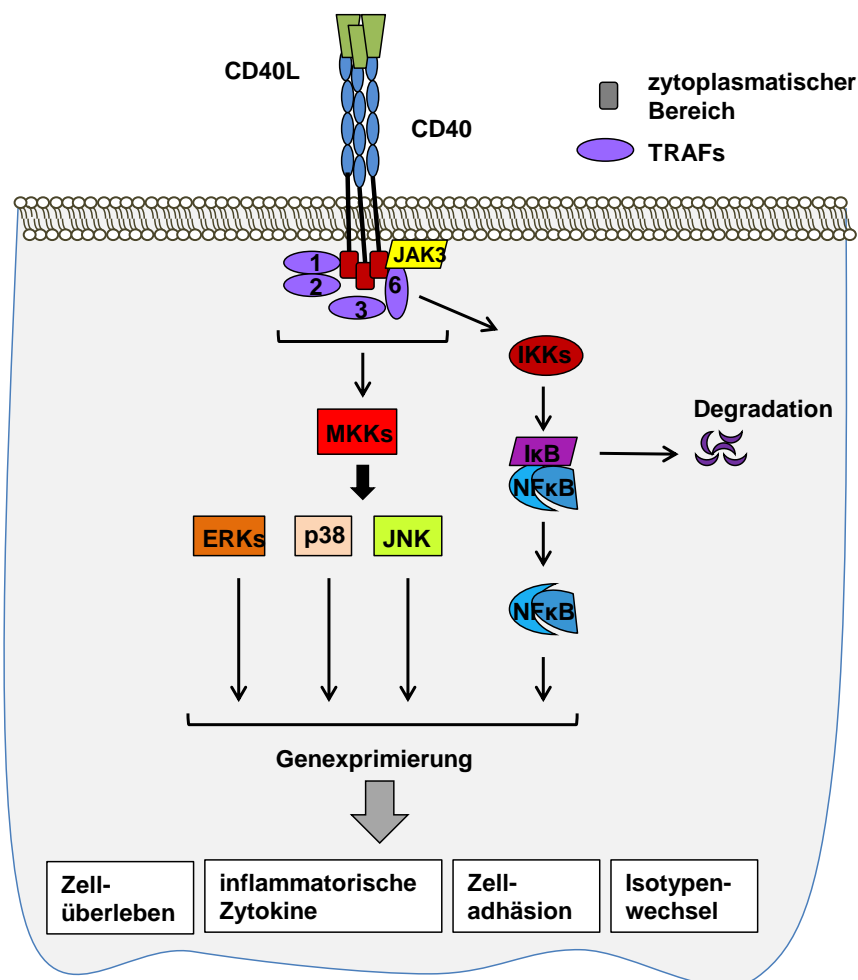


Abbildung 4: CD40-vermittelte intrazelluläre Signalwege

1.8 Die Rolle von CD40 im Immunsystem

Aufgrund seiner weiten Gewebeerbreitung spielt CD40 sowohl bei der humoralen, als auch bei der zellulären Immunantwort eine bedeutende Rolle (Vogel, Noelle, 1998). Die Aktivierung von CD40 auf T-Helferzellen führt zur Stimulierung von APZ und damit zur Stimulierung des adaptiven Immunsystems. CD40-stimulierte unreife DZ, welche zu den APZ zählen, werden zur Proliferation angeregt, exprimieren kostimulatorische Moleküle und aktivieren vermehrt T-Zellen (van Kooten, Banchereau, 2000; Smulski et al., 2013). Die aktivierten T-Zellen wiederum stimulieren mittels CD40L B-Zellen zur Proliferation und Antigenpräsentation (Schultze, Johnson, 1999). Die Rolle des CD40-CD40L-

Systems in der humoralen Immunabwehr wird anhand des HIGM (Hyper-IgM-Syndrom) deutlich (Allen et al., 1993; van Kooten, Banchereau, 2000). Bei Typ I dieses primären Immundefekts kommt es aufgrund eines Mangels an CD40L zur fehlenden/reduzierten Stimulierung von B-Zellen, folglich zu einem Mangel an Immunglobulinen und zu einer damit einhergehenden Immunschwäche. Die neoplastischen Riesenzellen des Hodgkin-Lymphoms, sogenannte Reed-Sternberg-Zellen, befinden sich in einem inflammatorischen, apoptoseresistenten Stadium (Annunziata et al., 2000). Dieses kann in manchen Fällen auf eine CD40-vermittelte Aktivierung von NF κ B und die damit einhergehende Transkription inflammatorischer Zytokine zurückgeführt werden (Annunziata et al., 2000). In präklinischen Modellen kann durch die Blockade von CD40-CD40L-Interaktionen einer Vielzahl von T-Zell-vermittelten Autoimmunkrankheiten vorgebeugt werden (Vogel, Noelle, 1998).

CD40 vermittelt abhängig von der Zellart und der Umgebung Signale zum Zellüberleben oder zur Induktion des Zelltods (Heath et al., 1993; Eliopoulos et al., 2000; Vonderheide, 2007). Es wurde gezeigt, dass einige Tumorzelllinien autochrine CD40-CD40L-Signalwege nutzen, um eine Resistenz gegenüber TNF α -vermittelter Apoptose zu erlangen (Voorzanger-Rousselot, Blay, 2004). Auch ist bekannt, dass mAb (monoklonale Antikörper) für CD40 agonistische Fähigkeiten besitzen können und so die Reifung von DZ zu stimulieren vermögen (Diehl et al., 1999). Derzeit wird versucht, um den synergistischen Effekt von CD40 zu nutzen, einerseits toxisch auf Tumorzellen zu wirken und andererseits das Immunsystem zu aktivieren. Schon früh konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass CD40 *in vivo* die Immunsuppression einiger Tumore aufhebt und T-Zell-vermittelte anti-tumorale Immunantworten induziert (Schoenberger et al., 1998; Diehl et al., 1999). Eine weitere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass ein CD40-spezifisches Antikörperfragment, im Folgenden als scFv (single chain variable fragment):CD40 bezeichnet, *in vivo* sowohl in Mäusen als auch in Menschen den Rückgang von Pankreastumoren bewirkt (Beatty et al., 2011). Bis heute haben verschiedene monoklonale Antikörper und Antikörperfragmente für CD40 klinische Studien erreicht: u.a. lucatumumab, dazetuzumab, CP-870,893 und Chi Lob 7/4 (Vonderheide, 2007; Khubchandani et al., 2009; Bensinger et al.,

2012). Das antagonistische lucatumumab wurde entwickelt, um die Aktivierung anti-apoptotischer Signale zu unterdrücken. Die Reagenzien CP-870,893, dazetuzumab und Chi Lob 7/4 dagegen sollen, wie auch in dieser Arbeit beabsichtigt, agonistisch wirken und die Immunität von Tumoren aufheben (Vonderheide, 2007).

1.9 Ziel der Arbeit

In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die geringe Bioaktivität löslicher TNFL gegenüber ihren korrespondierenden Rezeptoren durch deren Verankerung an die Zelloberfläche mithilfe einer Zelloberflächenantigen-erkennenden Antikörperdomäne (scFv) gesteigert werden kann (Samel et al., 2003; Bremer et al., 2004; Wyzgol et al., 2009). Ziel dieser Arbeit war es daher, durch Generierung eines CD40-bindenden scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsproteins die zytotoxische Aktivität von löslichem TRAIL lokal auf Tumorzellen zu begrenzen und gleichzeitig seine Bioaktivität zu erhöhen.

Zusätzlich sollte ein solches Fusionsprotein auf bifunktionelle Fähigkeiten untersucht werden, d.h. es sollte analysiert werden, ob es Zellen des Immunsystems CD40-abhängig stimuliert.

2 Materialien

2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien

β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid (30 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumpersulfat)	AppliChem, Darmstadt
Anti-Flag M2-Affinity Gel	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie-Färbelösung	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
CHX (Cycloheximid)	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe
DMEM Medium	PAA, Pasching, Österreich
Essigsäure	J.T. Baker, Leipzig
Ethanol	J.T. Baker, Leipzig
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
Flag-Peptid	Sigma, Deisenhofen
FCS (Fötale Kälberserum)	PAA, Pasching, Österreich
Methanol	J. T. Baker, Leipzig
Milchpulver	Sigma, Deisenhofen
Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin)(100 x)	PAA, Pasching, Österreich
Phosphataseinhibitor II	Sigma, Deisenhofen
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
RPMI-1640 Medium	PAA, Pasching, Österreich
Silbergelmarker	Ge Healthcare, Garching
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Sigma, Deisenhofen
Tris	Carl Roth, Karlsruhe

Trypsin/EDTA-Lösung (10 x)	PAA, Pasching, Österreich
TWEEN-20	Carl Roth, Karlsruhe
zVAD-fmk	Bachem, Heidelberg

2.2 Antikörper und Antiseren

Anti-Caspase 3	Maus monoklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Anti-Caspase 8	Maus monoklonal	Schulze-Osthoff, Düsseldorf
Anti-Caspase 9	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Anti-FAK (focal adhesion kinase)	Kaninchen monoklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Anti-Flag M2	Maus monoklonal	Sigma, Deisenhofen
Anti-IL8 (OptEIA ELISA)		BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Kaninchen-HRP	Kaninchen polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup Dänemark
Anti-Kaninchen-HRP	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Anti-Maus HRP	Kaninchen polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup Dänemark
Anti-Maus IgG-PE	Ziege polyklonal	Sigma, Deisenhofen
Anti-PARP	Maus monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-RIP	Maus monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Tiam1 (T-Zell Lymphom Invasion und Metastasierung 1)	Kaninchen monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Tubulin	Maus monoklonal	Dunn Labortechnik, Ansbach

2.3 Eukaryotische Zellen

Alle verwendeten humanen Zelllinien waren in der Arbeitsgruppe vorhanden.

HEK293	embryonale Nierenzelllinie
HeLa/HeLa-CD40	Zervixkarzinomzelllinie
HT1080/HT1080-CD40	Fibroblastenzelllinie (Fibrosarkom)

2.4 Plasmide

Die Expressionsplasmide, die für die verwendeten Fusionsproteine scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL, scFv:CD40-Flag-scTRAIL und scFv:CD40-Fc-Flag-GpL kodieren, wurden von den Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Inneren Medizin des Universitätsklinikum Würzburg hergestellt und kloniert. Das scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsprotein wurde eigenständig in stabil transfizierten und transient transfizierten HEK293-Zellen produziert.

2.5 Lösungen und Puffer

Assay Diluent	1 x PBS 10 % FCS
Blotpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol pH 8,3
Coating Buffer	0,1 M Natriumcarbonat, pH 9,5
Kristallviolettlösung	20 % Methanol 0,5 % Kristallviolett
Laufpuffer SDS-Page	50 mM Tris 380 mM Glycin 4 mM SDS pH 8,3
PBS (phosphate buffered saline)	20 mM Na-Phosphat 0,7 % NaCl pH 7,2
PBS-TWEEN	1 x PBS 0,05 % Tween-20

PBST-Milch	1 x PBS 0,05 % Tween-20 5 % Magermilchpulver
Probenpuffer SDS-Page 4x	10% Glycerin 0,1 M Tris 1 % SDS 0,1 M DTT pH 8,0 Bromphenolblau
Sammelgelpuffer SDS-Page	0,5 M Tris 0,015 M SDS pH 6,8
Trenngelpuffer SDS-Page	1,5 M Tris 0,015 M SDS pH 8,8
TBS (tris buffered saline)	0,02 m Tris 8 % NaCl pH 7,6
TBS-TWEEN	TBS 0,05 % Tween-20

2.6 Geräte, Verbrauchsmaterialien

Agfa Curix 60 Entwicklermaschine	Agfa, Düsseldorf
Elisa-Reader Lucy 2	Anthos Labtec, Krefeld
EVOS Digital Inverted Microscope	AMG, Mill Creek, USA
Gelllaufkammern SDS-PAGE	PeqLab, Erlangen
Gelllaufkammern SDS-PAGE	BioRad, München
Heizblock	PeqLab, Erlangen
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Odyssey Imager	LI-COR, Bad Homburg
Neuerbauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Nitrocellulosemembran	Whatman, Dassel
Semi-Dry-Blotkammer	PeqLab, Erlangen
Thermo Cellject Pro	Electron Corporation
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Optima-L70	Beckmann Coulter, Krefeld
Well-Platten	Greiner, Frickenhausen

Wet-Blotkammer	PeqLab, Erlangen
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturpetrischalen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturschrank Haereus Cell Safe	Haereus, Hanau
Zellschaber	SPL Life sciences Inc., Pocheon-Si, Korea
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich, Tuttlingen

2.7 Kits

OptEIA® IL8-ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg
PageSilver™ Silver Staining Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Pierce® Silver Stain Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien

3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle verwendeten adhärenenten Zelllinien wurden in RPMI-1640 Zellkulturmedium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS (30 min, 56 °C) bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen nach Spülung mit PBS für wenige Minuten mit Trypsin (0,025 %) und EDTA (10 mM) inkubiert und abgelöst. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:4 bis 1:10 gesplittet und im Anschluss wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt und definierte Zellzahlen für die verschiedenen Experimente eingesetzt.

3.1.2 Konservierung eukaryotischer Zellen

Zur längerfristigen Lagerung einer Zelllinie wurden die Zellen kryokonserviert. Hierfür wurde das Zellpellet nach dem Ernten in FCS mit 10 % DMSO aufgenommen und in einem Kryoröhrchen bei –80 °C gelagert.

3.2 Produktion rekombinanter Proteine

3.2.1 Produktion rekombinanter Proteine durch transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Zur Produktion des scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsproteins wurden HEK293-Zellen in 800 µl RPMI-1640 mit 10 % FCS und 1 x Pen/Strep resuspendiert und zusammen mit 40 µg Plasmid-DNA in Küvetten (4 mm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 250 V, 1800 µF und maximalem Widerstand. Im Anschluss wurden die Zellen über Nacht in Zellkulturplatten in 20 ml RPMI-1640 mit 10 % FCS und 100 µg/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin (PAA) im Inkubator kultiviert. Dann wurden die Zellen für weitere 5-7 Tage in 20 ml RPMI-1640 mit 2 % FCS und 1 x Pen/Strep inkubiert. Nach

Abzentrifugieren der Überstände für 10 min bei 4000 rpm wurden diese bei 4 °C gelagert.

3.2.2 Produktion rekombinanter Proteine mithilfe stabil transfizierter HEK293-Zellen

Mitarbeiter der Abteilung für Molekulare Innere Medizin des Universitätsklinikums Würzburg klonierten das Expressionsplasmid für das rekombinante Fusionsprotein scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL und haben es stabil in HEK293-Zellen transfiziert. Im Anschluss wurde das Protein von mir mithilfe dieser HEK293-Zellen produziert. Die stabil transfizierten Zellen wurden für 48 h in 20 ml RPMI-1640 mit 10 % FCS auf Zellplatten kultiviert. Anschließend wurden sie für fünf bis sechs Tage in 20 ml RPMI-1640 mit 2 % FCS weiterkultiviert. Nach Abnahme des Zellüberstandes wurden die verbleibenden Zellen durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 4000 rpm entfernt. Die Konzentration des rekombinanten Proteins im Überstand wurde mittels Western Blot-Analyse durch Vergleich mit entsprechenden Proteinstandards ermittelt.

3.3 Aufreinigung rekombinanter Proteine durch Affinitätschromatographie

Mittels anti-Flag Affinitätschromatographie wurden die rekombinanten Flag-markierten Konstrukte aus den Zellkulturüberständen aufgereinigt. 1 ml des hierfür verwendeten Anti-Flag M2 Affinity Gels (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) bindet 600 µg Protein. Anhand dieser Angabe konnte das benötigte Säulenvolumen des Affinity-Gels bestimmt werden. Die gewaschenen (2 x) M2-Agarosebeads wurden in einer Glassäule gepackt und der zuvor zentrifugierte Zellkulturüberstand wurden zusammen mit 0,15 M NaCl aufgetragen. Mit einer Durchflussrate von 0,5 ml/min wurde der Überstand bei 4 °C vollständig über die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 10-fachem Säulenvolumen an TBS gespült, um die nicht gebundenen Proteine zu entfernen. Durch Konkurrenz wurden die an das Flag-Peptid gebundenen Proteine mit 100 µg/ml Flag-Peptid-Lösung in TBS eluiert. Das Eluat enthielt die gereinigte Proteinfrak-

tion. Das überschüssige Flag-Peptid wurde mittels Dialyse gegen eine zweimal erneuerte PBS-Lösung entfernt. Zum Abschluss wurde das gereinigte Protein steril filtriert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Konzentration des aufgereinigten Proteins wurde mittels Western Blot oder Silberfärbung bestimmt.

3.4 Zytotoxizitätsassay

Die zytotoxische Wirkung der Fusionsproteine wurde vergleichend auf WT (Wildtyp)-Zellen und CD40-transfizierten Zellen untersucht. Hierfür wurden auf einer 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte jeweils 2×10^4 Zellen/Well der adhären Zelllinien HeLa und HeLa-CD40 oder HT1080 und HT1080-CD40 ausgesät und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen teilweise eine halbe Stunde mit CHX zur Sensitivierung für die TRAIL-induzierte Apoptose vorstimuliert. Anschließend wurden zu den Zellen die zytotoxischen Reagenzien entweder in sequentieller Verdünnung oder in konstanten Konzentrationen zugegeben. Nach 16 h Inkubation über Nacht wurde am nächsten Tag das Zellüberleben mittels Kristallviolett färbung bestimmt. Hierfür wurde der Überstand abgeschüttet und die Zellen für 30 min mit $60\text{ }\mu\text{l}$ Kristallviolettlösung inkubiert. Im Anschluss wurden die Mikrotiterplatten mehrmals mit Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Nach Zugabe von $150\text{ }\mu\text{l}$ Methanol/Well wurde die Anzahl der lebenden Zellen im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt.

3.5 Bestimmung der IL8-Produktion

Zur Bestimmung der IL8-Produktion wurden im Vergleich 2×10^4 parentale HeLa-Zellen und CD40-transfizierte HeLa-Zellen sowie parentale und CD40-transfizierte HT1080-Zellen auf 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Nach 6 h wurde der Überstand abgenommen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die 96-Well ELISA-Mikrotiterplatten wurde mit dem Capture-Antibody 1:250 in Coating Buffer (100 mM NaHCO_3 ; $336\text{ mM Na}_2\text{CO}_3$; pH 9,5) versehen und über

Nacht bei 4 °C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die Platten nach mehrmaligem Waschen mit PBS-T für 1 h bei RT mit 200 µl/Well Biotinylated Anti-Human IL8-Antikörper 1:250 in Assay Diluent (PBS; 10 % FCS) geblockt und mit PBS-T (3 x) gewaschen. Anschließend wurden jeweils 100 µl/Well Proben oder IL8-Standardlösungen aufgetragen und für 2 h bei RT inkubiert. Es folgte wiederum Waschen (5 x) mit PBS-T. Im Anschluss wurden die Mikrotiterplatten noch 1 h bei RT mit 100 µl/Well des Working-Detektor Avidin-horseradish Peroxidase 1:250 in Assay Diluent (PBS; 10 % FCS) versehen und in PBS-T (7 x) gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl/Well des Substrate-Buffer-Reagent (16,7 mg/ml Buffer:1 mg/ml Substrat) konnte die IL8-Produktion im ELISA-Reader bei 405 nm bestimmt werden.

3.6 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden die adhärenen Zelllinien in gewünschten Mengen auf Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach teilweiser Vorstimulation mit CHX mit scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Nach 6 h, wenn bei ca. der Hälfte der Zellen der Zelltod eingetreten war, wurden die Zellen auf Eis mithilfe von Zellschabern geerntet. Nach Spülen mit 4 °C kaltem PBS wurden die Zellen in Falcons aufgenommen und bei 1200 rpm für 4 min bei 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet direkt in 4 x Lysispuffer, der mit Phosphatase- und Proteaseinhibitor-Cocktail versetzt wurde, aufgenommen, für 20 Sekunden sonifiziert und bei 95 °C 5 min aufgeköcht. Vor der Lagerung bei -20 °C wurden die Zelllysate 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Für die Western Blot-Analyse wurden die Zelllysate mit 4 x Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht.

3.7 Western Blot

3.7.1 SDS-Page

Durch die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteine der Zelllysate nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die hierfür verwendete Trenngellösung (375 mM Tris pH 8,8; 3,75 mM SDS; 0,1 % APS) wurde mit 12 % Acrylamid versetzt. Die Polymerisation des Acrylamids wurde durch Zugabe von 0,1 % TEMED gestartet. Das Sammelgel (125 mM Tris pH 6,8; 3,75 mM SDS; 0,1 % APS mit 6 % Acrylamid und 0,1 % TEMED) wurde auf das auspolymerisierte Trenngel geschichtet und mit dem gewünschten Kamm versehen. Nach Beladung der Gele mit Proben und dem entsprechenden Proteinmarker, wurde die Elektrophorese bei 90-120 Volt für 90 min in SDS-Laufpuffer (50 mM Tris; 4 mM SDS; 380 mM Glycin; pH 8,3) gestartet.

3.7.2 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese mittels Elektrottransfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierfür wurden die Nitrozellulosemembran und das Whatman-Filterpapier in Blotpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % Methanol; pH 8,3) getränkt und wie folgt mit dem Gel in der Blotkammer geschichtet:

Anode -- 2 Blatt Whatman-Filterpapier -- Nitrocellulosemembran -- Gel -- 2 Blatt Whatman-Filterpapier -- Kathode.

Der Proteintransfer erfolgte entweder in einer senkrechten wet-Blotkammer (PeqLab, Erlangen) oder in einer horizontalen semi-dry-Blotkammer (PeqLab, Erlangen) bei 1,5 mA pro cm² Gelfläche für 90-120 min.

3.7.3 Immundetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurden zunächst die freien unspezifischen Bindungsstellen mit einem Blocking-Puffer (PBST/TBST; 5 % Milchpulver) für 1 h auf dem Schüttler geblockt. Anschließend wurde die Membran nach Waschen (3 x) mit PBST, bzw. TBST über Nacht bei 4 °C in PBST/TBST mit dem proteinspezifischen Primärantikörper

inkubiert. Am nächsten Tag folgte nach weiteren Waschschritten (3 x 5 min) die Inkubation mit dem entsprechenden Zweitantikörper in PBST/TBST für 1 h bei RT auf dem Schüttler. Nach erneutem Waschen (3 x) wurde die Membran mit den zwei Reagenzien des ECLTM-Systems im Verhältnis 1:1 für 1 min inkubiert und im Anschluss in der Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm-Fotoentwickler (Kodak, Amersham) detektiert. Die Dauer der Belichtungszeit der Membran wurde abhängig von der Signalstärke des Antikörpers gewählt.

3.8 Silberfärbung

Zur Bestimmung der Konzentration und zum Nachweis der Reinheit wurde das produzierte Fusionsprotein nach der Aufreinigung mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Anschluss durch Silberfärbung detektiert. Das Eluat wurde in drei verschiedenen Konzentrationen zusammen mit einem Proteinstandard auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die darin enthaltenen aufgereinigten Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Es folgte die Benetzung mit den verschiedenen Reagenzien aus dem Pierce® Silver Stain Kit. Alle Schritte liefen bei RT auf dem Schüttler ab. Nach Waschen (2 x 5 min) in destilliertem Wasser wurde das Gel zweimal für 15 min mit einer Fixierlösung (destilliertes Wasser, 30 % Ethanol, 10 % Essigsäure) behandelt. Dann wurde das Gel nach Waschen (2 x) in destilliertes Wasser mit 10 % Ethanol und Waschen (2 x) in destillierten Wasser mit der Sensitizer Working Solution (50 µl Sensitizer, 25 ml Wasser) 1 min inkubiert und wiederum in destilliertem Wasser (2 x 1 min) gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 30 min mit der Silbernitratlösung Stain Working Solution (0,5 ml Enhancer, 25 ml Stain) benetzt. Zum Abschluss erfolgte nach Waschen (2 x) in destilliertem Wasser durch Zugabe der Entwicklerlösung für 2-3 min (0,5 ml Enhancer, 25 ml Developer) die Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber. Mit der Stopp-Lösung (destilliertes Wasser, 5 % Essigsäure) wurde nach Färben der Banden die Entwicklungsreaktion gestoppt. Mithilfe von Angaben des Herstellers eines gleichfalls aufgetragenen Proteinstandards konnte nun durch Intensitätsvergleich die Konzentration des aufgereinigten Proteins bestimmt werden.

3.9 Nachweis zytotoxischer Aktivität am digitalen Lichtmikroskop

Zum Nachweis der zytotoxischen Wirkung von scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL auf CD40-transfizierten Zellen wurden jeweils 4×10^6 HeLa, HeLa-CD40, HT1080 und HT1080-CD40-Zellen in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ in RPMI-1640 mit 10 % FCS inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen nach teilweiser Vorstimulation mit CHX mit dem Fusionsprotein scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL in den angegebenen Konzentrationen stimuliert oder blieben unbehandelt. Nach 6 h wurde der zytotoxische Effekt des Proteins durch Lagerung auf Eis gestoppt und Bilder am digitalen Lichtmikroskop (Evos Digital Inverted Microscope, AMG, Mill Creek) in 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

4 Ergebnisse

Wie bereits in 1.5 ausführlich dargelegt wurde, konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die geringe Aktivität löslicher, trimerer TNFL, u.a. von TRAIL und CD95L, auf verschiedene Wege gesteigert werden kann. Dazu zählen:

- 1.) die Stabilisierung der trimeren Molekülanordnung über kovalente Bindungen (Kammerer et al., 1998; Berg et al., 2007; Wyzgol et al., 2009)
- 2.) die Oligomerisierung mittels quervernetzender Antikörper (Wajant et al., 2001; Holler et al., 2003)
- 3.) die immobilisationsabhängige Aktivierung löslicher TNFL mithilfe von Zelloberflächenantigen-erkennenden Antikörperdomänen (Wajant et al., 2001; Samel et al., 2003).

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung der stabilisierenden TNC (Tenascin-C)-Domäne und der CD40-restringierten Zelloberflächenimmobilisierung für die Bioaktivität des löslichen TRAIL untersucht werden. Dabei war eine wichtige Voraussetzung, dass TRAIL-Todesrezeptoren durch lösliches trimeres TRAIL schlechter aktiviert werden als durch die membranständige Form des Liganden (Wajant et al., 2001). CD40 wurde als Zielstruktur für die artifizielle Zelloberflächenimmobilisierung ausgewählt, da dieser TNFR auf einigen Tumorzellen sehr stark exprimiert wird (van Kooten, Banchereau, 1996; Eliopoulos et al., 2000).

4.1 Generierung rekombinanter TRAIL-Fusionsproteine

Bei der Generierung rekombinanter TNFL-Fusionsproteine, insbesondere auch von TRAIL-Fusionsproteinen, ist ausschlaggebend, dass das Protein die extrazelluläre Domäne des TNFL umfasst, welche die charakteristische THD beinhaltet. Die THD vermittelt, wie schon in 1.1 beschrieben, die Molekültrimerisierung und die Rezeptorbindung (Wiley et al., 1995). Außerdem verfügten die verwendeten Konstrukte N-terminal über ein Flag-Epitop, welches durch Bindung des Flag-spezifischen Antikörper M2 nachgewiesen werden kann. Dieser Flag-tag wurde auch zur Aufreinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie genutzt. Zudem beinhaltet das Fusionsprotein die TNC-Domäne, welche

durch Ausbildung von Disulfidbrücken die trimere Molekulanordnung stabilisiert und damit die Bildung missgefalteter, inaktiver Molekülaggregate verhindert. Durch Fusionierung von TRAIL mit der scFv-Antikörperdomäne eines humanen Immunglobulins, das human CD40-spezifisch ist, sollte die immobilisationsabhängige Steigerung der Aktivität des löslichen TRAIL erzielt werden. Das Prinzip dieser rekombinanten Proteine besteht darin, dass durch die Erkennung und anschließende Bindung der CD40-spezifischen Antikörperdomäne an den plasmamembranständigen Rezeptor CD40 das löslich produzierte TRAIL-Fusionsprotein die Funktion der membranständigen Ligandenform mimikriert. Zusammengefasst setzt sich das im Folgenden als scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL bezeichnete Fusionsprotein aus dem N-terminalen Antikörperfragment scFv:CD40, dem Flag-Peptid, der TNC-Domäne und dem extrazellulären Bereich des humanen TRAIL zusammen (Abbildung 5).



Abbildung 5: Schematischer Aufbau des scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsproteins

Einzelne Domänen des Konstrukts: CD40-spezifisches Einzelketten-Antikörperfragment scFv:CD40 (252 AS); Flag-Peptid (DYKDDDDK); TNC (Tenascin-C)-Domäne des Huhns (110-139 AS); THD (TNF-Homologie Domäne) des humanen TRAIL (95-281 AS).

4.2 Produktion und Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL

Ein Expressionsplasmid, kodiert für das Fusionsprotein scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL, wurde von Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Innere Medizin kloniert und zur Verfügung gestellt. Das Fusionsprotein wurde nach transienter Transfektion von HEK293-Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA in den Zellkulturüberstand sekretiert. Zusätzlich wurde das Fusionsprotein mittels stabil-transfizierter HEK293-Zellen gewonnen. Die Ausbeute der Produktion des Fusionsproteins wurde mittels SDS-Page und anschließender Western Blot-Detektion bestimmt. Dabei wurden Konzentrationen zwischen 1,5 µg/ml bis 2,3

$\mu\text{g/ml}$ im Zellüberstand erreicht. Die Zellüberstände wurden weiter mittels Affinitätschromatographie über Agarosesäule aufgereinigt, worauf der Flag-spezifische Antikörper M2 gekoppelt war. Die Reinheit und die Konzentration des aufgereinigten Konstrukts wurden im Anschluss mittels Silberfärbung überprüft (Abbildung 6). Letztendlich wurden Konzentrationen von $3,6 \mu\text{g/ml}$ bis $12 \mu\text{g/ml}$ an scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsprotein nach der Aufreinigung gemessen.

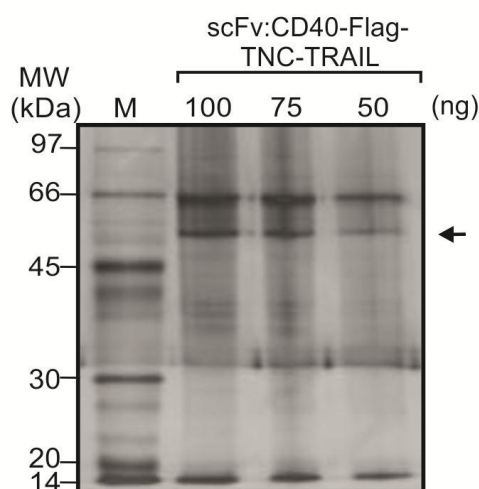


Abbildung 6: Analyse des gereinigten scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsproteins mittels Silberfärbung

Das Fusionsprotein wurde in HEK293-Zellen produziert, über eine M2-Agarosesäule aufgereinigt und anschließend durch SDS-Page aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte durch Silberfärbung.

Bei der SDS-Page wurde das Fusionsprotein scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL in drei verschiedenen Mengen aufgetragen (100 ng, 75 ng, 50 ng). Durch die Zusammensetzung aus scFv:CD40, dem Flag-Peptid, der TNC-Domäne und TRAIL lag das Molekulargewicht bei ca. 53 kDa.

4.3 Vergleich der Aktivität von gereinigtem und ungereinigtem scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL

Nach der Produktion des Fusionsproteins scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL wurde das Konstrukt größtenteils mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Es wurde zunächst überprüft, ob das aufgereinigte Protein noch die gleiche zytotoxische Aktivität auf CD40-positiven Zellen zeigt wie der Zellüberstand. Dazu wurden Zellen parallel mit aufgereinigtem Konstrukt und Zellüberstand inkubiert. Zusätzlich wurde der Versuch mit und ohne Vorstimulation mit CHX durchgeführt. CHX inhibiert dabei die Proteinbiosynthese und es werden folglich weniger anti-apoptotische Proteine, wie z.B. die der FLIP-Familie synthetisiert. Folglich kommt es zu einer Sensitiverung für die todesrezeptorvermittelte Apoptose (Siegmond et al., 2002). Es zeigte sich, dass das TRAIL-Fusionsprotein im Zellkulturüberstand und das aufgereinigte Konstrukt mit derselben Dosis-Wirkungs-Beziehung Zelltod in HT1080-CD40-Transfektanten auslösen (Abbildung 7).

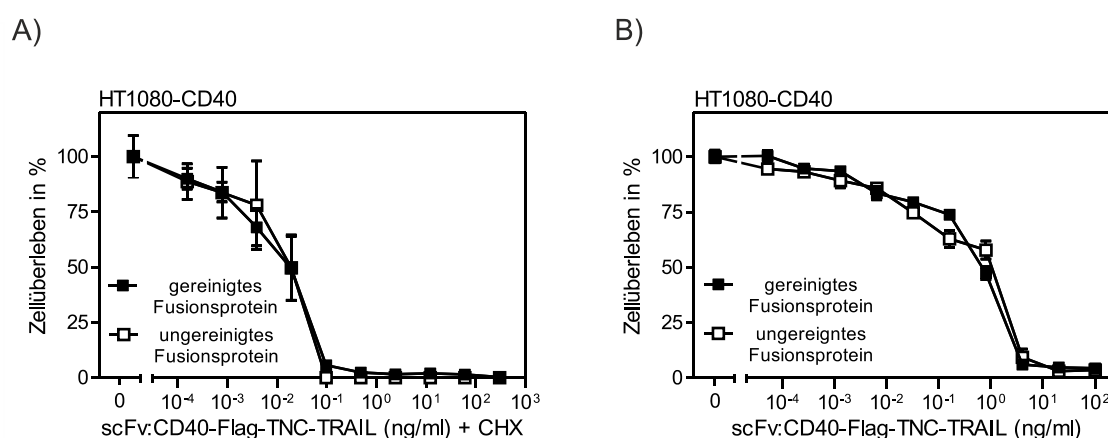


Abbildung 7: Vergleich der Zytotoxizität von aufgereinigtem scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsprotein mit Proteinüberstand auf HT1080-CD40-Transfektanten

Stimulation von CD40-transfizierten HT1080-Zellen in Anwesenheit (A) und Abwesenheit (B) von CHX (2,5 µg/ml) mit angegebenen Konzentrationen an ungereinigtem und gereinigtem scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL. Nach 16 h wurde der Anteil der überlebenden Zellen durch Kristallviolettffärbung ermittelt.

In CHX-vorstimulierten Zellen lag der ED₅₀-Wert der Zelltodinduktion bei 10-100-fach geringeren Konzentrationen an TRAIL-Fusionsprotein. Insgesamt setzte die apoptotische Antwort bei 0,01 ng/ml ein und erreichte ihr Maximum, je nach Vorstimulation mit oder ohne CHX, bei 0,1–10 ng/ml. Der Versuch bestätigte die sensitivierende Wirkung von CHX, mit dessen Hilfe geringere Konzentrationen an Fusionsprotein zur Apoptoseinduktion ausreichend waren. Vor allem aber konnten mögliche unerwünschte Effekte, welche durch andere Inhaltsstoffe des Zellkulturüberstandes vermittelt werden, ausgeschlossen werden.

4.4 Bedeutung der Bindung der scFv:CD40-Domäne an zellständiges CD40 für die Aktivität des TRAIL-Fusionsproteins

Lösliches TRAIL bindet und aktiviert seine beiden korrespondierenden Todesrezeptoren, TRAILR1 und TRAILR2, schwächer als membrangebundenes TRAIL (Wajant et al., 2001; El-Mesery et al., 2013). Die antikörpervermittelte Zelloberflächenbindung kann zu stärker aktiven TNF-Ligandenvarianten führen (Samel et al., 2003; Bremer et al., 2004; Berg et al., 2007). Allerdings war nicht klar, inwieweit die mögliche Bindung der scFv:CD40-Domäne an zellständiges CD40 die Aktivität des Fusionsproteins scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL steigern kann.

4.4.1 Blockade des CD40-Rezeptors vermindert die Aktivität von scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL

Um die Bedeutung der durch die Einzelketten-Antikörperfragment-Domäne möglichen Bindung an CD40 für die Aktivität des TRAIL-Fusionsproteins zu ermitteln, wurden CD40-exprimierende Tumorzellen mit dem Konstrukt scFv:CD40-Fc-Flag-GpL vorbehandelt und so die Zugänglichkeit des CD40-Oberflächenrezeptors blockiert. Das Fusionsprotein scFv:CD40-Fc-Flag-GpL selbst vermittelt keinerlei apoptotische Signale auf den verwendeten HT1080- und HeLa-CD40-Transfektanten. Generiert und produziert wurde das scFv:CD40-Fc-Flag-GpL-Fusionsprotein von Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Innere Medizin. Die C-terminale *Gaussia princeps* Luziferase (GpL) des Fusionsproteins wurde in anderen Projekten/Versuchen zur sensitiven De-

tektion des Moleküls verwendet, war aber für die hier dargelegten Experimente nicht weiter relevant. Zusätzlich enthielt das Konstrukt neben der CD40-spezifischen scFv-Antikörperdomäne und dem Flag-Peptid die Fc-Domäne, welche mit Hilfe von Disulfidbrücken zwei scFv:CD40-Domänen kovalent verbindet (Abbildung 8).



Abbildung 8: Schematischer Aufbau des scFv:CD40-Fc-Flag-GpL-Fusionsproteins

Einzelne Domänen des Konstrukts: scFv:CD40 (CD40-spezifisches Einzelketten-Antikörperfragment) (252 AS); Fc-Domäne des humanen Immunglobulins G1 (222-447 AS); Flag-Peptid (DYKDDDDK); GpL (Gaussia princeps Luziferase) (18-185 AS).

In diesem Versuch sollte das Konstrukt ausschließlich zur Blockierung der CD40-Oberflächenrezeptoren genutzt werden. Nach Aussaat der CD40-exprimierenden Zellen wurde die Hälfte dieser am nächsten Tag mit 500 ng/ml oder 1000 ng/ml scFv:CD40-Fc-Flag-GpL für 30 min vorinkubiert, der Rest blieb unbehandelt. Nach Inkubation der unbehandelten und vorbehandelten Zellen mit scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL in verschiedenen Konzentrationen, wurde die zytotoxische Wirkung des TRAIL-Fusionsproteins durch Kristallviolett färbung ermittelt. Nach Vorinkubation der Zellen mit scFv:CD40-Fc-Flag-GpL wurde eine verminderte zytotoxische Wirkung des scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsproteins, je nach Konzentration und Zellart, um 5-40 % ermittelt (Abbildung 9).

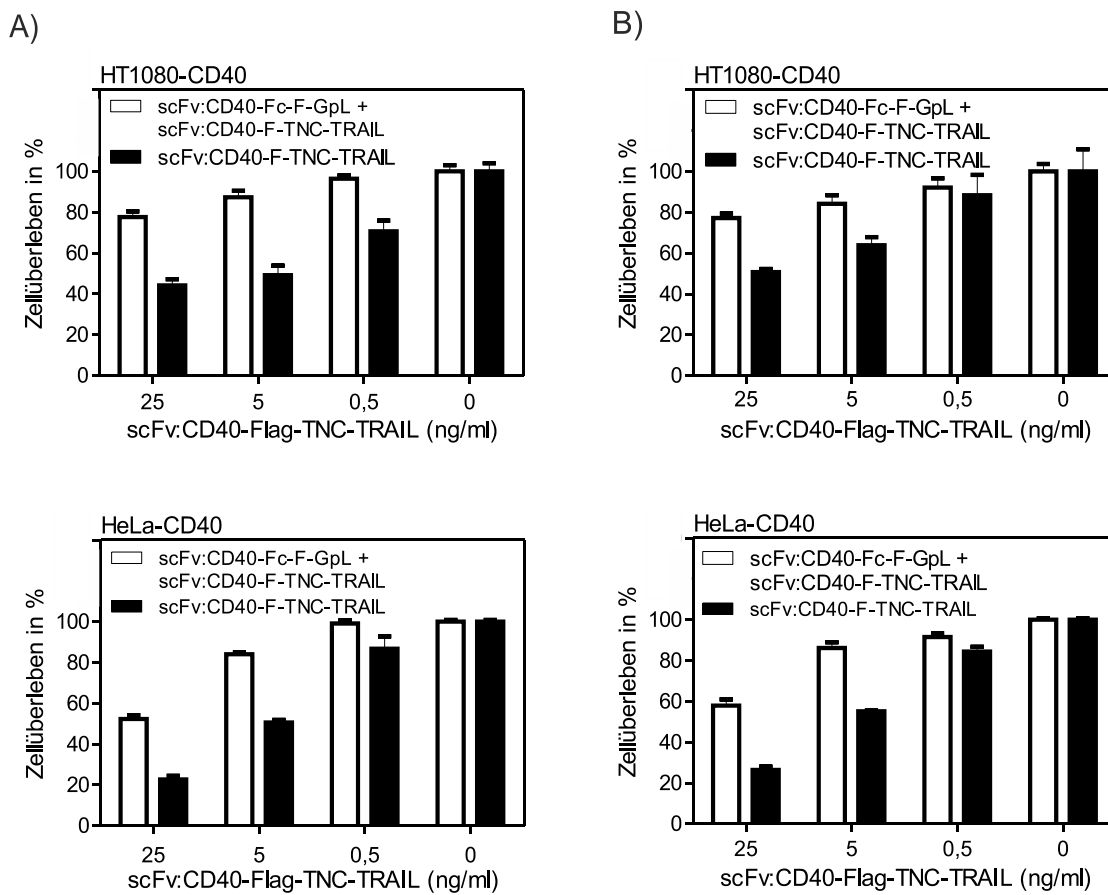


Abbildung 9: Blockade des CD40-Oberflächerezeptors vermindert die apoptotische Wirkung von scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsprotein auf CD40-exprimierenden Zellen

CD40-positive HT1080- und HeLa-Zellen wurden mit scFv:CD40-Fc-Flag-GpL (A: 1000 ng/ml, B: 500 ng/ml) 30 min vorstimuliert (weiße Balken) oder blieben unbehandelt (schwarze Balken). Anschließend wurden sie mit den angegebenen Mengen an scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL inkubiert. Die überlebenden Zellen wurden nach 16 h mittels Kristallviolett färbung quantifiziert.

Dabei war die Konzentration von scFv:CD40-Fc-Flag-GpL weniger ausschlaggebend als die Konzentration des scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Konstrukts. Bei unbehandelten Zellen wurde die ED₅₀ bei einer TRAIL-Ligandenkonzentration von 5 ng/ml (HT1080-CD40) oder 25 ng/ml (HeLa-CD40) erreicht. Im Gegensatz dazu überlebten in mit scFv:CD40-Fc-Flag-GpL vorinkubierten CD40-positiven HT1080-CD40-Zellen bei 25 ng/ml scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL 80 % der Zellen und bei geringeren Konzentrationen des TRAIL-Fusionproteins war kaum ein vermindertes Überleben nachweisbar. Der in unbehandelten CD40-transfizierten HeLa-Zellen ermittelte ED₅₀-Wert (5 ng/ml) konnte nach Vorbe-

handlung mit scFv:CD40-Fc-Flag-GpL erst bei 5-fach höheren Fusionsproteinkonzentrationen erreicht werden. Die Immobilisierung des Fusionsproteins über die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung zwischen den Zellen und dem Konstrukt war offensichtlich von großer Bedeutung für die zytotoxische Aktivität der TRAIL-Domäne des TRAIL-Fusionsproteins. Zwar war Flag-TNC-TRAIL bereits aktiv, allerdings konnte mithilfe der Zelloberflächenimmobilisierung die Aktivität von TRAIL gegenüber den Rezeptoren TRAILR1 und TRAILR2 gesteigert werden. Insgesamt war die toxische Wirkung von TRAIL im Vergleich auf den menschlichen Zervixkarzinomzellen (HeLa) stärker als auf den humanen Fibrosarkom-Tumorzellen (HT1080).

4.4.2 In CD40-exprimierenden, nicht aber in CD40-negativen Zellen, induziert scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL dosisabhängig Apoptose

Siegmund und Kollegen haben schon 2002 gezeigt, dass TRAIL nach verminderter Synthese anti-apoptotischer Proteine effizienter Apoptose in Tumorzellen induziert (Siegmund et al., 2002). In diesem Versuch sollte getestet werden, ob der Proteinbiosyntheseinhibitor CHX durch Blockade der Neusynthese Caspase-inhibierender Proteine, wie z.B. cFLIP, das apoptotische Signal von scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL verstärken kann. Um dies zu ermitteln, wurden CD40-negative und CD40-transfizierte Tumorzellen mit und ohne CHX-Vorbehandlung mit dem scFv:CD40-TRAIL-Konstrukt stimuliert.

Insgesamt zeigte das TRAIL-Fusionsprotein fast ausschließlich auf CD40-transfizierten Zellen zytotoxische Aktivität (Abbildung 10).

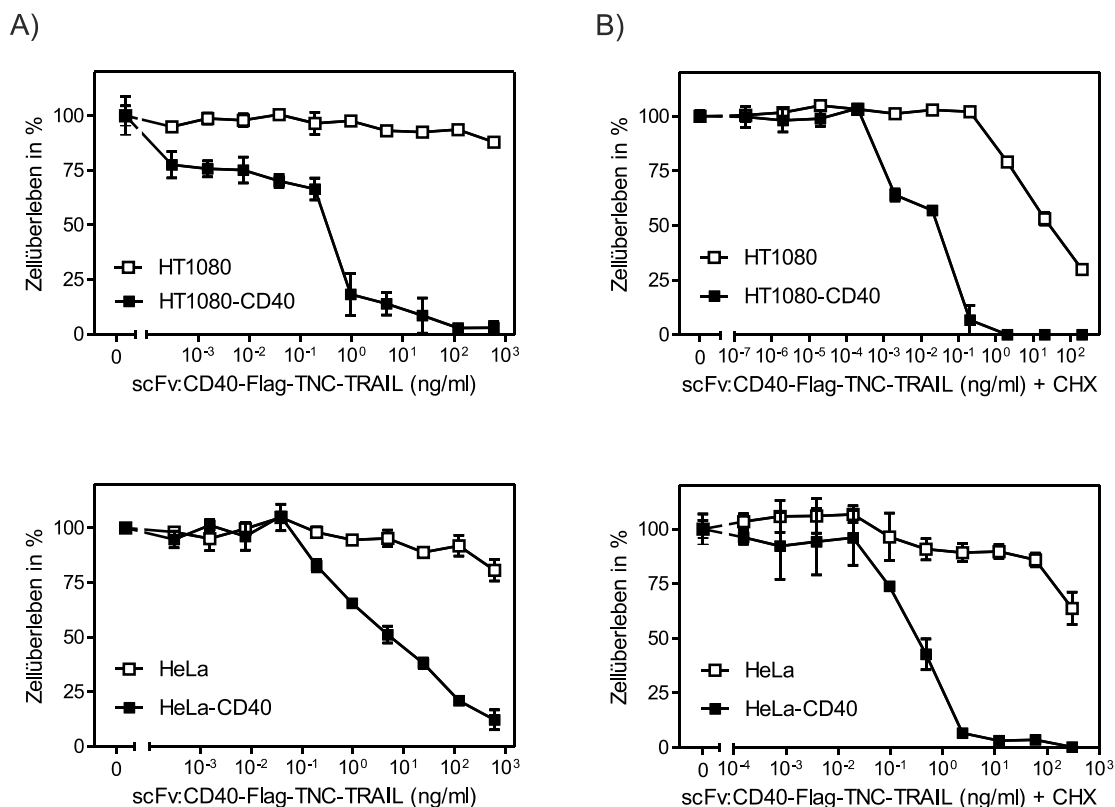


Abbildung 10: Zytotoxischer Effekt des scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsproteins auf CD40-negativen und CD40-exprimierenden HT1080- und HeLa-Zellen

Zunächst wurden die Zellen über Nacht in 96-Well Platten kultiviert. Am nächsten Tag folgte die Stimulierung der verschiedenen Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit von 2,5 µg/ml CHX mit steigenden Konzentrationen von scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL. Die Zellvitalität wurde nach 16 h mittels Kristallviolettffärbung bestimmt.

In Anwesenheit von CHX wurde zwar eine schwache Apoptoseinduktion auf parentalen Tumorzellen bei hohen Konzentrationen von 100-1000 ng/ml des TRAIL-Fusionsproteins beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde bei CD40-positiven Zellen nach CHX-Behandlung schon bei 10 ng/ml Zellsterben mittels Kristallviolettffärbung bestimmt. So lag der ED₅₀-Wert bei den HT1080- und HeLa-CD40-Transfektanten ohne CHX bei 5-10 ng/ml. Auf CHX-vorstimulierten CD40-positiven Zellen konnten hingegen 10-100-fach niedrigere Werte ermittelt werden. Dies zeigte, dass die Zytotoxizität dieses Proteins dosisabhängig war, wobei die nötige Proteinkonzentration mittels sensitivierendem CHX gesenkt werden konnte.

4.5 scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL aktiviert den NFκB-Signalweg

TRAIL aktiviert neben der Apoptose auch nicht-apoptotische Signalwege (Ashkenazi et al., 1999; Wajant et al., 2000). Ein Beispiel hierfür ist die Aktivierung des inflammatorischen Transkriptionsfaktors NFκB, der u.a. die Produktion des Zytokins IL8 induziert, welches als Entzündungsmediator u.a. für die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist (Baggiolini, Clark-Lewis, 1992). Genauso wirkt auch das CD40-CD40L-System stimulierend auf inflammatorische Signalwege, wie den NFκB-Signalweg (Schönbeck, Libby, 2001). Vor allem maligne Zellen nutzen dieses Ligand-Rezeptor-Paar um anti-apoptotische Signale und Zytokine zu aktivieren (Voorzanger-Rousselot, Blay, 2004).

Um zu untersuchen, ob in CD40-exprimierenden HT1080- und HeLa-Zellen IL8 durch TRAIL induziert wird, inwieweit dabei die CD40-vermittelte Immobilisierung diesen Effekt verstärkt und ob die scFv:CD40-Domäne agonistische Aktivitäten besitzt, wurden CD40-negative Zellen im Vergleich mit CD40-transfizierten Zelllinien mit scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL stimuliert und anschließend das produzierte IL8 in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt. Es konnte in CD40-positiven Zellen eine bis zu 8-fach gesteigerte IL8-Synthese beobachtet werden (Abbildung 11).

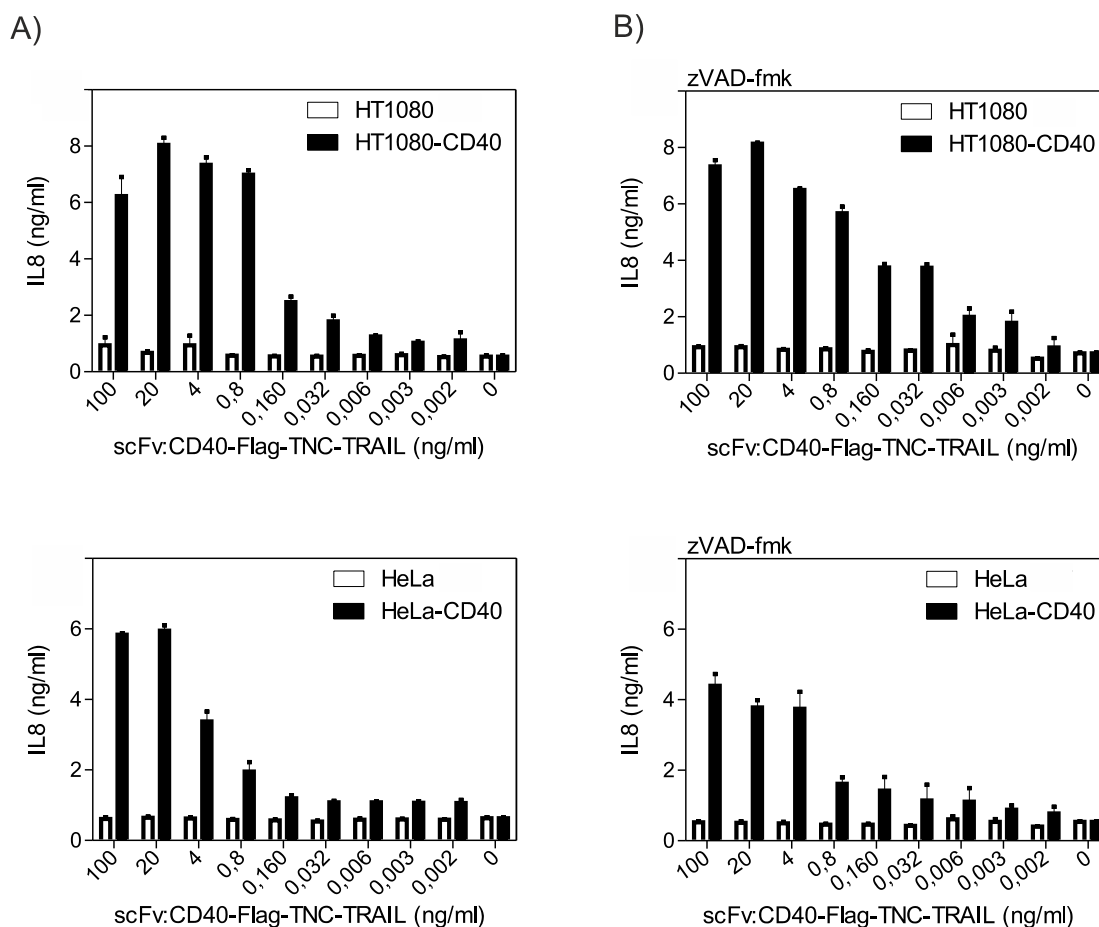


Abbildung 11: scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL aktiviert neben der Apoptose inflammatorische Signale in CD40-exprimierenden Tumorzellen

Im Vergleich wurden parentale HT1080-Zellen und CD40-transfizierte HT1080-Zellen, sowie parentale HeLa-Zellen und CD40-transfizierte HeLa-Zellen in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von zVAD-fmk mit den angegebenen Konzentrationen von scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL stimuliert. Nach 12 h wurde die Menge des produzierten IL8 mittels ELISA bestimmt.

Zusätzlich wurde derselbe Versuch nach 30-minütiger Vorstimulation mit zVAD-fmk (N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluormethyl-Keton) durchgeführt. Hierbei diente zVAD-fmk als Caspaseinhibitor und sollte gegebenenfalls eine Überlagerung der TRAIL-vermittelten Apoptoseinduktion mit der IL8-Synthese verhindern. Die ELISA-Messung zeigte, dass in zVAD-fmk-behandelten Zellen ähnliche Konzentrationen von IL8 produziert wurden. Es wurden Abweichungen von maximal 2 ng/ml bei gleicher Konzentration des TRAIL-Fusionsproteins ermittelt. Insgesamt konnten IL8-Konzentrationen in CD40-positiven Zellen von bis zu

bis zu 8 ng/ml (HT1080-CD40) und 6 ng/ml (HeLa-CD40) in Abhängigkeit von der TRAIL-Fusionsprotein-Konzentration gemessen werden.

Außerdem zeigte der Versuch, dass zwar sowohl in den parentalen Zellen als auch in den CD40-Transfektanten eine konstitutive IL8-Produktion nachweisbar war sowie, dass das TRAIL-Fusionsprotein aber nur in den CD40-Transfektanten signifikant die basale IL8-Produktion gesteigert hat. Insgesamt wurde in den HeLa-Zellen ein geringerer IL8-Gehalt als in HT1080-Zellen nach Stimulation mit gleichen Mengen des TRAIL-Konstrukts gemessen.

Anhand dieses Versuchs konnte nicht eindeutig ermittelt werden, ob die inflammatorischen Signale durch TRAIL-vermittelte Stimulation der TRAIL-Todesrezeptoren oder durch die Aktivierung von CD40 durch die scFv:CD40-Domäne des Fusionsproteins induziert wurden. Allerdings wurde bereits früher gezeigt, dass der NF κ B-Signalweg in TRAIL-stimulierten HeLa-Zellen nur nach CHX-Sensitivierung und Inhibition der Apoptose effizient aktiviert wird (Wajant et al., 2000). Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl mit als auch ohne zVAD-Behandlung ähnliche hohe IL8-Mengen induziert wurden. Offensichtlich besitzt die scFv:CD40-Domäne agonistische Aktivität. Dies zeigt, dass es sich bei scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL somit um ein bifunktionelles Fusionsprotein handelt.

4.6 Visualisierung morphologischer Merkmale der Apoptose in scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL stimulierten CD40-exprimierenden Tumorzellen

Im Weiteren wurden Zellen, in denen scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL Zelltod induzierte, im Mikroskop nach charakteristischen apoptotischen Merkmalen untersucht. Nach Aktivierung der Todesrezeptoren wird über eine intrazelluläre Signalkaskade die Apoptose eingeleitet. Im Gegensatz dazu spricht man von Nekrose, wenn Zellen nach Schädigung durch exogene Noxen unkontrolliert Absterben. Dabei unterscheidet sich die Apoptose durch bestimmte morphologische Kennzeichen von der Nekrose. Dazu zählen: Verringerung des Zellvolumens, Chromatinkondensation, Fragmentierung der DNA in Bruchstücke definierter Länge und Abschnürung apoptotischer Körperchen (Arends et al., 1990).

Anhand dieser Merkmale kann mikroskopisch die Art des Zelluntergangs differenziert werden. Um den Zelluntergang nach scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Stimulierung zu ermitteln, wurden die Zellen im Mikroskop untersucht. Hierzu wurden die verschiedenen Zellen in 6 cm Petrischalen ausgesät und nach unterschiedlicher Stimulation am Lichtmikroskop fotografiert (Abbildung 12).

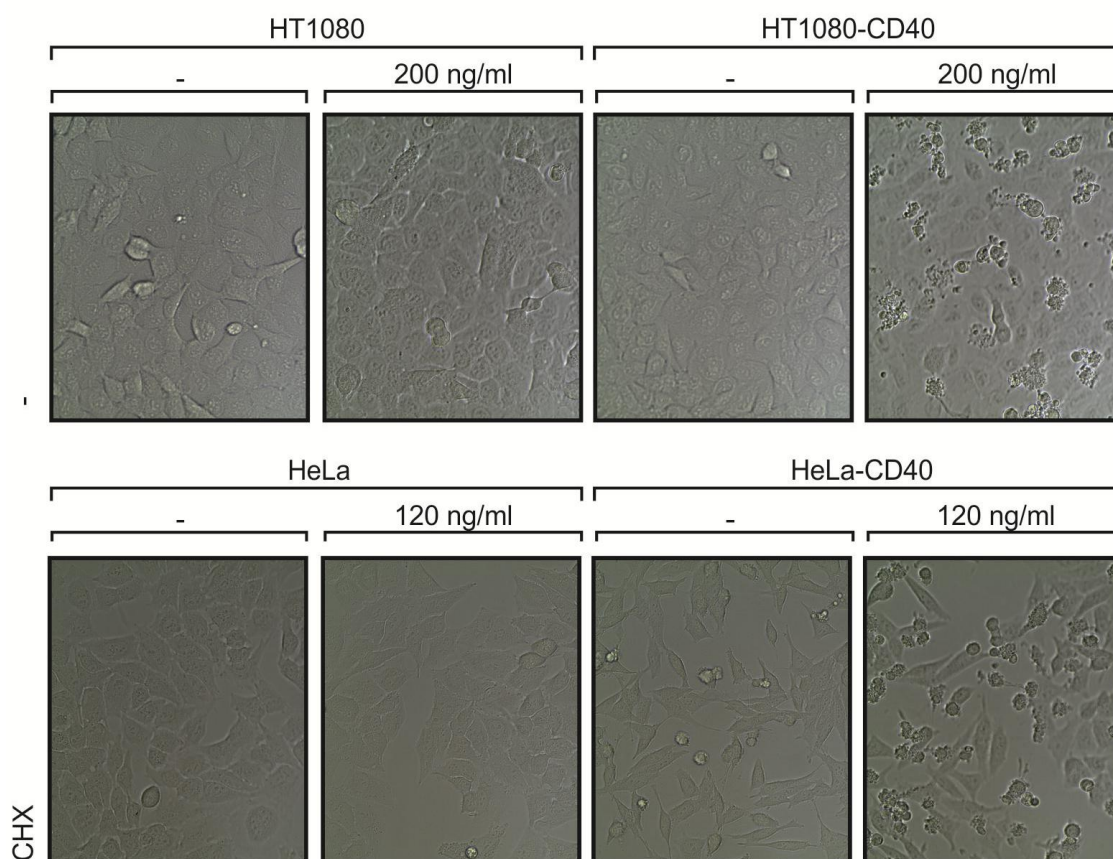


Abbildung 12: CD40-restringierte Aktivierung der TRAIL-Todesrezeptoren ist anhand charakteristischer apoptotischer Merkmale erkennbar

Jeweils 4×10^6 CD40-negative sowie CD40-transfizierte HeLa- und HT1080-Zellen wurden in 6 cm Petrischalen über Nacht ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach Vorstimulation mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ CHX oder unbehandelt mit den angegebenen Konzentrationen an scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL stimuliert oder blieben unbehandelt (-). Nach 6 h wurden digitale Bilder am Lichtmikroskop mit 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

Der Versuch zeigte deutlich, dass lösliches scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL bei Konzentrationen zwischen 120 und 200 ng/ml weder in unbehandelten noch in CHX-stimulierten parentalen, CD40-negativen Tumorzellen, sichtbar apoptoti-

sche Signale vermittelt hat. Folglich erwiesen sich CD40-negative Zellen als resistent gegenüber scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL. Im Gegensatz dazu wurde bei CD40-exprimierenden Zellen ohne und mit erfolgter CHX-Vorstimulation der programmierte Zelltod induziert. Deutlich erkennbar war der Abbau der Zellen zu charakteristischen apoptotischen Vesikeln, welche DNA-Fragmente und Zellmembranbestandteile enthielten.

4.7 scFv:CD40-Flag-scTRAIL aktiviert immobilisationsabhängig die Apoptose

Die Stabilität löslicher TNFL kann nicht nur durch die Fusion mit einer Trimerisierungsdomäne, wie z.B. der aus Tenascin-C, die in scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL verwendet wurde, gesteigert werden. Frühere Arbeiten haben auch gezeigt, dass sc (single chain)-TRAIL Moleküle, welche über drei durch Peptidlinker verknüpfte extrazelluläre Domänen des TRAIL verfügen, funktionell und gut aktiv sind (Schneider et al., 2010). Im Weiteren sollte überprüft werden, ob ein scFvCD40-Flag-scTRAIL-Fusionsprotein ähnliche zytotoxische CD40-restringierte Aktivitäten auf CD40-exprimierenden Zellen zeigt, wie das scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Konstrukt. Hierfür wurde das Fusionsprotein scFv:CD40-Flag-scTRAIL generiert (Abbildung 13).



Abbildung 13: Schematischer Aufbau des Fusionsproteins scFv:CD40-Flag-scTRAIL

Einzelne Domänen des scFv:CD40-Flag-scTRAIL-Konstrukts: scFv:CD40 (CD40-spezifisches Einzelketten-Antikörperfragment) (252 AS); Flag-Peptid (DYKDDDDK); sc-Kassette mit drei hintereinander geschalteten THD des humanen TRAIL (95–281 AS).

Zusätzlich beinhaltet das Konstrukt N-terminal wiederum die CD40-spezifische scFv-Antikörperdomäne und einen Flag-tag. In Lösung lagern sich die drei durch Peptidlinker verknüpften TRAIL-Subdomänen der scTRAIL-Domäne zu einem intramolekularen Trimer zusammen, das mit einer einzelnen CD40-

Bindungsdomäne verknüpft ist. Das scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsprotein liegt im Gegensatz dazu, aufgrund der intrinsischen Trimerisierungseigenschaften von TRAIL und der TNC-Domäne, in Lösung als stabilisiertes trimeres Molekül vor, welches drei CD40-bindende Antikörperfragmente besitzt (Abbildung 14).

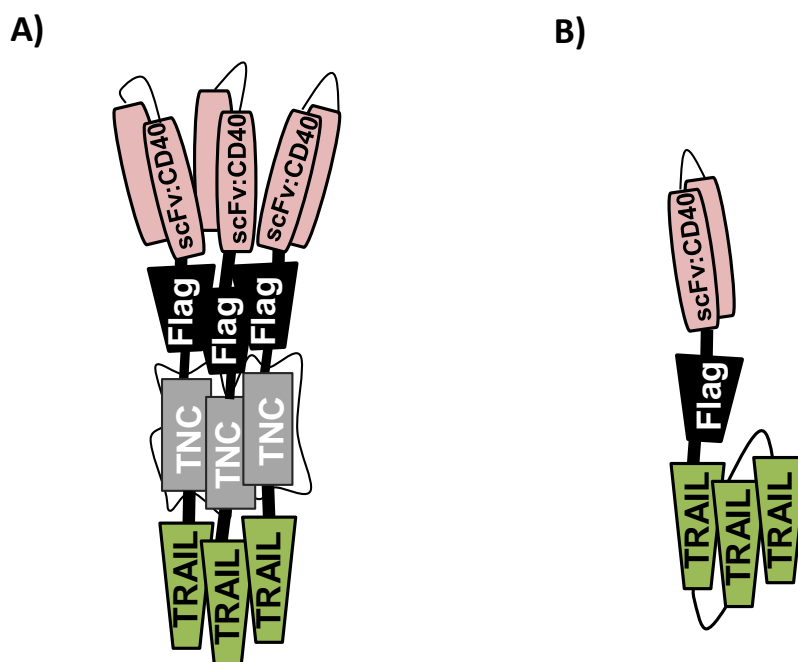


Abbildung 14: Vergleich der trimeren Anordnung von scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL (A) mit scFv:CD40-Flag-scTRAIL (B)

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich der unterschiedliche Aufbau der beiden Konstrukte auf die CD40-restringierte toxische Aktivität von TRAIL auswirkt. Um dies zu testen wurden CD40-exprimierende und CD40-negativen Zellen mit steigenden Konzentrationen scFv:CD40-Flag-scTRAIL stimuliert. Es zeigte sich, dass sowohl auf CD40-Transfektanten als auch auf den parental HT1080-Zellen, in Abhängigkeit von der scFv:CD40-Flag-scTRAIL-Konzentration, Apoptose induziert wurde (Abbildung 15).

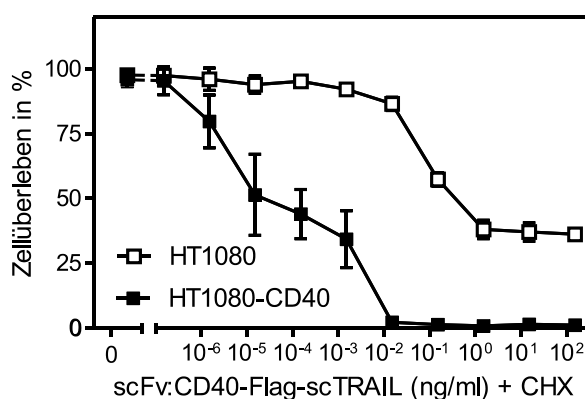


Abbildung 15: Zytotoxische Aktivität des scFv:CD40-Flag-scTRAIL-Fusionsproteins auf CD40-negativen und CD40-transfizierten HT1080-Zellen

Nach Kultivierung der verschiedenen Transfektanten über Nacht in 96-Well Platten, wurden diese am nächsten Tag mit steigenden Konzentrationen von scFv:CD40-Flag-scTRAIL in Anwesenheit von CHX (2,5 µg/ml) stimuliert. Der Anteil der überlebenden Zellen wurde nach 16 h durch Kristallviolett färbung ermittelt.

In parental HT1080-Zellen stellte sich die ED₅₀ bei 1-10 ng/ml ein. Auf den HT1080-CD40-Zellen war der toxische Effekt bis zu 1000-fach stärker. Bei einer Konzentration von 0,01 ng/ml des scTRAIL-Fusionsproteins konnte ein einheitliches Zellsterben der CD40-positiven Zellen ermittelt werden. Dieses Resultat zeigte, dass das scTRAIL-Fusionsprotein, genau wie die TNC-TRAIL-Variante, in Abhängigkeit von der Zelloberflächenimmobilisierung mittels der scFv:CD40-Domäne auf HT1080-CD40-Zellen ein hohes apoptotisches Potenzial erzielte. Insgesamt wiesen scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL und scFv:CD40-Flag-scTRAIL bei gleichen Konzentrationen annähernd identische apoptotische Aktivitäten auf den Tumorzellen auf.

Somit zeigte sich, dass beide Konstrukte zur selektiven CD40-restringierten Induktion der Apoptose geeignet sind.

4.8 Detektion charakteristischer Caspasesubstrate

Die Todesrezeptoren TRAILR1 und TRAILR2 vermitteln über die Caspasekaskade den programmierten Zelltod. In diesen Prozess sind diverse Caspasen, wie beispielweise die Initiatorcaspasen-8 und -9 und die Effektorcaspasen-3 und -7 involviert, die während der Effektorphase verschiedene Proteine spalten. Zu charakteristischen Caspasesubstraten zählen u.a. PARP, Tiam1 und Fak. Das Enzym PARP, ein typisches Spaltprodukt der Caspase-3, ist nach dem Abbau nicht mehr fähig, DNA-Reparaturen zu katalysieren. Durch Spaltung des Proteins Tiam1 kann im weiteren Verlauf die Genexpression bestimmter immunregulatorischer Gene unterbunden werden (Michiels et al., 1997). Zusätzlich werden durch die Caspase-3-vermittelte Spaltung des Proteins Fak, welches in zelluläre Adhäsion involviert ist, weitere apoptotische Signale ausgesendet (Levkau et al., 1998).

Um zu überprüfen, ob nach TRAIL-Fusionsprotein-induzierter Apoptose die charakteristische Prozessierung verschiedener Caspasen und Caspasesubstrate nachgewiesen werden kann, wurden zunächst Gesamtzelllysate von unbehandelten CD40-negativen HT1080- und HeLa-Zellen, sowie von unbehandelten CD40-positiven HT1080- und HeLa-Zellen angefertigt. Zudem wurden noch jeweils Zelllysate von parentalen und CD40-positiven HT1080- und HeLa-Zellen hergestellt, die mit oder ohne Vorstimulation mit 2,5 µg/ml CHX, mit 120/200 ng/ml scFv:CD40-TRAIL-Fusionsprotein stimuliert wurden. Nach Auftrennung der Proben durch SDS-Page wurden diese mittels Western Blot bezüglich der Prozessierung der genannten Caspasen und Substraten analysiert. Die charakteristischen Caspasen und Spaltprodukte des programmierten Zelltods konnten nur in Proben behandelter und unbehandelter CD40-exprimierender Zellen nach Stimulation mit scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL detektiert werden (Abbildung 16).

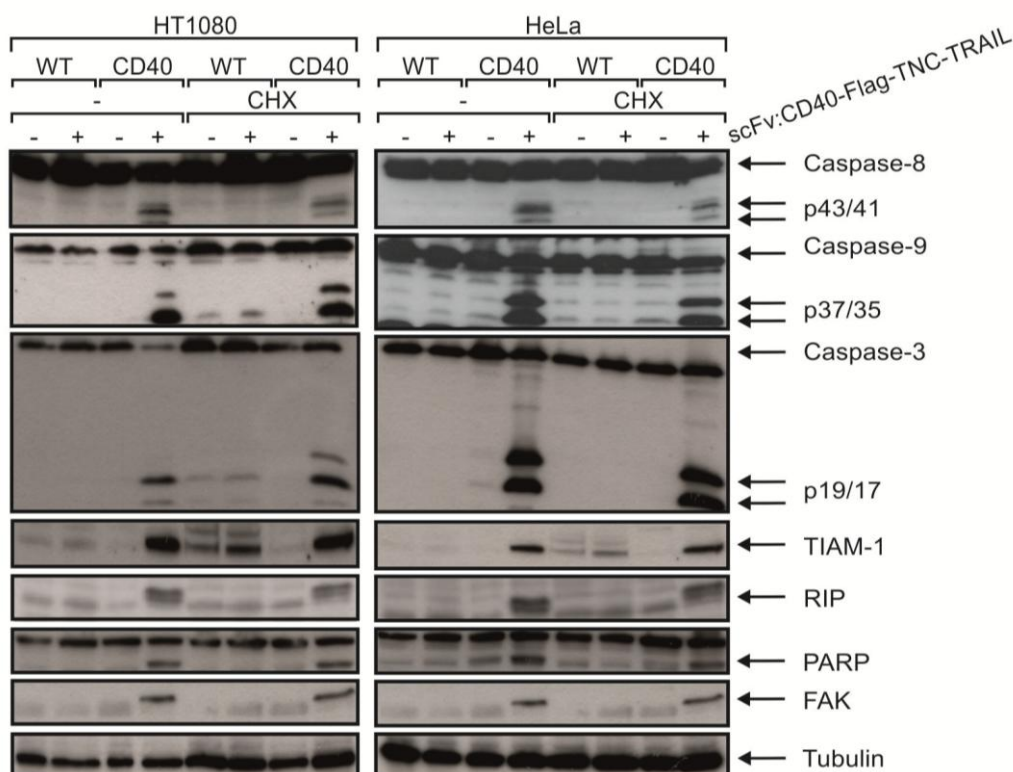


Abbildung 16: scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL induziert die Prozessierung von Caspasen und Caspasesubstraten in CD40-exprimierenden Zellen

Parentale und CD40-transfizierte HT1080- sowie parentale und CD40-transfizierte HeLa-Zellen wurden für 6 h in Abwesenheit und Anwesenheit von 2,5 µg/ml CHX mit 200 ng/ml (HT1080) und 120 ng/ml (HeLa) scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL inkubiert. Anschließend wurden Gesamtzelllysate angefertigt und im Western Blot auf die Prozessierung der dargestellten Proteine hin untersucht. Tubulin diente als Ladekontrolle.

Dementsprechend induzierte das TRAIL-Fusionsprotein nur nach Bindung an CD40 Zelloberflächenmoleküle effizient Apoptose, was sich mit den Befunden der Vitalitätsassays deckte. Mithilfe der Detektion der spezifischen Spaltprodukte konnte zudem die Induktion des programmierten Zelltods über den DISC und die folgende Caspasekaskade nachgewiesen werden. Dies beruht auf der Tatsache, dass die Procaspase-8 im TRAIL-vermittelten DISC zur Effektorcaspase-8 (p43/p41) prozessiert wird. Außerdem war die Detektion der charakteristischen Enzyme ein Beleg für die über die Todesrezeptoren TRAILR1- und TRAILR2-vermittelte Apoptose.

Diese Ergebnisse bestätigten wiederum deutlich die CD40-restringierte Aktivierung der TRAIL-Todesrezeptoren durch das rekombinante Fusionsprotein

scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL auf CD40-exprimierenden Tumorzellen. Somit könnte dieses Konstrukts künftig zur selektiven Apoptoseinduktion auf antigen-positiven (CD40) Zellen genutzt werden.

5 Diskussion

Der Ligand TRAIL nimmt einen besonderen Stellenwert in der Entwicklung neuer Therapien für maligne Neoplasien ein, da er selektiv auf verschiedenen entarteten Zellen Apoptose induziert, ohne offensichtlich toxische Aktivitäten gegenüber gesunden Zellen zu zeigen (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999). Allerdings ist dabei zu beachten, dass einige Liganden der TNFSF nach Prozessierung in ihre lösliche Form zwar häufig ihren korrespondierenden Rezeptortyp bzw. Rezeptortypen binden, diesen/diese aber nicht effizient aktivieren (Wajant et al., 2013). Dieses Phänomen betrifft auch TRAIL (Wajant et al., 2001). Durch gentechnische Verbindung von löslichen TNFL mit einem einfachen variablen Antikörperfragment, welches an ein tumorspezifisches Zielantigen bindet, kann deren Bioaktivität durch Bindung an das entsprechende Antigen gesteigert und zusätzlich ihre toxische Aktivität lokal begrenzt werden (Wajant et al., 2001; Samel et al., 2003; Bremer et al., 2004; Bremer et al., 2005; Assouhou-Luty et al., 2006). In dieser Arbeit wurde der Effekt der durch Zelloberflächenimmobilisierung-vermittelten Aktivierung von löslichem TRAIL mittels eines TRAIL-Fusionsproteins mit einer CD40-spezifischen scFv-Domäne (scFv:CD40) auf Tumorzellen untersucht.

5.1 scFv:CD40-TRAIL aktiviert CD40-restringiert die Todesrezeptoren TRAILR1 und TRAILR2

Zu Beginn wurde das Fusionsprotein scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL generiert. Neben der THD des humanen TRAIL umfasst das Konstrukt die TNC-Domäne, welche zur Stabilisierung der trimeren Molekülanordnung dient und dem Molekül TNC entnommen wurde (Kammerer et al., 1998). Dabei geht man davon aus, dass kovalente Bindungen (Disulfidbrücken) zwischen den TNC-Domänen des trimeren TNFL-Fusionsproteins die Dissoziation des Moleküls in seine inaktiven und leicht denaturierenden Monomere verhindern und das Fusionsprotein somit stabiler wird (Berg et al., 2007). Das Flag-Peptid diente in dieser Arbeit ausschließlich zur Aufreinigung des Proteins. N-terminal wurde das Konstrukt

mit einer für humanes CD40 spezifischen scFv-Domäne fusioniert. Schon zuvor wurde eine gesteigerte Aktivität löslicher TNFL mittels artifizieller Zelloberflächenimmobilisierung beschrieben (Wajant et al., 2001; Samel et al., 2003; Bremer et al., 2004; Assouhou-Luty et al., 2006). Es ist bekannt, dass monoklonale Antikörper entweder agonistische, neutrale oder antagonistische Eigenschaften gegenüber den Rezeptoren der TNFSF besitzen (Bremer et al., 2005; Vonderheide, Glennie, 2013). Demnach war ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ein Fusionsprotein mit bifunktionellen Aktivitäten zu generieren. Tatsächlich wurde bereits ein TRAIL-Fusionsprotein mit einem antagonistischen mAb für den Rezeptor EGFR (epidermal growth factor receptor) beschrieben (Bremer et al., 2005). Durch die Blockade des Antigens wurde die Aktivierung der TRAIL-Todesrezeptoren mit der Inhibition des anti-apoptotischen Proteins cFLIP_L verbunden, das durch den EGFR induziert wird (Bremer et al., 2005). Zusätzlich wurde die Bioaktivität von löslichem TRAIL durch Überführung in eine artifizielle membranständige Form gesteigert und auf EGFR-positive Zellen beschränkt (Bremer et al., 2005).

CD40 ist nicht ausschließlich mit Tumorstromagewebe assoziiert, allerdings ist seine gesteigerte Expression auf Tumorzellen nachweisbar (Voorzanger-Rousselot, Blay, 2004). Die Generierung des Fusionsproteins scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL zielte daher auf die CD40-restringierte Steigerung der Apoptoseinduktion mit der Minimierung unerwünschter Nebeneffekte ab. Zusätzlich kommt dem Oberflächenrezeptor CD40 eine große Bedeutung in der Aktivierung des Immunsystems zu. Verschiedene Arbeiten haben anti-tumorale Aktivitäten des CD40-CD40L-Systems in klinischen Versuchen verdeutlicht. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass ein CD40-mAb (CP-870,893) das Immunsystem durch Aktivierung von DZ stimuliert (Carpenter et al., 2009). Zu den gewünschten Effekten zählen folglich Stimulierung der DZ zur Proliferation, Präsentation tumorassoziierter Antigene an CTL (zytotoxische T-Lymphozyten) und Aktivierung von B-Zellen, um somit insgesamt das herunterregulierte Immunsystem im Tumorgewebe anzuregen (Vonderheide, Glennie, 2013).

Erwartungsgemäß konnte in dieser Arbeit die schwache Bioaktivität des löslichen TRAIL gegenüber seinen korrespondierenden Todesrezeptoren, TRAILR1

und TRAILR2, durch Generierung einer artifiziellen Membranständigkeit deutlich gesteigert werden. Die Analyse der toxischen Wirkung von produziertem Zellkulturüberstand, als auch von aufgereinigtem Fusionsprotein, zeigte, dass scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL auf CD40-exprimierenden im Vergleich zu CD40-negativen Zellen deutlich nachweisbar Apoptose induzierte. Darüber hinaus bestätigten weitere Zytotoxizitätsassays den signifikanten aktivitätssteigernden Effekt der Immobilisierung an CD40.

Frühere Studien haben gezeigt, dass durch Herunterregulation der cFLIP-Expression Zellen für die TRAIL-vermittelte Apoptose sensitiviert werden (Siegmond et al., 2002). Das Protein cFLIP_S bindet hierbei normalerweise im DISC an Procaspase-8 und verhindert deren Aktivierung und Freisetzung ins Zytosol (Irmeler et al., 1997; Thome et al., 1997). Mittels CHX-Vorstimulierung konnte die Proteinbiosynthese der Zellen gehemmt werden und folglich der intrazelluläre Spiegel an inhibierenden Proteinen gesenkt werden. Erwartungsgemäß konnte in dieser Arbeit auf diese Weise die benötigte Konzentration an scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL für die ED₅₀ gesenkt werden (um den Faktor 10-100). Ein alternativer Ansatz wäre mithilfe von NFκB-Inhibitoren, wie z.B. SN50, die Transkription anti-apoptotischer Proteine, wie Bcl-2, XIAP und eben vor allem FLIP, herunterzuregulieren und gleichzeitig die Produktion proapoptotischer Proteine, wie Bak und Bax, zu steigern, um somit Zellen für Apoptose zu sensitivieren (Mitsiades et al., 2002). Mithilfe von Kombinations-therapien wäre es möglich, einerseits auch in apoptoseresistenten Zellen die TRAIL-vermittelte Apoptose zu erzielen und andererseits die Konzentration klinisch effektiver Dosen zu reduzieren.

Bedeutend für diese Arbeit war, dass die Zellen ausschließlich durch Todesrezeptor-vermittelte Apoptose zugrunde gehen. Um dies zu überprüfen wurden die stimulierten Zellen auf charakteristische morphologische und zelluläre Kennzeichen des programmierten Zelltods hin untersucht. Mithilfe eines Mikroskops erfolgte der morphologische Nachweis der Art des Zelluntergangs. Erwartungsgemäß und in Korrelation mit den vorhergegangenen Ergebnissen konnte das Apoptosekörperchen, ein morphologisches Kennzeichen der Apoptose, in dieser Arbeit ausschließlich in CD40-positiven Zellen detektiert werden.

Daher überraschte es nicht, dass auch im Western Blot alle charakteristischen Spaltprodukte der Apoptose, wie z.B. die Caspase-8-Prozessierung, ausschließlich in CD40-exprimierenden Zellen nachgewiesen wurden.

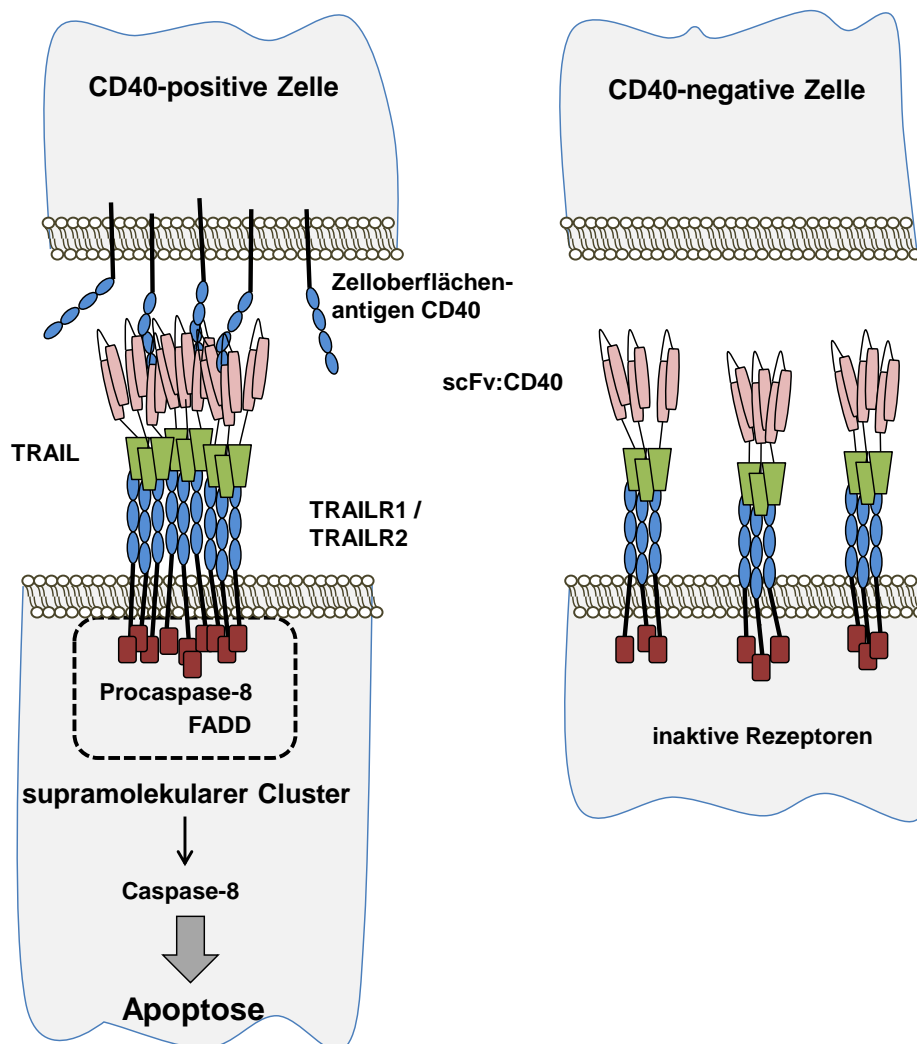


Abbildung 17: CD40-restringierte Aktivierung der TRAIL-Todesrezeptoren

Nach CD40-scFv:CD40-Interaktion interagieren die an TRAIL-gebundenen TRAIL-Rezeptoren miteinander. Es bilden sich supramolekulare Cluster, in denen es zur Caspase-8-Reifung kommt und somit auch zur Apoptoseinduktion.

Insgesamt, übereinstimmend mit den Ergebnissen der Zytotoxizitätsassays, wurde das Prinzip der zelloberflächenvermittelten Immobilisierung des TRAIL-Fusionsproteins bestätigt (Abbildung 17). Zusammenfassend konnte festgestellt

werden, dass das Fusionsprotein scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL in Abhängigkeit von scFv:CD40-CD40-Wechselwirkungen lokal begrenzt die TRAIL-Todesrezeptoren effektiv aktiviert.

5.2 Ein alternatives TRAIL-Konstrukt besitzt immobilisationsabhängig zytotoxische Fähigkeiten

Es wurden bisher verschiedene Möglichkeiten in der Literatur beschrieben, mit deren Hilfe die trimere Anordnung von TNFL stabilisiert werden kann. Wie schon zuvor dargestellt stabilisiert die TNC-Domäne die trimere Anordnung der Liganden über kovalente Bindungen (Kammerer et al., 1998). Es konnte auch gezeigt werden, dass durch sekundäre Oligomerisierung über den Flag-spezifischen Antikörper M2 einige lösliche TNFL, wie z.B. CD95L und CD27L, eine höhere Aktivität zeigen (Wyzgol et al., 2009; Wajant et al., 2013). Ein weiterer Ansatz besteht darin drei extrazelluläre Bereiche eines Liganden der TNFSF, welche jeweils die charakteristische THD beinhalten, aneinander zu reihen, um ein sogenanntes sc-Konstrukt zu generieren (Krippner-Heidenreich et al., 2008). Diese drei THD organisieren sich in Lösung intramolekular trimer und sind fähig ihren korrespondierenden Rezeptor zu binden. Das hier generierte scFv:CD40-Flag-scTRAIL-Fusionsprotein verfügte, im Gegensatz zur TNC-Variante, in trimerer Anordnung über eine anstelle von drei Antigenbindungsstellen. Um zu prüfen, ob die Anzahl der CD40-Bindungsstellen im Molekül einen Effekt auf die Aktivität des an CD40-immobilisierten TRAIL-Fusionsproteins hat, wurden parentale und CD40-transfizierte HT1080-Zellen mit den beiden Fusionsproteinen scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL und scFv:CD40-Flag-scTRAIL stimuliert. Es zeigte sich, dass beide Konstrukte auf CD40-exprimierenden Zellen Apoptose induzieren. Dieses Ergebnis verdeutlichte, dass verschiedene Ansätze beim Aufbau von TRAIL-Konstrukten zur gewünschten antigenabhängigen Aktivitätssteigerung führen.

5.3 Perspektive des mAb CD40 in der Anti-Tumor-Forschung

Agonistische CD40-Antikörper eröffnen in der Tumorthherapie Möglichkeiten die zytotoxische Wirkung rekombinanter TNFL durch Stimulierung des Immunsystems zu steigern (Vonderheide, Glennie, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass CD40-Antikörper in Mäusen durch CD40-vermittelte Aktivierung von APZ zytotoxische T-Lymphozyten aktivieren und folglich das Tumorwachstum gehemmt wird (Li, Ravetch, 2011). Weitere Studien haben gezeigt, dass CD40-spezifische Antikörper sehr effektiv anti-tumorale Antworten verstärken, vor allem bei lymphoiden malignen Erkrankungen (Advani et al., 2009; Vonderheide, Glennie, 2013). Parallel zu dieser Arbeit konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL oder eine trimersierte scFv:CD40-Domäne DZ-Reifung/Aktivierung stimulieren (El-Mesery et al., 2013). Folglich sollte über CD40-scFv:CD40-Wechselwirkungen das Immunsystem hochreguliert und somit neben der TRAIL-Todesrezeptorstimulation ein zweites anti-tumorales Wirksystem durch das Fusionsprotein aktiviert werden. Allerdings besteht bei der CD40-Aktivierung auch die Gefahr, dass das Immunsystem zu stark stimuliert wird und es zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie dem Cytokine release-Syndrom kommt, welches z.B. von Fieber und Hypotonie begleitet wird (Vonderheide, 2007). Zusätzlich ist zu beachten, dass CD40 auf einigen Zellen auch anti-apoptotische Signale zur Proliferation aussendet. Somit ist die T-Zell-abhängige Aktivierung des Immunsystems zu anti-tumoralen Signalen nicht auf allen malignen Zellen anwendbar.

5.4 Einschränkungen der Anwendung von scFv:CD40 und TRAIL in der Krebs-Therapie

Mitglieder der TNFSF vermitteln neben Apoptose auch Signale, welche zur Differenzierung, zur Proliferation, zum Zellüberleben und sogar zu entzündlichen Prozessen führen (Aggarwal, 2000). Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass TRAIL neben Apoptose weitere Signale, wie den NFκB-, den JNK- und den p38MAPK-Signalweg induziert (Wajant et al., 2003; Varfolomeev et al., 2005). Auch CD40 vermittelt über die Proteine der TRAF-Familie die NFκB-Aktivierung (Rothe et al., 1995). Infolgedessen werden anti-apoptotische und inflammatorische Proteine vermehrt exprimiert, wodurch zum Teil das Tumorwachstum gesteigert wird. Zu diesen inflammatorischen Stoffen zählt u.a. das Chemokin IL8, welches zur Akkumulation neutrophiler Granulozyten und zur Plasmaexsudation führt (Baggiolini, Clark-Lewis, 1992). Diese unerwünschten Nebeneffekte können zu entzündlichen Immunantworten bis hin zum septischen Schock und zu einer gesteigerten TRAIL-Resistenz der Zellen führen. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das rekombinante Fusionsprotein scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL verstärkt nach Aktivierung des klassischen NFκB-Signalwegs die IL8-Produktion in Tumorzellen anregt. Bemerkenswerterweise war die Konzentration an produziertem IL8 in Versuchen mit und ohne Apoptoseinhibition gleich hoch. In CD40-positiven Tumorzellen konnte die IL8-Konzentration nach scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Stimulierung um das 6 bis 8-fache gesteigert werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass die NFκB-Aktivierung auf der Bindung der scFv:CD40-Domäne an den Oberflächenrezeptor CD40 vermittelt wurde. Diese Annahme beruht auch darauf, dass TRAIL in HeLa-Zellen ausschließlich nach CHX-Sensitivierung und Apoptoseinhibition den Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert (Wajant et al., 2000). Klinisch muss daher möglicherweise berücksichtigt werden, dass Mitglieder der TNFSF auch anti-apoptotische Signale vermitteln und somit zum Teil das Immunsystem zu stark hochregulieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die geringe Aktivität von löslichem TRAIL mithilfe der artifiziellen Membranständigkeit gesteigert werden kann und gleichzeitig unerwünschte Nebeneffekte minimiert werden können. Zusätzlich besitzt das generierte Konstrukt stimulatorische Effekte auf Zellen des Immun-

systems. Auf diese Weise wird, unabhängig vom zytotoxischen Mechanismus, das Immunsystem hochreguliert und zu anti-tumoralen Aktivitäten stimuliert. Das scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsprotein könnte klinisch zur Therapie CD40-exprimierender Tumoren angewendet werden, um zwei unabhängige, potenziell synergistische Mechanismen zu vereinen: die TRAIL-vermittelte Apoptoseinduktion und die CD40-restringierten Hochregulation des Immunsystems.

6 Zusammenfassung

Der Ligand TRAIL wurde 1997 aufgrund seiner hohen Sequenzhomologie gegenüber dem TNFL CD95L entdeckt (28 %). Allerdings besitzt TRAIL, anders als die Liganden CD95L und TNF, die bemerkenswerte Eigenschaft vor allem in veränderten Zellen Apoptose zu induzieren, während gesunde Zellen davor bewahrt werden. Die TRAIL-induzierte Apoptose wird durch die apoptoseinduzierenden Todesrezeptoren TRAILR1 und TRAILR2 vermittelt. Allerdings bindet und aktiviert lösliches TRAIL hauptsächlich den Todesrezeptor TRAILR1, während membrangebundenes TRAIL sowohl TRAILR1 als auch TRAILR2 gut aktiviert. In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden entwickelt, um die Bioaktivität löslicher TNFL zu steigern. Hierzu zählen z.B.: Stabilisierung der trimeren Molekülanordnung über die TNC-Domäne, Oligomerisierung des Flag-getaggten Liganden mithilfe des monoklonalen Antikörpers M2, sowie Generierung einer artifiziellen, antigenabhängigen Membranständigkeit. In dieser Arbeit wurde der Oberflächenrezeptor CD40 zur Immobilisierung des generierten Fusionsproteins scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL genutzt. In verschiedenen Experimenten konnten mit scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL in CD40-exprimierenden Zellen starke Apoptoseinduktion ermittelt werden. Charakteristische Kennzeichen und Spaltprodukte der Apoptose konnten ausschließlich in CD40-positiven Tumorzellen detektiert werden. Dabei wurde in allen Versuchen die für die Apoptoseinduktion benötigte Konzentration des Konstrukts mithilfe des Proteinsyntheseinhibitors CHX um das 10- bis 100-fache verringert. Es konnte auch gezeigt werden, dass in CD40-positiven Zellen, nach Stimulation mit scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL, nicht-apoptotische Signalwege verstärkt aktiviert werden. Dies war auf die agonistische Aktivität des monoklonalen Antikörperfragments scFv:CD40 zurückzuführen. Die Antikörperdomäne war folglich nicht nur zur effizienten Aktivierung der TRAIL-Todesrezeptoren mittels Immobilisierung fähig, sondern konnte zusätzlich zur Stimulation des Immunsystems genutzt werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der lösliche, schwach aktive Ligand TRAIL mittels Oberflächenimmobilisierung über Antigen-

Antikörper-Wechselwirkungen in einen hochaktiven Liganden mit lokal begrenzter Toxizität überführt werden kann.

Mithilfe dieses Fusionsproteins ist es somit möglich die selektive Toxizität von TRAIL durch Steigerung seiner Aktivität effizient zu nutzen. Zusätzlich kann durch die Antigenbindung der Wirkungsbereich weiter eingegrenzt werden (CD40-positive Tumoren), wodurch unerwünschte Nebenwirkungen reduziert oder sogar ausgeschaltet werden können. Das in Tumoren oft heruntergefahrenes Immunsystem kann CD40-abhängig stimuliert werden, um somit auch Tumorzellen in apoptoseresistenten Stadien zu eliminieren. Basierend auf diesen Ergebnissen können in der Zukunft weitere Studien zur Therapie von TRAIL-resistenten, CD40-exprimierenden Tumoren fortgeführt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Advani, R., Forero-Torres, A., et al., **(2009)**, *Phase I study of the humanized anti-CD40 monoclonal antibody dacetuzumab in refractory or recurrent non-Hodgkin's lymphoma*. *J. Clin. Oncol.* 27, 4371–4377.
- Aggarwal, B., **(2000)**, *Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB*. *Ann. Rheum. Dis.* 59 (Suppl 1), i6-i16.
- Alderson, M.R., Armitage, R.J., et al., **(1993)**, *CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40*. *J. Exp. Med.* 178, 669–674.
- Allen, R.C., Armitage, R.J., et al., **(1993)**, *CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome*. *Science* 259, 990–993.
- Almasan, A. and Ashkenazi, A., **(2003)**, *Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy*. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 337–348.
- An, H.J., Kim, Y.J., et al., **(2011)**, *Crystallographic and mutational analysis of the CD40-CD154 complex and its implications for receptor activation*. *J. Biol. Chem.* 286, 11226–11235.
- Annunziata, C.M., Safiran, Y.J., et al., **(2000)**, *Hodgkin disease: pharmacologic intervention of the CD40-NF kappa B pathway by a protease inhibitor*. *Blood* 96, 2841–2848.
- Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H., **(1990)**, *Apoptosis. The role of the endonuclease*. *Am. J. Pathol.* 136, 593–608.
- Armitage, R.J., **(1994)**, *Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands*. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 407–413.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M., **(1998)**, *Death receptors: signaling and modulation*. *Science* 281, 1305–1308.
- Ashkenazi, A., Pai, R.C., et al., **(1999)**, *Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand*. *J. Clin. Invest.* 104, 155–162.
- Assouhou-Luty, C., Gerspach, J., et al., **(2006)**, *A CD40-CD95L fusion protein interferes with CD40L-induced prosurvival signaling and allows membrane CD40L-restricted activation of CD95*. *J. Mol. Med.* 84, 785–797.
- Baggiolini, M. and Clark-Lewis, I., **(1992)**, *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine*. *FEBS Letters* 307, 97–101.

- Banchereau, J., Bazan, F., et al., **(1994)**, *The CD40 antigen and its ligand*. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 881–922.
- Banner, D.W., D'Arcy, A., et al., **(1993)**, *Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation*. *Cell* 73, 431–445.
- Beatty, G.L., Chiorean, E.G., et al., **(2011)**, *CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans*. *Science* 331, 1612–1616.
- Beg, A.A., Finco, T.S., et al., **(1993)**, *Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3301–3310.
- Bensingler, W., Maziarz, R.T., et al., **(2012)**, *A phase 1 study of lucatumumab, a fully human anti-CD40 antagonist monoclonal antibody administered intravenously to patients with relapsed or refractory multiple myeloma*. *Br. J. Haematol.* 159, 58–66.
- Berg, D., Lehne, M., et al., **(2007)**, *Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L*. *Cell Death Differ.* 14, 2021–2034.
- Boatright, K.M., Renatus, M., et al., **(2003)**, *A unified model for apical caspase activation*. *Mol. Cell* 11, 529–541.
- Bodmer, J.L., Schneider, P., Tschopp, J., **(2002)**, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. *Trends Biochem. Sci.* 27, 19–26.
- Bodmer, J.L., Meier, P., et al., **(2000)**, *Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL*. *J. Biol. Chem.* 275, 20632–20637.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., et al., **(1996)**, *Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death*. *Cell* 85, 803–815.
- Bremer, E., Kuijlen, J., et al., **(2004)**, *Target cell-restricted and -enhanced apoptosis induction by a scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for the pancarcinoma-associated antigen EGP2*. *Int. J. Cancer* 109, 281–290.
- Bremer, E., Samplonius, D.F., et al., **(2005)**, *Simultaneous inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling and enhanced activation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor-mediated apoptosis induction by an scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for human EGFR*. *J. Biol. Chem.* 280, 10025–10033.

- Carpenter, E.L., Mick, R., et al., **(2009)**, *Activation of human B cells by the agonist CD40 antibody CP-870,893 and augmentation with simultaneous toll-like receptor 9 stimulation*. *J. Transl. Med.* 7, 93.
- Chan, F.K., Chun, H.J., et al., **(2000)**, *A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling*. *Science* 288, 2351–2354.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., et al., **(1995)**, *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis*. *Cell* 81, 505–512.
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., et al., **(2010)**, *The BCL-2 family reunion*. *Mol. Cell* 37, 299–310.
- Cory, S., Huang, D.C.S., Adams, J.M., **(2003)**, *The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis*. *Oncogene* 22, 8590–8607.
- Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J., **(2004)**, *Cell death: critical control points*. *Cell* 116, 205–219.
- Degli-Esposti, M.A., Dougall, W.C., et al., **(1997a)**, *The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain*. *Immunity* 7, 813–820.
- Degli-Esposti, M.A., Smolak, P.J., et al., **(1997b)**, *Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family*. *J. Exp. Med.* 186, 1165–1170.
- Devin, A., Cook, A., et al., **(2000)**, *The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation*. *Immunity* 12, 419–429.
- Diehl, L., den Boer, A.Th., et al., **(1999)**, *CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy*. *Nat. Med.* 5, 774–779.
- Eliopoulos, A.G., Davies, C., et al., **(2000)**, *CD40 induces apoptosis in carcinoma cells through activation of cytotoxic ligands of the tumor necrosis factor superfamily*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5503–5515.
- El-Mesery, M., Trebing, J., et al., **(2013)**, *CD40-directed scFv-TRAIL fusion proteins induce CD40-restricted tumor cell death and activate dendritic cells*. *Cell Death Dis* 4, e916.
- Emery, J.G., McDonnell, P., et al., **(1998)**, *Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL*. *J. Biol. Chem.* 273, 14363–14367.
- Falschlehner, C., Emmerich, C.H., et al., **(2007)**, *TRAIL signalling: decisions between life and death*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1462–1475.

- Fesik, S.W., (2000), *Insights into programmed cell death through structural biology*. Cell 103, 273–282.
- Goodwin, R.G., Din, W.S., et al., (1993), *Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor*. Eur. J. Immunol. 23, 2631–2641.
- Gordon, J., (1995), *CD40 and its ligand: central players in B lymphocyte survival, growth, and differentiation*. Blood Rev. 9, 53–56.
- Grell, M., Zimmermann, G., et al., (1999), *Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF*. EMBO J. 18, 3034–3043.
- Griffith, T.S., Wiley, S.R., et al., (1999), *Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL*. J. Exp. Med. 189, 1343–1354.
- Gruss, H.J. and Dower, S.K., (1995), *Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas*. Blood 85, 3378–3404.
- Heath, A.W., Chang, R., et al., (1993), *Antibodies to murine CD40 stimulate normal B lymphocytes but inhibit proliferation of B lymphoma cells*. Cell. Immunol. 152, 468–480.
- Heller, R.A. and Krönke, M., (1994), *Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways*. J. Cell Biol. 126, 5–9.
- Henshall, D.C. and Engel, T., (2013), *Contribution of apoptosis-associated signaling pathways to epileptogenesis: lessons from Bcl-2 family knockouts*. Front Cell Neurosci 7, 110.
- Herbeuval, J.P., Lambert, C., et al., (2003), *Macrophages from cancer patients: analysis of TRAIL, TRAIL receptors, and colon tumor cell apoptosis*. J. Natl. Cancer Inst. 95, 611–621.
- Herbst, R.S., Eckhardt, S.G., et al., (2010), *Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer*. J. Clin. Oncol. 28, 2839–2846.
- Holler N., Tardivel A., et al., (2003), *Two Adjacent Trimeric Fas Ligands Are Required for Fas Signaling and Formation of a Death-Inducing Signaling Complex*. Mol Cell Biol. 23, 1428-1440.
- Hymowitz, S.G., O'Connell, M.P., et al., (2000), *A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL*. Biochemistry 39, 633–640.
- Irmler, M., Thome, M., et al., (1997), *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP*. Nature 388, 190–195.

- Kammerer, R.A., Schulthess, T., et al., **(1998)**, *Tenascin-C hexabrachion assembly is a sequential two-step process initiated by coiled-coil alpha-helices*. J. Biol. Chem. 273, 10602–10608.
- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., et al., **(1993)**, *Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis*. Cancer Res. 53, 3976–3985.
- Kelley, S.K. and Ashkenazi, A., **(2004)**, *Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL*. Curr. Opin. Pharmacol. 4, 333–339.
- Khubchandani, S., Czuczman, M.S., Hernandez-Ilizaliturri, F.J., **(2009)**, *Dacetuzumab, a humanized mAb against CD40 for the treatment of hematological malignancies*. Curr. Opin. Investig. Drugs 10, 579–587.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., et al., **(1995)**, *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. EMBO J 14, 5579–5588.
- Koschny, R., Walczak, H., Ganten, T.M., **(2007)**, *The promise of TRAIL--potential and risks of a novel anticancer therapy*. J. Mol. Med. 85, 923–935.
- Krippner-Heidenreich, A.K., Grunwald, I., et al., **(2008)**, *Single-Chain TNF, a TNF Derivative with Enhanced Stability and Antitumoral Activity*. J. Immunol. 180, 8176–8183.
- Lavrik, I., Golks, A., Krammer, P.H., **(2005)**, *Death receptor signaling*. J. Cell. Sci. 118, 265–267.
- Lawrence, D., Shahrokh, Z., et al., **(2001)**, *Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions*. Nat. Med. 7, 383–385.
- Levkau, B., Herren, B., et al., **(1998)**, *Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis*. J. Exp. Med. 187, 579–586.
- Li, F. and Ravetch, J.V., **(2011)**, *Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies*. Science 333, 1030–1034.
- Li, P., Nijhawan, D., et al., **(1997)**, *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell 91, 479–489.
- Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J., **(2001)**, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell 104, 487–501.
- Mallett, S. and Barclay, A.N., **(1991)**, *A new superfamily of cell surface proteins related to the nerve growth factor receptor*. Immunol. Today 12, 220–223.

- Mariani, S.M., Matiba, B., et al., **(1997)**, *Interleukin 1 beta-converting enzyme related proteases/caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells*. J. Cell Biol. 137, 221–229.
- Michiels, F., Stam, J.C., et al., **(1997)**, *Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH2-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH2-terminal kinase activation*. J. Cell Biol. 137, 387–398.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., et al., **(2002)**, *Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications*. Blood 99, 4079–4086.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., et al., **(1996)**, *FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex*. Cell 85, 817–827.
- Nagata, S., **(1997)**, *Apoptosis by death factor*. Cell 88, 355–365.
- Naismith, J.H., Devine, T.Q., et al., **(1995)**, *Crystallographic evidence for dimerization of unliganded tumor necrosis factor receptor*. J. Biol. Chem. 270, 13303–13307.
- Naismith, J.H. and Sprang, S.R., **(1998)**, *Modularity in the TNF-receptor family*. Trends Biochem. Sci. 23, 74–79.
- Noelle, R.J., **(1996)**, *CD40 and its ligand in host defense*. Immunity 4, 415–419.
- Pan, G., Ni, J., et al., **(1997a)**, *An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL*. Science 277, 815–818.
- Pan, G., O'Rourke, K., et al., **(1997b)**, *The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL*. Science 276, 111–113.
- Piras, V., Hayashi, K., et al., **(2011)**, *Enhancing apoptosis in TRAIL-resistant cancer cells using fundamental response rules*. Sci. Rep. 1, 144.
- Pitti, R.M., Marsters, S.A., et al., **(1996)**, *Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family*. J. Biol. Chem. 271, 12687–12690.
- Pullen, S.S., Labadia, M.E., et al., **(1999)**, *High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization*. Biochemistry 38, 10168–10177.
- Rothe, M., Sarma, V., et al., **(1995)**, *TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40*. Science 269, 1424–1427.
- Roy, N., Deveraux, Q.L., et al., **(1997)**, *The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases*. EMBO J. 16, 6914–6925.

- Salvesen, G.S. and Dixit, V.M., (1999), *Caspase activation: the induced-proximity model*. PNAS. 96, 10964–10967.
- Samel, D., Müller, D., et al., (2003), *Generation of a FasL-based Proapoptotic Fusion Protein Devoid of Systemic Toxicity due to Cell-surface Antigen-restricted Activation*. J. Biol. Chem. 278, 32077–32082.
- Schneider, B., Münkkel, S., et al., (2010), *Potent antitumoral activity of TRAIL through generation of tumor-targeted single-chain fusion proteins*. Cell Death Dis. 1, e68.
- Schneider, P., Thome, M., et al., (1997), *TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB*. Immunity 7, 831–836.
- Schoenberger, S.P., Toes, R.E.M., et al., (1998), *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions*. Nature 393, 480–483.
- Schönbeck, U. and Libby, P., (2001), *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. Cell. Mol. Life Sci. 58, 4–43.
- Schoppet, M., Preissner, K.T., Hofbauer, L.C., (2002), *RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 22, 549–553.
- Schultze, J. and Johnson, P., (1999), *A stimulating new target for cancer immunotherapy*. Lancet 354, 1225–1227.
- Screaton, G.R., Mongkolsapaya, J., et al., (1997), *TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL*. Curr. Biol. 7, 693–696.
- Siegmund, D., Hadwiger, P., et al., (2002), *Selective inhibition of FLICE-like inhibitory protein expression with small interfering RNA oligonucleotides is sufficient to sensitize tumor cells for TRAIL-induced apoptosis*. Mol. Med. 8, 725–732.
- Simonet, W.S., Lacey, D.L., et al., (1997), *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell 89, 309–319.
- Skaug, B., Jiang, X., Chen, Z.J., (2009), *The Role of Ubiquitin in NF-κB Regulatory Pathways*. Annu. Rev. Biochem. 78, 769–796.
- Smith, C.A., Farrah, T., Goodwin, R.G., (1994), *The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death*. Cell 76, 959–962.
- Smulski, C.R., Beyrath, J., et al., (2013), *Cysteine-rich domain 1 of CD40 mediates receptor self-assembly*. J. Biol. Chem. 288, 10914–10922.

- Takeda, K., Smyth, M.J., et al., **(2002)**, *Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development*. J. Exp. Med. 195, 161–169.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., et al., **(1993)**, *A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death*. Cell 74, 845–853.
- Thome, M., Schneider, P., et al., **(1997)**, *Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors*. Nature 386, 517–521.
- van Antwerp, D.J., Martin, S.J., et al., **(1998)**, *Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B*. Trends Cell Biol. 8, 107–111.
- van Kooten, C. and Banchereau, J., **(1996)**, *CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair*. Adv. Immunol. 61, 1–77.
- van Kooten, C. and Banchereau, J., **(2000)**, *CD40-CD40 ligand*. J. Leukoc. Biol. 67, 2–17.
- Varfolomeev, E., Maecker, H., et al., **(2005)**, *Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*. J. Biol. Chem. 280, 40599–40608.
- Verma, I.M., Stevenson, J.K., et al., **(1995)**, *Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation*. Genes Dev. 9, 2723–2735.
- Vogel, L.A. and Noelle, R.J., **(1998)**, *CD40 and its crucial role as a member of the TNFR family*. Semin. Immunol. 10, 435–442.
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J., **(2000)**, *Surfing the p53 network*. Nature 408, 307–310.
- Vonderheide, R.H., **(2007)**, *Prospect of targeting the CD40 pathway for cancer therapy*. Clin. Cancer Res. 13, 1083–1088.
- Vonderheide, R.H. and Glennie, M.J., **(2013)**, *Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy*. Clin. Cancer Res. 19, 1035–1043.
- Voorzanger-Rousselot, N. and Blay, J.Y., **(2004)**, *Coexpression of CD40 and CD40L on B lymphoma and carcinoma cells: an autocrine anti-apoptotic role*. Leuk. Lymphoma 45, 1239–1245.
- Wajant, H., Gerspach, J., Pfizenmaier, K., **(2005)**, *Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors*. Cytokine Growth Factor Rev. 16, 55–76.
- Wajant, H., Gerspach, J., Pfizenmaier, K., **(2013)**, *Engineering death receptor ligands for cancer therapy*. Cancer Lett. 332, 163–174.

- Wajant, H., Haas, E., et al., **(2000)**, *Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD)*. J. Biol. Chem. 275, 24357–24366.
- Wajant, H., Moosmayer, D., et al., **(2001)**, *Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative*. Oncogene 20, 4101–4106.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., **(2003)**, *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death Differ. 10, S. 45–65.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., et al., **(1997)**, *TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL*. EMBO J. 16, 5386–5397.
- Walczak, H., Miller, R.E., et al., **(1999)**, *Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo*. Nat. Med. 5, 157–163.
- Wiley, S.R., Schooley, K., et al., **(1995)**, *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity 3, 673–682.
- Wyzgol, A., Müller, N., et al., **(2009)**, *Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand*. J. Immunol. 183, 1851–1861.
- Zandi, E., Rothwarf, D.M., et al., **(1997)**, *The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation*. Cell 91, 243–252.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

+	positiv
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (millionster Teil, 10 ⁻⁶)
A1/Bff-1	Bcl-2-related gene A1
AS	Aminosäure
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor-1
APS	Ammoniumpersulfat
APZ	antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
B-Zelle	bone marrow-Zelle, B-Lymphozyt
BAFFR	B-cell-activating factor receptor
Bak	Bcl-2 agonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-w	Bcl-2-like-2
Bcl-X _L	Bcl-2-like protein 1
BCMA	B-cell maturation antigen
BID	Bhd 3-interacting domain death agonist
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ca.	circa
Caspase	cysteinyl aspartat specific protease
CD	cluster of differentiation
CD27	Tp55, TNFRSF7
CD30	TNFRSF8
CD40	TNFRSF5
CD40L	CD40-Ligand, CD154

CD95	Fas, TNFRSF6, Apo1
CD95L	CD95-Ligand
cFLIP _{L/S}	cellular FLICE-like inhibitory protein long/short
CHX	Cycloheximid
clAP	cellular inhibitor of apoptosis protein
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX 2	Cyclooxygenase 2
CRD	cysteinreiche Domäne
CTL	zytotoxische T-Lymphozyt
DcR	decoy receptor, Köderrezeptor
DD	death domain, Todesdomäne
DED	death effector domain, Todes-Effektor-Domäne
DISC	death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DR	death receptor, Todesrezeptor
DTT	Dithiothreitol
DZ	dendritische Zelle
EDAR	ectodysplasin A receptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular regulated kinase
FADD	Fas-associated death domain
Fak	focal adhesion kinase
Fc	crystallisable fragment
FCS	fötales Kälberserum
FLICE	FADD-like Interleukin-1 β -converting enzyme
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
Fn14	fibroblast growth factor-inducible molecule 14
g	gramm

GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GpL	Gaussia princeps Luziferase
h	Stunde
HIGM	Hyper-IgM-Syndrom
HRP	horse radish peroxidase
IκB	inhibitor of kappa B
IAP	inhibitor of apoptosis protein
Ig	Immunoglobulin
IKK	IκB kinase
IL	Interleukin
JAK3	Janus Kinase 3
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LTα	Lymphotoxin alpha
LTβ	Lymphotoxin beta
m	milli (tausendster teil, 10 ⁻³)
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
mAb	monoklonaler Antikörper
MAP3K	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
Mcl1	myleoid cell leukemia 1
MEKK	mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase
min	Minute/n
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MW	molecular weight
n	Nano (milliardster Teil, 10 ⁻⁹)
NFκB	nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
NGFR	nerve growth factor receptor
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NIK	NfκB-inducing kinase

NK	natürliche Killerzellen
NLS	Kernlokalisationssequenz
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
N-Terminus	Amino-Terminus
OPG	Osteoprotegerin
P38MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase 1
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH	potentia hydrogenii
PLAD	pre-ligand assembly domain
RANK	receptor activator of nuclear factor- κ B
RANKL	receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, OPGL
RIP1	receptor interacting protein 1
rpm	rounds/revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
scFv	single chain variable fragment
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMAC/Diablo	second mitochondria-derived activator of caspase/ direct IAP binding protein with low pI
sTRAIL	soluble/löslicher TRAIL
T-Zelle	Thymus Zelle, T-Lymphozyt
TACI	transmembrane activator and cyclophilin ligand interactor
tBID	truncated BID
TBS	tris buffered Saline
TEMED	Tetramethyldiamin
THD	TNF homology domain
Tiam1	T-Zell Lymphom Invasion und Metastasierung 1
TL1	TNF-ligand-related molecule 1
TNC	Tenascin-C

TNF	Tumornekrosefaktor, tumor necrosis factor
TNFL	Tumornekrosefaktor-Ligand
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	TNF-receptor-associated death domain
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand, Apo2L
TRAILR	TNF-related apoptosis-inducing receptor
TRID	TRAIL-receptor without an intracellular domain, TRAILR3
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TWEAK	TNF-related weak inducer of apoptosis
u.a	unter anderem
UV-Strahlen	ultraviolette Strahlung
V	Volt
WT	Wildtyp
XEDAR	X-linked ectodermal dysplasia receptor
XIAP	X-linked IAP
z.B.	zum Beispiel
zVAD	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluormethyl-Keton

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die TRAIL-Rezeptoren	6
Abbildung 2:	Die TRAIL-vermittelte Apoptose	10
Abbildung 3:	TRAIL-vermittelte Aktivierung alternativer Signalwege	13
Abbildung 4:	CD40-vermittelte intrazelluläre Signalwege	17
Abbildung 5:	Schematischer Aufbau des scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsproteins	33
Abbildung 6:	Analyse des gereinigten scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionproteins mittels Silberfärbung	34
Abbildung 7:	Vergleich der Zytotoxizität von aufgereinigtem scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsprotein mit Proteinüberstand auf HT1080-CD40-Transfektanten	35
Abbildung 8:	Schematischer Aufbau des scFv:CD40-Fc-Flag-GpL-Fusionsproteins	37
Abbildung 9:	Blockade des CD40-Oberflächerezeptors vermindert die apoptotische Wirkung von scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsprotein auf CD40-exprimierenden Zellen	38
Abbildung 10:	Zytotoxischer Effekt des scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsproteins auf CD40-negativen und CD40-exprimierenden HT1080- und HeLa-Zellen	40
Abbildung 11:	scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL aktiviert neben der Apoptose inflammatorische Signale in CD40-exprimierenden Tumorzellen	42
Abbildung 12:	CD40-restringierte Aktivierung der TRAIL-Todesrezeptoren ist anhand charakteristischer apoptotischer Merkmale erkennbar	44
Abbildung 13:	Schematischer Aufbau des Fusionsproteins scFv:CD40-Flag-scTRAIL	45
Abbildung 14:	Vergleich der trimeren Anordnung von scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL (A) mit scFv:CD40-Flag-scTRAIL (B)	46
Abbildung 15:	Zytotoxische Aktivität des scFv:CD40-Flag-scTRAIL-Fusionsproteins auf CD40-negativen und CD40-transfizierten HT1080-Zellen	47
Abbildung 16:	scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL induziert die Prozessierung von Caspasen und Caspasesubstraten in CD40-exprimierenden Zellen	49
Abbildung 17:	CD40-restringierte Aktivierung der TRAIL-Todesrezeptoren	54

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liganden der TNFSF mit ihren entsprechenden Nicht-Todesrezeptoren und Todesrezeptoren (Bodmer et al., 2002)

3

8.4 DNA- und Aminosäuresequenzen der Fusionsproteine

8.4.1 scFv:CD40-Flag-TNC-TRAIL

	nt	aa
<i>Signalpeptid</i>	1-77	1-26
<u>scFv:CD40-Antikörperfragment</u>	83-815	29-272
Flag-Epitop	822-845	275-282
<i>TNC-Trimerisierungsdomäne (aa 100-139)</i>	846-944	283-315
<u>extrazelluläre Domäne des humanen TRAIL</u>	978-1438	327-514

```

1   atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag ggc gtg cag tgc
1   M  N  F  G  F  S  L  I  F  L  V  L  V  L  K  G  V  Q  C
57  gag gtg aag ctg gtg cca cgc gga tct gac atc gtg atg act cag aac cca ctg tct
20  E  V  K  L  V  P  R  G  S  D  I  V  M  T  Q  N  P  L  S
114 ctg cct gtg tct ctg ggg gat gag gct agc att tct tgc cgc tca tct cag tca ctg
39  L  P  V  S  L  G  D  E  A  S  I  S  C  R  S  S  Q  S  L
171 gag aac tcc aat ggc aac acc ttc ctg aat tgg ttt ttc cag aaa ccc gcc cag tca
58  E  N  S  N  G  N  T  F  L  N  W  F  F  Q  K  P  G  Q  S
228 cct cag ctg ctc atc tac cga gtg agc aat cgg ttt agc gga gtg ccc gat cga ttc
77  P  Q  L  L  I  Y  R  V  S  N  R  F  S  G  V  P  D  R  F
285 tct ggc ttc gga tct ggg acc gac ttt acc ctg aaa atc tca cga gtg gag gcc gag
96  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  K  I  S  R  V  E  A  E
342 gat ctg gga gtg tac ttc tgt ctc cag gtc aca cat gtg cct tac aca ttt ggc ggc
115 D  L  G  V  Y  F  C  L  Q  V  T  H  V  P  Y  T  F  G  G
399 gga aca act ctc gaa atc aaa gga ggc gga ggc tcc gcc gga ggc gga tct ggc gga
134 G  T  T  L  E  I  K  G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  G  G
456 ggc gga agt gat atc cag ctc cag cag tct ggc cct gga ctc gtc aaa cca tct cag
153 G  G  S  D  I  Q  L  Q  Q  S  G  P  G  L  V  K  P  S  Q
513 agc ctg tct ctc acc tgt tct gtc acc gga tac tcc atc acc acc aac tac aac tgg
172 S  L  S  L  T  C  S  V  T  G  Y  S  I  T  T  N  Y  N  W
570 aat tgg att cgg cag ttt cct ggg aac aaa ctc gaa tgg atg gga tac atc cga tac
191 N  W  I  R  Q  F  P  G  N  K  L  E  W  M  G  Y  I  R  Y
627 gac ggc act agt gaa tac acc cca tct ctc aaa aat cgg gtg tcc att acc cgg gac
210 D  G  T  S  E  Y  T  P  S  L  K  N  R  V  S  I  T  R  D
684 act tct atg aac cag ttc ttt ctc cga ctc acc tct gtg aca cct gag gat acc gcc
229 T  S  M  N  Q  F  F  L  R  L  T  S  V  T  P  E  D  T  A
741 aca tac tac tgt gct aga ctg gac tac tgg ggg cag gga aca ctg gtg acc gtg tca
248 T  Y  Y  C  A  R  L  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S

```

798 tct gct tcc acc aaa gga gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa gat atc gcc
 267 S A S T K G G S D Y K D D D D K D I A
 855 tgt ggc tgt gcg gct gcc cca gac atc aag gac ctg ctg agc aga ctg gag gag ctg
 286 C G C A A A P D I K D L L S R L E E L
 912 gag ggg ctg gta tcc tcc ctg cgg gag cag ggt acc gga ggt ggg tct ggc ggc cgc
 305 E G L V S S L R E Q G T G G G S G G R
 969 ggt gaa ttc acc tct gag gga acc att tct aca gtt caa gaa aag caa caa aat att
 324 G E F T S E E T I S T V Q E K Q Q N I
 1026 tct ccc cta gtg aga gaa aga ggt cct cag aga gta gca gct cac ata act ggg acc
 343 S P L V R E R G P Q R V A A H I T G T
 1083 aga gga aga agc aac aca ttg tct tct cca aac tcc aag aat gaa aag gct ctg ggc
 362 R G R S N T L S S P N S K N E K A L G
 1140 cgc aaa ata aac tcc tgg gaa tca tca agg agt ggg cat tca ttc ctg agc aac ttg
 381 R K I N S W E S S R S G H S F L S N L
 1197 cac ttg aag aat ggt gaa ctg gtc atc cat gaa aaa ggg ttt tac tac atc tat tcc
 400 H L R N G E L V I H E K G F Y Y I Y S
 1254 caa aca tac ttt cga ttt cag gag gaa ata aaa gaa aac aca aag aac gac aaa caa
 419 Q T Y F R F Q E E I K E N T K N D K Q
 1311 atg gtc caa tat att tac aaa tac aca agt tat cct gac cct ata ttg ttg atg aaa
 438 M V Q Y I Y K Y T S Y P D P I L L M K
 1368 agt gct aga aat agt tgt tgg tct aaa gat gca gaa tat gga ctc tat tcc atc tat
 457 S A R N S C W S K D A E Y G L Y S I Y
 1425 caa ggg gga ata ttt gag ctt aag gaa aat gac aga att ttt gtt tct gta aca aat
 476 Q G G I F E L K E N D R I F V S V T N
 1482 gag cac ttg ata gac atg gac cat gaa gcc agt ttt ttc ggg ggc ttt tta gtt ggc
 495 E H L I D M D H E A S F F G A F L V G
 1439 tta
 514 -

8.4.2 scFv:CD40-Fc-Flag-GpL

	nt	aa
<i>Signalpeptid</i>	1-77	1-26
<u>scFv:CD40-Antikörperfragment</u>	83-815	29-272
<i>Fc-Domane des humanen Immunglobulin 1</i>	821-1499	275-500
Flag-Epitop	1506-1529	503-510
<u>Gaussia princeps Luziferase</u>	1536-2039	513-680

1 atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag ggc gtg cag tgc
1 M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C
57 gag gtg aag ctg gtg cca cgc gga tct gac atc gtg atg act cag aac cca ctg tct
20 E V K L V P R D G S I V M T Q N P L S
114 ctg cct gtg tct ctg ggg gat gag gct agc att tct tgc cgc tca tct cag tca ctg
39 L P V S L G D E A S I S C R S S Q S L
171 gag aac tcc aat ggc aac acc ttc ctg aat tgg ttt ttc cag aaa ccc gcc cag tca
58 E N S N G N T F L N W F F Q K P G Q S
228 cct cag ctg ctc atc tac cga gtg agc aat cgg ttt agc gga gtg ccc gat cga ttc
77 P Q L L I Y R V S N R F S G V P D R F
285 tct ggc ttc gga tct ggg acc gac ttt acc ctg aaa atc tca cga gtg gag gcc gag
96 S G S G S G T D F T L K I S R V E A E
342 gat ctg gga gtg tac ttc tgt ctc cag gtc aca cat gtg cct tac aca ttt ggc gg
115 D L G V Y F C L Q V T H V P Y T F G G
399 gga aca act ctc gaa atc aaa gga ggc gga ggc tcc ggc gga ggc gga tct ggc gga
134 G T T L E I K G G G G S G G G G S G G
456 ggc ggg agt gat atc cag ctc cag cag tct ggc cct gga ctc gtc aaa cca tct cag
153 G G S D I Q L Q Q S G P G L V K P S Q
513 agc ctg tct ctc acc tgt tct gtc acc gga tac tcc atc acc acc tac aac tgg aat
172 S L S L T C S V T G Y S I T T N Y N W
570 tgg att att cgg cag ttt cct ggg aac aaa ctc gaa tgg atg gga tac atc cga tac
191 N W I R Q F P G N K L E W M G Y I R Y
627 gac ggc act agt gaa tac acc cca tct ctc aaa aat cgg gtg tcc att acc cgg gac
210 D G T S E Y T P S L K N R V S I T R D
684 act tct atg aac cag ttc ttt ctc cga ctc acc tct gtg aca cct gag gat acc gcc
229 T S M N Q F F L R L T S V T P E D T A
741 aca tac tac tgt gct aga ctg gac tac tgg ggg cag gga aca ctg gtg acc gtg tca
248 T X Y C A R L D Y W G Q G T L V T V S
798 tct gct tcc acc aaa gga gga tcc aaa act cac aca tgc cca cgg tgc cca gca cct
267 S A S T K G G S K T H T C P P C P A P
855 gaa ctc ctg ggg gga cgg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc
286 E L L G G P S V F L F P P K P K D T L
912 atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac
305 M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
969 cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca
324 P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T

1026 aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gt
 343 K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V
 1083 ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc
 362 L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A
 1140 ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca
 381 L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P
 1197 cag gtc tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg
 400 Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L
 1254 acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat
 419 T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N
 1311 ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ttg gac ttc gac gcc ttc
 438 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S
 1368 ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc
 457 F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V
 1425 ttc toa tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc
 476 F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
 1482 tcc ctg tct ccg ggt aaa gaa tcc **gat tac aaa gac gat gac gat aaa** ctc gag aaa
 495 S L S P G K E F **D Y K D D D D K** L E K
 1539 cca acc gag aat aat gag gat ttc aac atc gtg gct gtg gca tcc aat ttt gct acc
 14 P T E N N E D F N I V A V A S N F A T
 1596 acc gac ctc gat gcc gat cgg gga aaa ctg cct ggc aaa aaa ctg ccc ctg gaa gtg
 533 T D L D A D R G K L P G K K L P L E V
 1653 ctg aaa gag atg gag gcc aac gct aga aaa gct ggc tgt act aga gga tgt ctc atc
 552 L K E M E A N A R K A G C T R G C L I
 1710 tgc ctg tcc cac atc aag tgt acc cca aaa atg aaa aaa ttc atc cct ggc cgg tgt
 571 C L S H I K C T P K M K K F I P G R C
 1767 cac aca tac gag ggc gac aag gaa tct gct cag ggc gga atc gga gag gct att gtg
 590 H T Y E G D K E S A Q G G I G E A I V
 1824 gat att cct gaa att cct gga ttc aag gac ctg gag cct atg gaa cag ttt atc gcc
 609 D I P E I P G F K D L E P M E Q F I A
 1881 cag gtg gac ctc tgt gtc gat tgt aca act ggc tgc ctg aaa ggg ctg gcc aat gtc
 628 Q V D L C V D C T T G C L K G L A N V
 1938 cag tgt agt gac ctg ctg aaa aaa tgg ctg ccc cag aga tgt gcc act ttc gcc tct
 647 Q C S D L L K K W L P Q R C A T F A S
 1995 aaa att cag ggc cag gtc gac aaa atc aaa ggc gct gga gga gac taa tct aga
 666 K I Q G Q V D K I K G A G G D - S R

8.4.3 scFv:CD40-Flag-scTRAIL

	nt	aa
<i>Signalpeptid</i>	1-77	1-26
scFv:CD40-Antikörperfragment	83-815	29-272
Flag-Epitop	822-845	275-282
<u>extrazelluläre Domäne des humanen TRAIL</u>	861-1421	288-475
<u>extrazelluläre Domäne des humanen TRAIL</u>	1467-2027	490-676
<u>extrazelluläre Domäne des humanen TRAIL</u>	2073–2633	692-878

1 atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag ggc gtg cag tgc
1 M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C
57 gag gtg aag ctg gtg cca cgc gac gga tct atc gtg atg act cag aac cca ctg tct
20 E V K L V P R D G S I V M T Q N P L S
114 ctg cct gtg tct ctg ggg gat gag gct agc att tct tgc cgc tca tct cag tca ctg
39 L P V S L G D E A S I S C R S S Q S L
171 gag aac tcc aat ggc aac acc ttc ctg aat tgg ttt ttc cag aaa ccc gcc cag tca
58 E N S N G N T F L N W F F Q K P G Q S
228 cct cag ctg ctc atc tac cga gtg agc aat cgg ttt agc gga gtg ccc gat cga ttc
77 P Q L L I Y R V S N R F S G V P D R F
285 tct ggc ttc gga tct ggg acc gac ttt acc ctg aaa atc tca cga gtg gag gcc gag
96 S G S G S G T D F T L K I S R V E A E
342 gat ctg gga gtg tac ttc tgt ctc cag gtc aca cat gtg cct tac aca ttt ggc ggc
115 D L G V Y F C L Q V T H V P Y T F G G
399 gga aca act ctc gaa atc aaa gga ggc gga ggc tcc cgg ggc gga ggc tct ggc gga
134 G T T L E I K G G G G S G G G G S G G
456 ggc ggg agt gat atc cag ctc cag cag tct ggc cct gga ctc gtc aaa cca tct cag
153 G G S D I Q L Q Q S G P G L V K P S Q
513 agc ctg tct ctc acc tgt tct gtc acc gga tac tcc atc acc acc aac tac aac tgg
172 S L S L T C S V T G Y S I T T N Y N W
570 aat tgg att cgg cag ttt cct ggg aac aaa ctc gaa tgg atg gga tac atc cga tac
191 N W I R Q F P G N K L E W M G Y I R Y
627 gac ggc act agt gaa tac acc cca tct ctc aaa aat cgg gtg tcc att acc cgg gac
210 D G T S E Y T P S L K N R V S I T R D
684 act tct atg aac cag ttc ttt ctc cga ctc acc tct gtg aca cct gag gat acc gcc
229 T S M N Q F F L R L T S V T P E D T A
741 aca tac tac tgt gct aga ctg gac tac tgg ggg cag gga aca ctg gtg acc gtg tca
248 T Y Y C A R L D Y W G Q G T L V T V S
798 tct gct tcc acc aaa gga gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa gaa ttc acg
267 S A S T K G G S D Y K D D D D K E F T
855 cgt gga acc tct gag gga aac att tct aca gtt caa gaa aag caa caa aat att tct
286 R G T S E E T I S T V Q E K Q Q N I S
912 ccc cta gtg aga gaa aga ggt cct cag aga gta gca gct cac ata act ggg acc aga
305 P L V R E R G P Q R V A A H I T G T R

969 gga aga agc aac aca ttg tct tct cca aac tcc aag aat gaa aag gct ctg ggc cgc
 324 G R S N T L S S P N S K N E K A L G R
 1026 aaa ata aac tcc tgg gaa tca tca agg agt ggg cat tca ttc ctg agc aac ttg cac
 343 K I N S W E S S R S G H S F L S N L H
 1083 ttg agg aat ggt gaa ctg gtc atc cat gaa aaa ggg ttt tac tac atc tat tcc caa
 362 L R N G E L V I H E K G F Y Y I Y S Q
 1140 aca tac ttt cga ttt cag gag gaa ata aaa gaa aac aca aag aac gac aaa caa atg
 381 T Y F R F Q E E I K E N T K N D K Q M
 1197 gtc caa tat att tac aaa tac aca agt tat cct gac cct ata ttg ttg atg aaa agt
 400 V Q Y I Y K Y T S Y P D P I L L M K S
 1254 gct aga aat agt tgt tgg tct aaa gat gca gaa tat gga ctc tat tcc atc tat caa
 419 A R N S C W S K D A E Y G L Y S I Y Q
 1311 ggg gga ata ttt gag ctt aag gaa aat gac aga att ttt gtt tct gta aca aat gag
 438 G G I F E L K E N D R I F V S V T N E
 1368 cac ttg ata gac atg gac cat gaa gcc agt ttt ttc ggg ggc ttt tta gtt ggc ggt
 457 H L I D M D H E A S F F G A F L V G G
 1425 ggc ggt tct ggt ggc ggt tct ggt ggc ggt tct ggt ggc gga acc tct gag gga acc
 476 G G S G G G S G G G S G G G T S E E T
 1482 att tct aca gtt caa gaa aag caa caa aat att tct ccc cta gtg aga gaa aga ggt
 495 I S T V Q E K Q Q N I S P L V R E R G
 1539 cct cag aga gta gca gct cac ata act ggg acc aga gga aga agc aac aca ttg tct
 14 P Q R V A A H I T G T R G R S N T L S
 1596 tct cca aac tcc aag aat gaa aag gct ctg ggc cgc aaa ata aac tcc tgg gaa tca
 533 S P N S K N E K A L G R K I N S W E S
 1653 tca aag agt ggg cat tca ttc ctg agc aac ttg cac ttg aag aat ggt gaa ctg gtc
 552 S R S G H S F L S N L H L R N G E L V
 1710 atc cat gaa aaa ggg ttt tac tac atc tat tcc caa aca tac ttt cga ttt cag gag
 571 I H E K G F Y Y I Y S Q T Y F R F Q E
 1767 gaa ata aaa gaa aac aca aag aac gac aaa caa atg gtc caa tat att tac aaa tac
 590 E I K E N T K N D K Q M V Q Y I Y K Y
 1824 aca agt tat cct gac cct ata ttg ttg atg aaa agt gct aga aat agt tgt tgg tct
 609 T S Y P D P I L L M K S A R N S C W S
 1881 aaa gat gca gaa tat gga ctc tat tcc atc tat caa ggg gga ata ttt gag ctt aag
 628 K D A E Y G L Y S I Y Q G G I F E L K
 1938 gaa aat gac aga att ttt gtt tct gta aca aat gag cac ttg ata gac atg gac cat
 647 E N D R I F V S V T N E H L I D M D H
 1995 gaa gcc agt ttt ttc ggg gcc ttt tta gtt ggc ggt ggc ggt tct ggt ggc ggt tct
 666 E A S F F G A F L V G G G G S G G G S
 2052 ggt ggc ggt tct ggt ggc gga acc tct gag gga acc att tct aca gtt caa gaa aag
 685 G G G S G G G T S E E T I S T V Q E K
 2109 caa caa aat att tct ccc cta gtg aga gaa aga ggt cct cag aga gta gca gct cac
 704 Q Q N I S P L V R E R G P Q R V A A H
 2166 ata act ggg acc aga gga aga agc aac aca ttg tct tct cca aac tcc aag aat gaa
 723 I T G T R G R S N T L S S P N S K N E
 2223 aag gct ctg ggc cgc aaa ata aac tcc tgg gaa tca tca aag agt ggg cat tca ttc
 742 K A L G R K I N S W E S S R S G H S F
 2280 ctg agc aac ttg cac ttg agg aat ggt gaa ctg gtc atc cat gaa aaa ggg ttt tac
 761 L S N L H L R N G E L V I H E K G F Y
 2337 tac atc tat tcc caa aca tac ttt cga ttt cag gag gaa ata aaa gaa aac aca aag
 780 Y I Y S Q T Y F R F Q E E I K E N T K
 2394 aac gac aaa caa atg gtc caa tat att tac aaa tac aca agt tat cct gac cct ata
 799 N D K Q M V Q Y I Y K Y T S Y P D P I

2451 ttg ttg atg aaa agt gct aga aat agt tgt tgg tct aaa gat gca gaa tat gga ctc
818 L L M K S A R N S C W S K D A E Y G L

2508 tat tcc atc tat caa ggg gga ata ttt gag ctt aag gaa aat gac aga att ttt gtt
837 Y S I Y Q G G I F E L K E N D R I F V

2565 tct gta aca aat gag cac ttg ata gac atg gac cat gaa gcc agt ttt ttc ggg ggc
856 S V T N E H L I D M D H E A S F F G A

2622 ttt tta gtt ggc tga cca tcg act
875 F L V G - P S I

9 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Wajant für die besondere Möglichkeit, diese Arbeit parallel zu meinem Studium realisiert haben zu können. Vielen Dank für das interessante Thema, die hervorragende fachliche Betreuung und die vertrauensvolle Geduld.

Bei Prof. Dr. Edgar Serfling bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

Besonders danken möchte ich allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Innere Medizin für die geduldige Einarbeitung, die stetige Unterstützung, die hervorragende Betreuung und die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe. Ganz herzlich möchte ich mich besonders bei Johannes Trebing, Dr. Isabell Lang, Dr. Daniela Siegmund, Dr. Corinna Strohm, Daniela Weisenberger, Alvetina Rosenthal, Mohamed El-Mesery, Viktoria Schäfer, Dr. Agnes Wyzgol und Dr. Hilka Rauert-Wunderlich bedanken.

Ein großer Dank geht an meine Familie, Elvira, Andrea und Dietlinde Aumüller. Vielen Dank für eure stetige Unterstützung, das kritische Korrekturlesen und die anregenden Gespräche.

Danke Roland Aumüller für die Motivation und dafür, dass du schon immer ein besonderes Vorbild für mich bist.

Zum Schluss bedanke ich mich ganz besonders bei Tobi für die aufmunternden Worte, das geduldige Zuhören und die endlose Unterstützung. Ohne dich wäre es nicht möglich gewesen.