



**Die Bedeutung von Todesdomäne Adapterproteinen für die
Signaltransduktion des TNFR1 und der TRAIL Todesrezeptoren**

The meaning of death domain adaptor proteins in the signal transduction
of TNFR1 and TRAIL death receptors

Dissertation zur Erlangung des
Naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

vorgelegt von

Simone Alexandra Füllsack

geb. 10.12.1987 Hamburg

Würzburg 2019

Angefertigt in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin an der Medizinischen
Klinik und Poliklinik II

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:.....

Gutachter: Prof. Dr. Harald Wajant

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Müller

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Die Bedeutung von Todesdomäne Adapterproteinen für die Signaltransduktion des TNFR1 und der TRAIL Todesrezeptoren**“, eigenständig, d. h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

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

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: “**The meaning of death domain adaptor proteins in the signal transduction of TNFR1 and TRAIL death receptors**” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis. Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

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

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 16. Februar 2015 bis 31. Dezember 2018 an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin des Universitätsklinikums Würzburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Harald Wajant angefertigt.

Ahrensburg,.....

Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Harald Wajant für die Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit und seiner engagierten wissenschaftlichen Betreuung während dieser Zeit in seiner Arbeitsgruppe in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II. Seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und sein Interesse trugen dazu bei auftretende Probleme zu lösen und das der Doktorarbeit immer neue und interessante Aspekte hinzuzufügen.

Ebenso möchte ich Herren Prof. Dr. Müller und Prof. Andreas Beilhack danken, die meine Arbeit mitbetreut haben.

Außerdem gilt mein Dank der Arbeitsgruppe, die nicht nur für ein tolles Arbeitsumfeld gesorgt hat, in der ich mich nicht nur sehr wohl gefühlt habe, sondern auch immer jeden um Hilfe bitten konnte. Bedanken möchte ich mich auch bei Daniela Siegmund und Tina Rosenthal, die mir am meisten Hilfe und Wissen entgegengebracht haben und die beim Auf und Ab der Publikation stets an meiner Seite waren. An alle anderen Arbeitskollegen, die in dieser Zeit mit mir täglich im Labor standen, Danke, Danke, Danke, ich hatte eine wunderschöne Zeit!!!

Ich werde euch nie vergessen.

Hiermit möchte ich mich bei meinen Korrekturlesern bedanken, dass sie die Zeit aufgebracht haben, um so manchen Fehler zu beheben.

Am Ende gilt mein herzlicher Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meiner gesamten Promotionszeit unterstützt und mich in der Hoffnung für das Gelingen meiner Arbeit gestärkt haben.

Stay strong and keep going

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. TNFRSF-Rezeptoren und TNFSF-Liganden.....	7
1.1.1 TNFRSF-Rezeptoren.....	7
1.1.2 TNFSF-Liganden.....	8
1.2. Aktivierung und Signaltransduktion von TNFR1 und TRAILR1/2.....	9
1.2.1 Aktivierung und Signaltransduktion von TNFR1.....	10
1.2.2 Aktivierung und Signaltransduktion von TRAILR1/2.....	12
1.3. Signalwege.....	14
1.3.1 NFκB-Signalwege.....	14
1.3.2 Apoptose.....	16
1.3.3 Nekroptose.....	20
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	22
2. Material	23
2.1. Zellen.....	23
2.2. Western Blot Antikörper.....	23
2.3. Fusionsproteine.....	24
2.4. Lösungen und Puffer.....	25
2.5. Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmedien.....	26
2.6. Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	27
2.7. Computerprogramme.....	29
3. Methoden	30
3.1. Zellkultur.....	30
3.2. Toxizitäts-Assay.....	30
3.2.1 Zellaussaat.....	30
3.2.2 Stimulation.....	30
3.2.3 Färbung und Messung.....	31
3.2.4 Ermittlung des EC ₅₀ -Wertes.....	31
3.3. Western Blot.....	31
3.3.1 Zellaussaat.....	31
3.3.2 Stimulation.....	32
3.3.3 Herstellung von Totalzell-Lysaten.....	32
3.3.4 SDS-PAGE und Blotting.....	32
3.3.5 Antikörper-Inkubation und Detektion.....	33
3.4. IL-8 ELISA.....	33
3.4.1 Zellaussaat.....	33
3.4.2 Stimulation.....	33
3.4.1 Messung.....	34
4. Ergebnisse	35
4.1. TNF- und TRAIL-induzierter Zelltod in HeLa-LV Zellen und HeLa-RIPK3 Zellen.....	35

4.2. Relevanz der DD-Adapterproteine TRADD, FADD und RIPK1 für Caspase-Aktivierung und Zelltodinduktion durch TNF und TRAIL	41
4.3. Doppel- <i>Knockout</i> von TRADD und RIPK1 in HeLa-RIPK3 Zellen	52
4.4. Doppel- <i>Knockout</i> von FADD in Kombination mit TRADD oder RIPK1 in HeLa-RIPK3 Zellen	58
4.5. Einfluss von FADD und Caspase-8 auf die Nekroptose.....	64
4.6. TWEAK verstärkt TNF- und TRAIL-induzierte Nekroptose	68
5. Diskussion	76
5.1. Krankheiten und Therapie	76
5.2. In vivo und in vitro Versuche in der Literatur von FADD, TRADD und RIPK1	178
5.3. Auswirkungen der Knockouts von FADD, TRADD und RIPK1 auf die TNF- und TRAIL-Induktion von HeLa-RIPK3 Zellen	80
5.4. Modell über das Zusammenspiel von FADD, TRADD und RIPK1 nach TNFR1- und TRAIL1/2-Aktivierung	84
6. Zusammenfassung.....	87
7. Summary	88
8. Literaturverzeichnis	89
9. Anhang.....	94
9.1. Einzelwerte der Toxizitäts-Assays	94
9.2. Abkürzungsverzeichnis	106
9.3. Abbildungsverzeichnis	110
9.4. Tabellenverzeichnis	112
10. Publikationen	113

1. Einleitung

Um die Ursachen des Lebens zu studieren, müssen wir uns erst dem Tod zuwenden (Mary Shelley, Frankenstein, 1831).

Das Überleben eines Organismus ist vom Gleichgewicht zwischen zellaufbauenden und -abbauenden Prozessen abhängig. Katabole und anabole Prozesse werden hierbei durch Aktivierung von Signalwegen gesteuert. Kommt es zu Störungen innerhalb der Signalwege, entwickelt sich ein Ungleichgewicht zwischen aufbauenden und abbauenden Prozessen, was zur Entstehung von Krankheiten mit teils fatalen Folgen führen kann. Nach Bindung eines Liganden an den entsprechenden Rezeptor werden komplexe Signalkaskaden aktiviert, welche z.B. in Zellsynthese oder Zelltod münden. So kann die Aktivierung von Todesrezeptoren, die zu der TNF (*tumor necrosis factor*)-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF) gehören, entweder eine Inflammation, z.B. durch Aktivierung von NFκB (*nuclear factor kappa B*)-Transkriptionsfaktoren (TF) auslösen, aber auch Apoptose oder Nekroptose induzieren. Das Zusammenspiel von beteiligten Signaltransduktionsproteinen ist hierbei noch nicht vollständig verstanden. Eine nähere Betrachtung dieser Interaktionen gibt nicht nur wertvolle Einblicke in die Zusammenhänge zwischen inflammatorischen Prozessen, Apoptose und Nekroptose. Vielmehr ist ein tieferes Verständnis an dieser Stelle auch essentiell, um Krankheiten zu begreifen und Therapieansätze zu entwickeln.

1.1 TNFRSF-Rezeptoren und TNFSF-Liganden

1.1.1 TNFRSF-Rezeptoren

Beim Menschen sind 29 Mitglieder der TNFRSF bekannt. Es handelt sich hierbei um Typ I-Transmembran-Proteine, deren N-terminale extrazelluläre Domäne aus ein bis sechs CRDs (*cysteine-rich domain*) mit je 40 Aminosäuren (AS) aufgebaut ist (1-5). CRDs sind wichtig für eine Ligand-Rezeptor-Interaktion, da diese an die THD (TNF *homology domain*) von Liganden binden (2, 6-8). Neben CRDs weisen TNFRSF-Mitglieder eine PLAD (*preligand assembly domain*) auf, welche für Rezeptorzusammenlagerung vs. Ligandenbindung notwendig ist (9-10). Eine

Einleitung

Ausnahme bilden Typ III-Transmembranproteine, z.B. BCMA (*B-cell maturation antigen*), da diese keine Signalpeptidsequenz besitzen. Eine weitere Ausnahme ist DcR1 (*decoy-receptor 1* / TRAILR3 (TRAIL- (TNF-related apoptosis inducing ligand) receptor 3), weil dieser am C-terminalen Ende durch einen Glykolipidanker mit der Membran verbunden ist.

Die Rezeptoren der TNFRSF können in drei Gruppen unterteilt werden:

1) Todesrezeptoren: Dazu zählen u.a. TRAILR1, TRAILR2, DR3 (*death receptor 3*), TNFR1 (TNF Rezeptor 1) und CD95 (*cluster of differentiation 95*) (11-12). Diese besitzen die namensgebende sogenannte Todesdomäne (DD = *death domain*). Diese DD besteht aus einer konservierten Protein-Protein-Interaktionsdomäne (3, 8-9, 13-14) mit einer Länge von 70 - 80 AS (15-17). Am zytoplasmatischen Ende des Moleküls ist die Todesdomäne zu finden (1). Durch Aktivierung der Todesrezeptoren werden DD-tragende Adaptorproteine wie z.B. FADD (*Fas (first apoptosis signal) - associated death domain*) oder TRADD (*TNFR associated death domain*) vom Rezeptor rekrutiert (14, 16, 18-19).

2) Decoy-Rezeptoren: Beispiele sind u.a. OPG (Osteoprogenin) und TRAILR3, welche lösliche und membrangebundene Rezeptoren sind, die durch das Fehlen der zytoplasmatischen Domäne die Funktion haben Liganden zu binden, sodass diese nicht mehr an andere Rezeptoren binden können und diese somit keine Signalkaskade mehr induzieren können (6, 9-10, 12, 14).

3) TRAF-interagierende TNF-Rezeptoren: Sie bilden die größte Gruppe an TNFRSF-Rezeptoren. Diese können mithilfe mehrerer kurzer Motive (4 - 6 AS) in ihrer zytoplasmatischen Domäne mit Mitgliedern der TRAF (*TNFR associated factor*)-Adapterprotein-Familie interagieren und eine Signalkaskade auslösen (14, 20).

1.1.2 TNFSF-Liganden

Mit Ausnahme von 2 der 19 Liganden der TNF-Superfamilie (TNFSF) (Ausnahmen: LT- α (*Lymphotoxin alpha*) und TL1A (TNF-like ligand 1A / VEGI (*Vascular endothelial growth inhibitor*)) sind es Typ II-Transmembran-Proteine, welche aus N-terminalen intrazellulären Domänen, einer Transmembrandomäne und einer C-terminalen extrazellulären Domäne aufgebaut sind (1-2, 5). Die hoch konservierte extrazelluläre

Einleitung

THD (150 AS) sorgt für die Trimerisierung von Liganden und vermittelt die Bindung an die TNFRSF-Rezeptoren (2, 21). Zwischen THD und Transmembrandomäne befindet sich eine *stalk* Region, welche durch Proteasen gespalten werden kann und dadurch den Liganden erlaubt von einer membranständigen in eine lösliche Form überzugehen (1-2, 14, 22). Liganden lassen sich anhand ihres Bindungs- und Aktivierungsverhalten kategorisieren. Des Weiteren wird zwischen löslichen und membranständigen Liganden unterschieden:

1) Beide TNFSF-Liganden-Formen (membranständig und löslich) können an den Rezeptor binden und ihn aktivieren (z.B. TNF α (*tumor necrosis factor alpha*) - TNFR1, BAFF (*B cell activating factor*) - BAFFR (BAFF receptor) und RANKL (*receptor activator of NF κ B ligand*) - RANK) (13, 23).

2) Der membranständige Ligand bindet und aktiviert, die lösliche Form bindet den Rezeptor, kann aber nicht oder nur schwach die Signalkaskade auslösen (z.B. humaner TNF α - TNFR2, humaner CD95L (CD95 ligand) - CD95, APRIL (*A proliferation-inducing ligand*) - TACI (*Transmembrane activator and CAML (Calcium modulating ligand) interactor*), OX40L (*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4 ligand*) - OX40 und humanes TRAIL - TRAILR2) (23).

3) Nur die membranständige Variante kann den Rezeptor binden und aktivieren, während der lösliche Ligand nicht an den Rezeptor binden kann (z.B. muriner CD95L) (13, 23).

1.2 Aktivierung und Signaltransduktion von TNFR1 und TRAILR1/2

Die Todesrezeptoren TNFR1 und TRAILR1/2 vermitteln nicht ausschließlich Zelltodsignale, sondern können auch Signalwege induzieren, die verantwortlich für Inflammation, Migration oder Proliferation sind (24). Die Induktion unterschiedlicher Signalwege hängt von der Anzahl der gebundenen Liganden ab sowie von der Anzahl trimerisierter bzw. multimerisierter Rezeptoren. Zudem ist die Signaltransduktion abhängig von der Anwesenheit und der Anzahl verfügbarer Adapterproteine. Ebenso spielen weitere Faktoren wie Modifikationen verschiedener Adapterproteine eine wichtige Rolle, z.B. Ubiquitylierung von RIPK1 (*receptor*

Einleitung

interacting protein kinase), denn K48- verknüpftes Ubiquitin markiert RIPK1 für einen proteasomalen Abbau, während K63-verknüpftes Ubiquitin zur Stabilisierung von RIPK1 beiträgt (25-27).

1.2.1 Aktivierung und Signaltransduktion von TNFR1

Üblicherweise sorgt eine Aktivierung des TNFR1 nicht für eine zytotoxische Wirkung, sondern induziert direkt proinflammatorische Signale wie z.B. durch Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges, indem der membranassoziierte sogenannte Komplex I gebildet wird. Doch kann auch durch Stimulation des TNFR1 Apoptose durch den zytosolischen Komplex IIa oder Nekroptose durch das Nekrosom mittels Komplex IIb induziert werden (Abb.1.2.1). Die TNF-induzierte Signaltransduktion in Richtung Nekroptose wird durch eine Vielzahl an Blockaden verhindert, z.B. durch An- oder Abwesenheit von RIPK3 oder der posttranslationalen Modifikation (Ubiquitinylierung und Phosphorylierung von RIPK1 und Caspase-8 abhängiger Spaltung von RIPK1 und RIPK3) (28-30).

Die Bindung des Liganden TNF α an seinen Rezeptor TNFR1 führt zur Bildung des membranassoziierten Protein Komplexes I, bestehend aus TRADD, RIPK1, und E3-Ubiquitin-Ligasen TRAF2, cIAP1 (*cellular inhibitor of apoptosis protein*), cIAP2 und LUBAC (*linear ubiquitin chain assembly complex*) (29). Der LUBAC-Komplex selbst setzt sich aus HOIL-1L (*haem-oxidized IRP2 (iron-responsive element-binding proteins 2) ubiquitin ligase-1*), HOIP (*HOIL-1-interacting protein*) und SHARPIN (*SHANK (SH3 (SRC (cellular sarcoma) homology 3 domain) and multiple ankyrin repeat domains protein 1) –associated RH domain interacting protein*) zusammen. TRADD und RIPK1 interagieren mittels ihrer Todesdomäne direkt mit dem Rezeptor (14, 19, 31-32). Im Anschluss rekrutieren TRADD und RIPK1 TRAF2, cIAP1/2 und LUBAC (18-19, 31, 33). cIAP1 und 2 sind E3 Ligasen, welche die K63, K48 und K11 Ubiquitinylierung von sich selbst und RIPK1 im Komplex I vermitteln (31, 34-36). Die Ubiquitinylierung von RIPK1 sorgt für eine Rekrutierung von NEMO (NF κ B *essential modifier*) und TAK1 (TGF β (*transforming growth factor- β*)- *activated kinase 1*), welche kritische Mediatoren für eine TNF-aktivierte NF κ B-Signaltransduktion sind, wodurch eine Caspase-8 (*cysteinyll aspartat specific proteinase*) Aktivierung unterbunden wird und so das Zellüberleben gesichert wird (29, 37-38). Im Gegensatz

Einleitung

dazu sensitiviert eine Blockade der Ubiquitylierung von RIPK1 durch z.B. BV-6 (*SMAC mimetics (second mitochondria-derived activator of caspases)*), welches die Aktivierung von Caspasen durch die Freilassung dieser Proteine von der inhibierenden Interaktion mit cIAP1/2 ermöglicht und so die TNF-vermittelte Nekroptose induziert (29, 39-42). Komplex I steuert die Signalkaskade u.a. in Richtung des klassischen NF κ B-Signalweges und verhindert den Zelltod (Abb. 1.2.1). Nach Internalisierung und Destabilisation des Komplex I kommt es zur Bildung des zytosolischen Komplexes IIa. Aufgebaut ist dieser aus TRADD, FADD und Caspase-8 (casp-8), was unabhängig von RIPK1 zur Apoptose-Induktion führen kann, indem Procaspase-8 aktiviert wird (28, 43-45). Erfolgt eine TNF α -Bindung an den TNFR1 in Zellen, die mit IAP Inhibitoren (*Smac mimetics*) behandelt wurden oder in denen die IAPs, TAK1 oder NEMO depletiert wurden, kommt es zur Entstehung des zytosolischen Komplex IIb, welcher aus RIPK1, RIPK3, FLIP_L (FLIP (FLICE (FADD-like IL (Interleukin) -1 β -converting enzyme) – like inhibitory protein) long), FADD und Caspase-8 zusammengesetzt ist (28, 41, 46). Normalerweise wird die RIPK1-aktivitätsabhängige Apoptose eingeleitet, doch, wenn ausreichend RIPK3 und MLKL (*mixed lineage kinase domain-like protein*) im Zytoplasma vorliegen und die Caspase-8 Aktivität verringert oder geblockt ist (z.b. durch den Caspase-Inhibitor ZVAD (N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-ke-ton) - fmk), kann sich der Komplex IIb zum Nekrosom entwickeln und so Nekroptose einleiten (47) (Abb. 1.2.1). Durch Necrostatin-1 (nec-1), ein allosterischer Inhibitor der DD-Rezeptor-assoziierten Adapterkinase von RIPK1, kommt es zur Stabilisierung von Komplex IIa und leitet schließlich die Apoptose ein (30, 48).

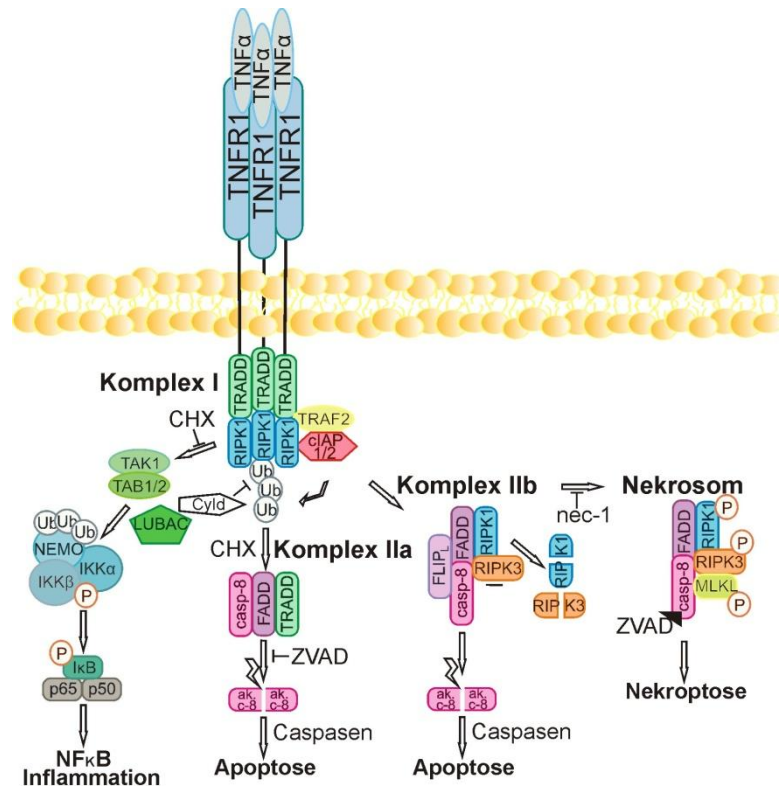


Abbildung 1.2.1 TNFR1 Komplexbildung und anschließende Aktivierung vom NFκB Signalweg, Apoptose und Nekroptose

Aktivierung des TNFR1 durch seinen Liganden TNFα und anschließende Komplexbildung, was zur Aktivierung von inflammatorischen, apoptotischen und nekroptischen Signalkaskaden führen kann. Darstellung der einzelnen Proteine und deren Wirkung. Komplex I mündet in NFκB Inflammation, Bildung von Komplex IIa in Apoptose, Komplex IIb entweder in Apoptose oder über Zwischenstufe des Nekrosom in Nekroptose.

P = Phosphorylierung, Ub = Ubiquitynylierung (adaptiert von (31))

1.2.2 Aktivierung und Signaltransduktion von TRAILR1/2

Im Gegensatz zur Stimulierung von TNFR1 erfolgt nach Aktivierung von TRAILR1 (auch bekannt als DR4) oder TRAILR2 (auch DR5 oder KILLER genannt) (49-51) die Zusammenlagerung des Adapterproteins FADD sowie Caspase-8 und FLIP_L zum sogenannten DISC (*death-inducing signalling complex*) (12, 31, 52-53) direkt am Rezeptor an der Plasmamembran. Dies löst im Folgenden Apoptose durch die aktive Caspase-8 oder Nekroptose bei blockierter Caspase-8 aus. Caspase-8 schützt vor RIPK3-abhängiger Nekroptose ohne zwangsläufig Apoptose zu induzieren, indem Caspase-8 in einem proteolytisch aktiven Komplex mit FLIP_L zusammenwirkt (53-55). In der Anwesenheit von IAP Antagonisten kommt es zur Rekrutierung von RIPK1, wodurch ein ähnlicher Komplex wie Komplex I bei TNFR1-Stimulation entsteht.

Einleitung

Dieser RIPK1-Komplex führt entweder zur Bildung des zytosolischen Ripoptosoms, welches Caspase-8 vermittelte Apoptose induziert, oder bei blockierter Caspase-8 Aktivität zur RIPK1-abhängigen Nekroptose (Abb.1.2.2). RIPK1 und RIPK3 bilden das Nekrosom, dabei kann Caspase-8 wiederum die beiden spalten und somit Nekroptose unterdrücken (39, 53, 56-57). So ist zu vermuten, dass es einen *Crosstalk* zwischen DISC und Nekrosom geben kann (28, 58-64).

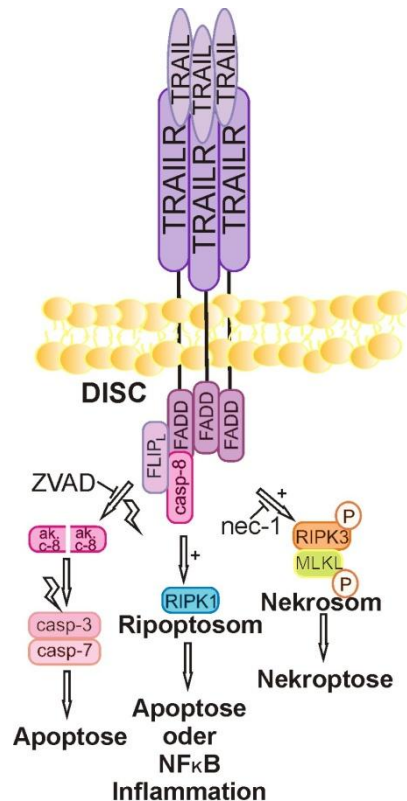


Abbildung 1.2.2 TRAILR1/2 DISC-induzierter NFκB Signalweg, Apoptose und Nekroptose

Durch die Ligand (TRAIL) - Rezeptor (TRAILR) - Bindung wird der DISC, bestehend aus FLIP_L, FADD und Caspase-8 (casp-8), entweder bei Aktivierung von casp-8 Apoptose induziert, oder bei Abwesenheit oder Inaktivierung von casp-8 mit Hilfe von RIPK3 und MLKL Nekroptose aktiviert. Auch ist es möglich, dass durch Anwesenheit von RIPK1 sich ein Ripoptosom zusammenlagern kann und dies als Folge zur Apoptose, Inflammation oder Nekroptose führt. P = Phosphorylierung, Ub = Ubiquitinylierung (adaptiert von (31))

1.3 Signalwege

1.3.1 NFκB-Signalwege

Im NFκB-System existieren zwei verschiedene Signalwege, der klassische und der alternative NFκB-Signalweg. Grundlegende Voraussetzung für die beiden Signalwege ist die Ligand-spezifische Aktivierung eines Rezeptors der TNF-Superfamilie, wodurch eine Signaltransduktion in Gang gesetzt wird, bis schließlich eine Genexpression beeinflusst wird.

Ein Ligand, z.B. TNFα, bindet spezifisch an seinen Rezeptor TNFR1, wodurch es zur Trimerisierung der Rezeptormoleküle und damit zur Rekrutierung von Adapterproteinen an die intrazelluläre Todesdomäne des Rezeptors kommt, sodass die Signalkaskade des klassischen NFκB-Signalweges in Gang gesetzt wird. Verschiedene Adapterproteine wie TRADD, FADD und RIPK1 sind am *Downstream-Signaling* beteiligt. TRAF2 und cIAP1/2 können dann im Zusammenspiel mit RIPK1 TAB1/2 (*TAK1-binding protein*) und TAK1 aktivieren (11, 65-66). Infolgedessen wird der IKK-Komplex (*inhibitor of NFκB kinase*), bestehend aus NEMO, IKKα und IKKβ, rekrutiert und schließlich aktiviert, indem u.a. IKKβ phosphoryliert wird (66-69). Der aktive IKK-Komplex phosphoryliert das IκBα (*inhibitor of NFκB alpha*)-Protein (65, 70-75), woraufhin dieses ubiquitinyliert proteasomal degradiert wird, (8, 70-71, 76-79), was zur Freisetzung von IκB-gebundenen NFκB-TFs führt (80). NFκB-TF, wie z.B. p65 oder p50 (11, 68, 70, 77, 81-83), kann nun in den Nukleus translozieren, spezifisch an die DNA (*desoxyribonucleic acid*) von NFκB regulierenden Zielgenen binden und so deren Transkription beeinflussen (72-73, 76-77, 84-85) (Abb.1.3.1).

Bei Aktivierung des alternativen NFκB-Signalweges bindet ein Ligand - z.B. TWEAK (*TNF-like weak inducer of apoptosis*) an seinen Rezeptor Fn14 (FGF1/2 (*fibroblast growth factor1/2*) *inducible*) und sorgt so für dessen Trimerisierung, wodurch TRAF2, cIAP1 und cIAP2 rekrutiert werden (71, 83, 86-88). Zeitgleich kommt es zu einer reduzierten Degradation von NIK (NFκB *inducing kinase*), sodass dies akkumulieren kann. Dies führt zur Prozessierung von p100 zum aktiven p52 Molekül, welches gemeinsam mit RelB (*v-rel avianreticuloendotheliosis viral oncogene homology B*) zur Genexpression in den Zellkern wandert (13, 21, 32, 68, 72, 76-78, 83, 85, 89-90) (Abb. 1.3.1).

Einleitung

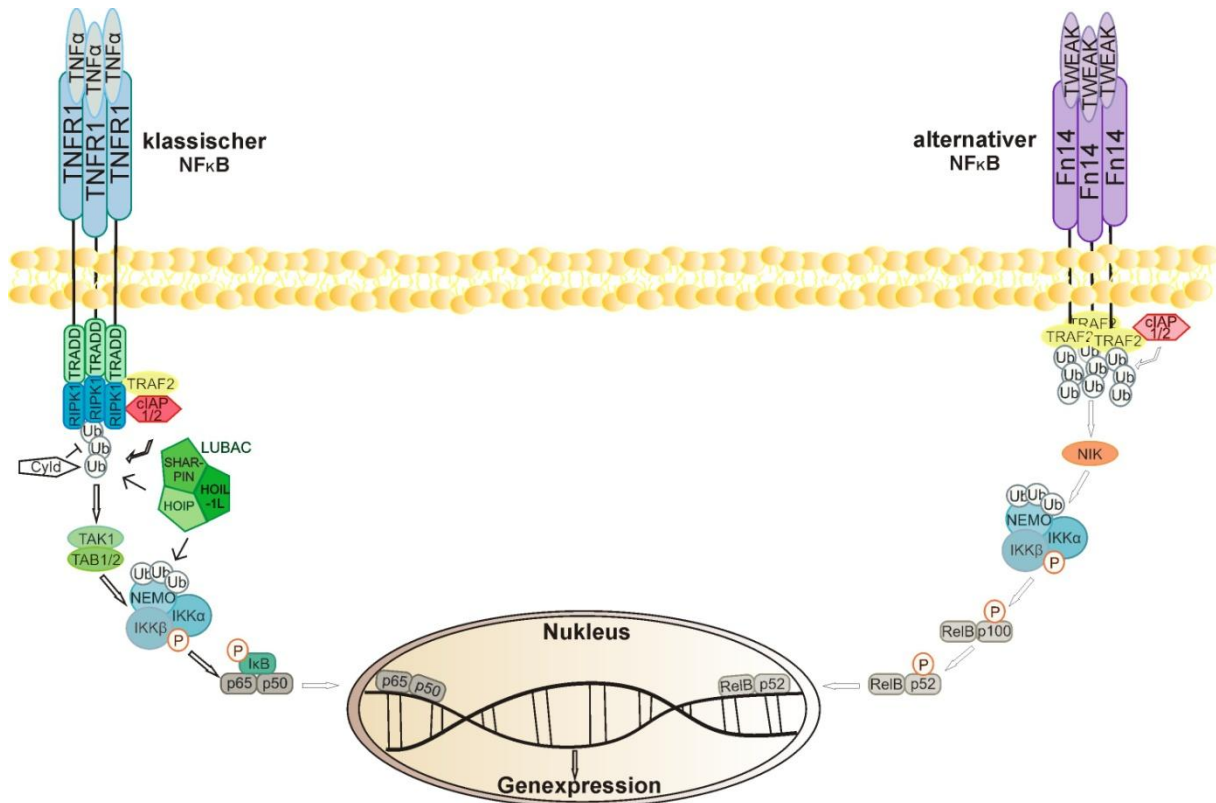


Abbildung 1.3.1 Klassischer vs. alternativer NFκB-Signalweg

Links ist die Signalkaskade des klassischen NFκB-Signalwegs anhand des Beispiels vom TNFR1 zu erkennen. Nachdem der TNFα Ligand an den TNFR1 gebunden hat, werden die Adapterproteine TRADD und RIPK1 via Protein-Protein-Interaktion an den TNFR1 rekrutiert. Auch TRAF2, cIAP1/2 und der LUBAC wirken bei der Interaktion mit. Durch die Ubiquitynylierung von RIPK1 und die Anwesenheit von TRAF2 und cIAP1/2 werden TAK1 und TAB1/2 aktiviert. Daraufhin wird der IKK-Komplex rekrutiert. Durch die Aktivierung von IKK kann IκB phosphoryliert werden und so das Signal weiterleiten. Nach der Degradation von IκBα translokieren p65 und p50 in den Nukleus und beeinflussen die Genexpression. Rechts ist der alternative NFκB-Signalweg anhand des Beispiels durch die Bindung von TWEAK an Fn14 dargestellt. Indem TRAF2 mit dem Rezeptor interagiert, sorgt cIAP1/2 für die Ubiquitynylierung von TRAF2 und damit für die Rekrutierung von NIK. NIK führt zur Phosphorylierung und Aktivierung vom IKK-Komplex, wodurch p100 phosphoryliert wird. Die Prozessierung von p100 führt zum aktiven p52, welches in den Zellkern wandern kann.

P = Phosphorylierung, Ub = Ubiquitynylierung (adaptiert von (91))

1.3.2 Apoptose

Der programmierte Zelltod ist während der Entwicklung eines Organismus ein Mechanismus für das Beseitigen von überflüssigen Zellen, Gewebe und Organen (29). Der programmierte Zelltod wird auch Apoptose genannt und ist unabdingbar für die korrekt ablaufende Entwicklung und Funktion des Immunsystems. So steuert die Apoptose z.B. die Beendigung von Immunantworten indem Antikörper-produzierende B-Zellen oder aktivierte T-Zellen, die nicht länger benötigt werden, beseitigt werden. Die Apoptose sorgt nicht nur für den Abbau der eigenen zellulären DNA, sondern auch für die Zerstörung viraler Fremd-DNA, sodass benachbarte Zellen nicht infiziert werden können. Die Apoptose eignet sich besser zur Zerstörung infizierter Zellen als die Nekrose, da bei der Nekrose noch inaktive Pathogene entweder aus den toten Zellen freigesetzt werden und daher weiter gesunde Zellen befallen können oder aber von Makrophagen aufgenommen werden und in diesen als Parasiten überdauern können (92).

Wird das Apoptose-Programm aktiviert und eine Zelle zum Sterben determiniert, kommt es während des Apoptose-Prozesses u.a. zur Zellschrumpfung, Abbau und Fragmentierung der chromosomalen Kern-DNA, Degeneration und Kondensation des Chromatins und des Zellkerns sowie zur Phagozytose der Zellreste, Blasenbildung der Plasmamembran, Veränderungen der Zusammensetzung der Membranlipide, Abstoßung von sogenannten *apoptotic bodies*, etc. (16, 28, 93-95), wodurch sich die Zelle selbst von innen heraus abbaut und die zerstörten und zerkleinerten Zellreste durch membrangebundene Vesikel abgestoßen werden, die wiederum phagozytiert werden (Abb.1.3.3). Der Vorteil dieses Prozesses ist, dass wenige bis keine sogenannten DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) freigesetzt werden, die wiederum umliegende Zellen zum Zelltod anregen könnten oder zur Produktion entzündlicher Cytokine und Chemokine führen könnten.

Die Apoptose ist ein regulierter Vorgang, der durch spezifische extrazelluläre Signale, z.B. der Aktivierung von Todesrezeptoren der TNFRSF ausgelöst wird, oder auch durch das Ausbleiben von Signalen, die für das Überleben einer Zelle erforderlich sind oder aber auch durch zellintrinsische Faktoren induziert werden kann. Die Todesrezeptor-induzierte Apoptose kann dabei durch die Unterdrückung einer Proteinsynthese oder einer NFκB Transkriptions-Antwort verstärkt werden (63, 96).

Einleitung

Die Apoptose kann durch zwei verschiedene Signalwege induziert werden. Dabei wird zwischen intrinsischer und extrinsischer Apoptose unterschieden. Beiden Signalwegen gemeinsam ist die Aktivierung spezieller asparaginsäurespezifischer Cysteinproteasen oder Caspasen, die als inaktive Procaspasen synthetisiert werden und durch Proteinspaltung und / oder Oligomerisierung aktiviert werden. Bei der Proteinspaltung wird die inhibitorische Prodomäne freigesetzt. Die Caspasen können aufgrund ihrer Struktur und Funktion in zwei Gruppen unterteilt werden, die Initiatorcaspasen (z.B. Caspase-8 und -9), welche bereits durch Oligomerisierung aktiviert werden und den Apoptoseprozess starten, und Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3, -6 und -7), die durch Initiatorcaspasen prozessiert und aktiviert werden (16, 28, 97-98) und so eine Reihe von Proteinen spalten, die den Tod und Abbau der Zelle realisieren (Abb. 1.3.3). So werden Zellkernproteine wie Lamin B, die für die strukturelle Integrität des Zellkerns verantwortlich sind, gespalten, und es werden Endonucleasen aktiviert, die die chromosomale DNA fragmentieren (92). Auch werden Bestandteile des Golgi-Apparates proteolysiert (99) und z.B. durch Caspase-3 PARP (*poly (ADP (Adenosin- diphosphat) -ribose) polymerase*) gespalten (100).

Der extrinsische Apoptoseweg wird von membranständigen Todesrezeptoren nach Ligandenbindung aktiviert, z.B. der TNFR1 nach Bindung von TNF α oder nach TRAIL an TRAILR 1/2 - Bindung. Die Ligandenbindung führt zur Oligomerisierung der Todesrezeptoren und anschließender Rekrutierung von Adapterproteinen (z.B. FADD) über die DD an das Rezeptortrimer, wodurch anschließend Procaspasen (z.B. Procaspase-8) spezifisch mittels der Todeseffektordomäne (DED (death effector domain)) rekrutiert werden können. Die Dimerisierung von Caspase-8 ist durch die Nähe mit dem Adapterprotein FADD induzierbar, was zur Caspase-8 Aktivierung führt und die nachfolgende Eigenspaltung von Caspase-8 fördert, wodurch das bereits aktive Dimer weiter stabilisiert wird (29, 101-102). Die wechselseitige Prozessierung der Procaspasen führt zu einer Konformationsänderung und somit zur Bildung eines heterotetrameren Komplexes, der sich aus den zwei Untereinheiten p10 mit p43 / p41 bzw. durch weitere Prozessierung aus p10 und p18 zusammensetzt (103). Nach der Selbstaktivierung wird die Caspase-8 aus dem Rezeptorkomplex freigesetzt und kann die nachgeschalteten Effektorcaspasen aktivieren (Abb. 1.3.2) (92).

Einleitung

Zellen, die durch Todesrezeptor-vermittelte Apoptose sterben, lassen sich in zwei Typen unterteilen. Typ I Zellen sterben durch die Induktion der extrinsischen Apoptose. Typ II Zellen können nicht nur durch die Aktivierung des extrinsischen Weges sterben, sondern es findet ein *crosstalk* mit dem intrinsischen Weg statt, dabei wird Bid (BH3 (Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) homology domain 3) interacting-domain death agonist) durch die aktive Caspase-8 rekrutiert und gespalten, was im weiteren Verlauf zur Freilassung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium führt (16, 24, 104).

Die intrinsische Apoptose, auch mitochondrialer Weg, wird induziert, wenn die Zelle unter Stress steht, z.B. bei Nährstoffmangel, Mangel an Wachstumsfaktoren oder indem auf schädliche Reize wie die Bestrahlung mit UV (Ultraviolett)-Licht oder Chemotherapeutika reagiert wird. Entscheidend für die Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges ist die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien.

Nicht nur durch äußere Reize kann die intrinsische Apoptose aktiviert werden, denn bei Typ II Zellen wird nach Todesrezeptor-Aktivierung durch die aktive Caspase-8 Bid rekrutiert und gespalten, dies wird zu tBid (*truncated* p15 BID) gespalten und aktiviert das auf der mitochondrialen Oberfläche sitzende Bak (Bcl-2 homologous antagonist / killer), was wiederum mit Bax (Bcl-2 like protein 4) Oligomere bildet und so Poren in der Mitochondrienmembran verursacht. Diese Poren haben zur Folge, dass nun Cytochrom c frei zwischen Mitochondrium und Zytoplasma wandern kann. Befindet sich dieses im Zytoplasma, bindet Apaf-1 (*apoptosis-protease-activating factor 1*) daran und regt dessen Polymerisierung an. Demzufolge wird Procaspase-9 mobilisiert, was durch Autolyse aktiviert und in die Zelle freigesetzt wird, sodass wiederum die Effektorcaspasen-3 und -7 angeregt werden (Abb. 1.3.2) (24, 93, 104-105).

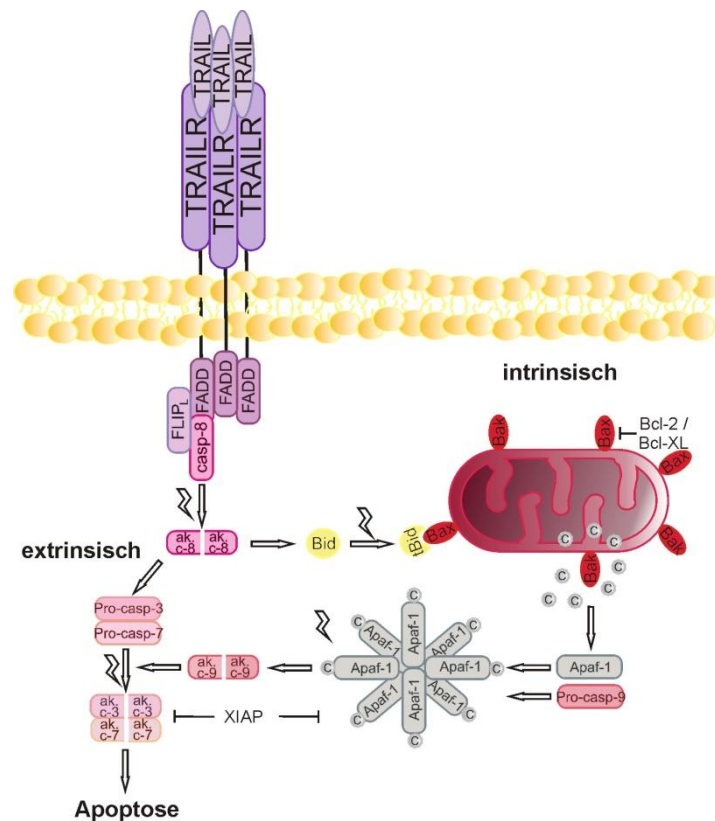


Abbildung 1.3.2 Extrinsische vs. intrinsische Apoptose

Nach Aktivierung des Rezeptors kann u.a. die Apoptose induziert werden. Dabei wird zwischen der extrinsischen und der intrinsischen Apoptose unterschieden. Bei der extrinsischen (links) wird intrazellulär an den Rezeptor FADD, FLIP_L und Pro-Caspase-8 rekrutiert. Im Verlauf kommt es zur Aktivierung der Caspase-8. Diese sorgt für die Anlagerung und Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7, wodurch im Weiteren die Apoptose induziert wird. Bei dem intrinsischen Weg (rechts) wird Bid rekrutiert und gespalten, wodurch tBid zum Mitochondrium wandert, um spezifisch an die Proteine Bak und Bax an der Oberfläche des Mitochondriums zu binden. Dadurch kann ein Austausch von Cytochrom c vom Mitochondrium mit dem Zytoplasma stattfinden. Bcl-2 kann die Freilassung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium unterbinden und so eine intrinsische Apoptose-Induktion blockieren. Geschieht dies nicht, sorgt das ausgeschüttete Cytochrom c für die Rekrutierung von Apaf-1, was wiederum mit dem Cytochrom c zusammen das Apoptosom bildet und Caspase-9 rekrutiert und aktiviert. Die aktive Caspase-9 kann nun ebenfalls wie die Caspase-8 die Effektorcaspasen-3 und -7 aktivieren und Apoptose induzieren. Dieser Vorgang kann aber durch XIAP unterdrückt werden (adaptiert von (106)).

1.3.3 Nekroptose

Die Nekroptose ist eine Form der Nekrose und wird u.a. als Zell-programmierte Nekrose oder als Caspase-unabhängiger Zelltod bezeichnet.

Nekroptose kann aktiviert werden, wenn die Caspase-Aktivierung nicht wie gewohnt ablaufen kann oder blockiert ist, z.B. durch virale Infektionen oder durch onkogenetische Mutationen, wodurch dann die Nekroptose als „Helfer in der Not“ oder als Back-up System einspringt (63, 107). Durch die Aktivierung der Nekroptose stirbt die Zelle, indem sie und ihre Organellen anschwellen, die Zelle sich abrundet, gefolgt von ansteigendem Zytoplasmavolumen, durch einströmendes Wasser durch defekte Poren und Kanäle, lysosomaler Membranpermeabilität, zellulärem Verfall, Zerfall der Plasmamembran, Ansteigen des Zellvolumens, mitochondrialer Dysfunktion, geringer Chromatinkondensation und der Freisetzung von zytoplasmatischem Material und ROS (*reactive oxygen species*) (Abb.1.3.3) (28, 47, 63, 93, 108-110). Im Gegensatz zur Apoptose setzt die Nekroptose eine Vielzahl an DAMPs frei und triggert so die Chemokin- und Cytokin-Freisetzung von der zerfallenen Zelle aber auch durch Nachbarzellen (28, 111). Bei Fehlfunktionen kann Nekroptose u.a. zu myokardinaler und zerebrovaskulärer Abstoßung sowie zu Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson führen (93, 112).

RIPK3 als ein essentieller Regulator von TNF-induzierter Nekroptose war eine entscheidende Entdeckung (28, 108, 113-114), doch ist die RIPK1 Aktivierung für die Nekroptose unabdingbar, da dies zur Rekrutierung von RIPK3 führt, was ein wichtiger *downstream mediator* der Nekroptose ist. Dabei ist nicht nur RIPK1 erforderlich, genauso wichtig ist die Inaktivität von Caspase-8 (57). Daneben wird die Aktivierung der Nekroptose durch verschiedene Formen der Ubiquitinylierung, wie K63 (Lysin), lineare und K48 sowie der Phosphorylierung von RIPK1, RIPK3 und MLKL gesteuert (29). RIPK1 interagiert mit RIPK3 durch das RHIM (RIP *homotypic interaction motif*) Motiv und kann so ein *amyloid-like signaling complex* in nekroptotischen Zellen formen (29, 115). RHIM ist eine Domäne in RIPK1 und RIPK3, erlaubt deren Interaktion und ist wichtig für die Nekroptose-Induktion (28, 30, 38, 108, 115-117). Zudem sorgt die RHIM-abhängige Oligomerisation und intramolekulare Autophosphorylierung von RIPK3 für die Rekrutierung und Phosphorylierung von MLKL (28, 47, 108, 118-120), was zu

Einleitung

Konformationsänderungen in deren Pseudokinase-Domäne führt und somit die *4-helical bundle domain* freisetzt (28, 121). Das aktive MLKL kann nun als Exekutormechanismus Ca^{2+} (Kalzium-) oder Na^+ (Natrium-) Ionenkanäle in der Plasmamembran (28-30, 122-124) und einen direkten Poren-Formungs-Komplex rekrutieren und so die Nekroptose ausführen (28-29, 124-126).

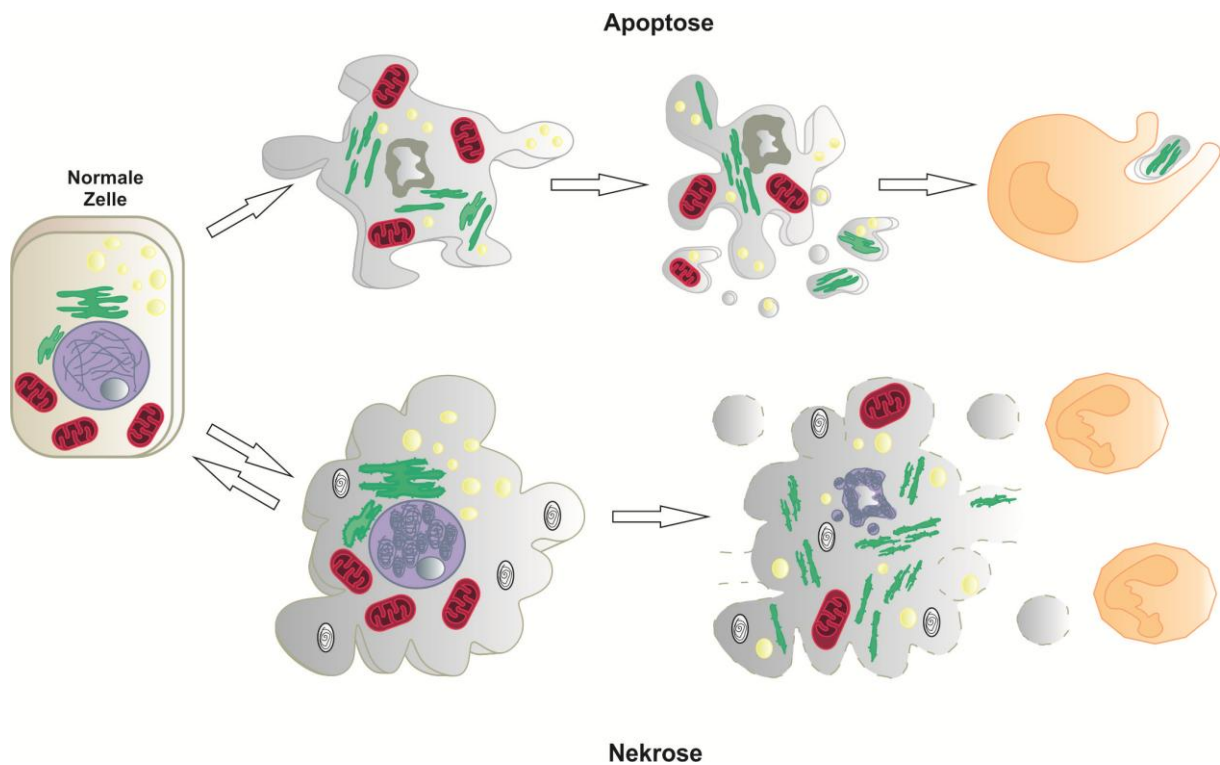


Abbildung 1.3.3 Zellulärer Verfall durch Apoptose vs. Nekrose

Der obere Teil der Abbildung stellt den Verlauf des Absterbens einer gesunden Zelle durch Apoptose dar. In der ersten Phase kondensiert das Chromatin. Es bilden sich Membranblasen. Im nächsten Schritt folgen die zelluläre Fragmentierung und die Entstehung von *apoptotic bodies*. Schließlich werden die apoptotische Zelle und deren Fragmente durch eine Phagozyte aufgenommen und abgebaut. Bei der Einleitung der Nekrose (unten) schwellen die Zelle sowie deren Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum an und es bilden sich Membranblasen und Myelin aus. Dieser Prozess der Zelle ist noch reversibel, doch schreitet dies fort, kommt es zum Zerplatzen der Zellmembran, Organellen und Nukleus (adaptiert von (127)).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Fragestellung meiner Arbeit war, ob die bekannten Funktionen der Adapterproteine FADD, TRADD und RIPK1 nach der Aktivierung des Rezeptors TNFR1 oder TRAILR1/2 mit den Signalkaskaden (Apoptose, Nekroptose und NFκB) einhergehen oder ob es neue, bis jetzt unbekannte Verknüpfungen und Zusammenhänge zwischen diesen Adapterproteinen gibt, welche neues Licht auf die Aktivierung der Signalkaskaden von Apoptose, Nekroptose und den klassischen NFκB-Weg werfen. Dafür wurden HeLa-RIPK3 Zellen (HeLa Zellen welche durch das Einbringen von RIPK3 Nekroptose fähig sind), welche mittels des CRISPR Cas9 Systems die Adaptermoleküle FADD, TRADD und RIPK1 einzeln oder in Kombination ausgeknockt wurden, verwendet. Systematisch wurde unter der Zuhilfenahme von CHX (Translationsinhibitor), ZVAD (Caspase-Inhibitor), Necrostatin-1 (RIPK1-Inhibitor) und TWEAK-Flag die Apoptose- und Nekroptose-Induktion sowie die Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen (z.B. NFκB-Signalwege) mittels der Aktivierung des TNFR1 durch TNFα-Stimulation und der TRAILR1/2 durch TRAIL-Stimulation bei einzelnen HeLa-RIPK3-*Knockout* Zelllinien getestet.

2. Material

2.1. Zellen

In dieser Arbeit verwendete eukaryontische, humane Zervixkarzinom-Zelllinien HeLa und die HeLa-RIPK3 Zellen sind ein Geschenk der Arbeitsgruppe von Martin Leverkus (Universitätsklinikum Aachen) (128). Die stabilen HeLa-RIPK3 Transfektanten wurden mittels CRISPR. Cas9 System von der Arbeitskollegin Daniela Siegmund hergestellt.

Tabelle 2.1 HeLa-RIPK3 Varianten

HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle)

HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO})

HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO})

HeLa-RIPK3-RIPK1_{KO} (RIPK1_{KO})

HeLa-RIPK3-casp-8_{KO} (casp-8_{KO})

HeLa-RIPK3-TRADD/RIPK1_{DKO} (TRADD/RIPK1_{DKO})

HeLa-RIPK3-FADD/RIPK1_{DKO} (FADD/RIPK1_{DKO})

HeLa-RIPK3-FADD/TRADD_{DKO} (FADD/TRADD_{DKO})

2.2. Western Blot Antikörper

Tabelle 2.2.1 Primär Antikörper

Antikörper	Größe (kDa)	Klonalität	Konzentration	Hersteller
α-β-Actin	42	Maus Monoklonal	2 mg/ml 1:6000	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
α-Caspase-3	35, 19, 17	Hase Monoklonal	1 mg/ml 1:1000	Cell Signaling (human specific #8G10), Cambridge, Großbritannien
α-Caspase-8	53, 44, 42, 18	Ziege Polyklonal	0,2 mg/ml 1:500	Santa Cruz (E-20): sc- 6133, Dallas, USA
α-Caspase-8	53, 44, 42, 18	Maus Monoklonal	1 mg/ml 1:1000	Enzo Life science (5F7), Lörrach
α-Caspase-9	47, 37, 35	Hase Monoklonal	1 mg/ml 1:1000	Cell Signaling (human specific #950S), Cambridge, Großbritannien
α-CYLD	108, 24	Hase Monoklonal	1 mg/ml 1:1000	Cell Signaling (D1A10), Cambridge, Großbritannien

Material

α -FADD	28	Hase Polyklonal	1 mg/ml 1:1000	Cell Signaling (#2782), Cambridge, Großbritannien
α -I κ B α	39	Maus Monoklonal	1 mg/ml 1:1000	Cell Signaling (L35A5), Cambridge, Großbritannien
α -PARP	116, 85	Maus Monoklonal	0,25 μ g/ml 1:2000	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α -p-I κ B α	40	Hase Monoklonal	1 mg/ml 1:1000	Cell Signaling (14D4), Cambridge, Großbritannien
α -p-RIPK1	82-78	Hase Monoklonal	1 mg/ml 1:1000	Cell Signaling (D1L3S), Cambridge, Großbritannien
α -RIPK1	74	Maus Monoklonal	250 μ g/ml 1:1000	BD Biosciences (610459), Franklin Lakes, USA
α -TRADD	32	Hase Monoklonal	1 mg/ml 1:1000	Cell Signaling (#7G8), Cambridge, Großbritannien
α -Tubulin	53	Maus Monoklonal	200 μ g/ml 1:8000	Thermo Scientific (DM1A), Waltham, USA

In TBST oder PBST + 0,02 % Na-Azid

Tabelle 2.2.2 Sekundär Immunglobulin HRP-*linked* Antikörper

Antikörper	Konzentration	PBST / TBST + 2,5 % Milch	Hersteller
α -Hase	1 mg/ml – 1:3000	ja	Cell Signaling (#7074), Cambridge, Großbritannien
α -Maus	1,3 g/L – 1:10.000	nein	Dako (P0260), Glostrup, Dänemark
α -Ziege	0,5 g/L – 1:10.000	ja	Dako (P0449), Glostrup, Dänemark

2.3. Fusionsproteine

Tabelle 2.3 TNF-Fusionsproteine

FasL-Fc (5/510)

TNFwt-Flag (5/458)

TRAIL-Flag-Fc (6/378)

TWEAK-Flag (6/141)

2.4. Lösungen und Puffer

Tabelle 2.4 Angesezte Lösungen und Puffer

Assay Diluent:	1 x PBS 10 % (v / v) FCS
Blot-Puffer	25 mM Tris 193 mM Glycine 20 % Methanol
ECL-Lösung 1:	0,1 M TRIS-HCl (pH 8,6) 0,25 mg/ml Luminol
ECL-Lösung 2:	1,1 mg/ml para-Hydro-Xycoumaric-Azid DMSO
ECL-Lösung 3:	30 % H ₂ O ₂
ELISA Coating Puffer:	0,1 M Carbonat pH 9,5
Einfrierlösung für Zellen:	1:10 DMSO : FCS
Kristallviolett-Lösung.	1 % Ethanol 0,25 % Kristallviolett
Laemmli-Puffer: (4 x SDS-PAGE)	8 % (w / v) SDS 10 % β-Mercaptoethanol 40 % Glycerol 0,2 M Tris 0,04 % Bromphenolblau
10x Laufpuffer: (SDS-PAGE)	50 mM Tris 0,38 M Glycin 4 mM SDS pH 8,3
10x PBS:	20 mM Na ₂ HPO ₄ 20 mM NaH ₂ PO ₄ 0,7 % (w / v) NaCl pH 7,2
10x TBS:	20 mM Tris 8 % (w / v) NaCl pH 7,6
PBST / TBST:	1x PBS/ 1x TBS 0,05 % (v / v) Tween-20
PBST / TBST in Milch	1 x PBS / TBS 0,05 % (v / v) Tween-20 2,5 % / 5 % (w / v) Magermilch

Material

Sammelgelpuffer: (4x SDS-PAGE)	0,5 M Tris 15 mM SDS pH 6,8
Trenngelpuffer: (4x SDS-PAGE)	1,5 M Tris 15 mM SDS pH 8,8
Tox-Mix:	400 ng/ml FasL-Fc (Überstand) 400 ng/ml TRAIL-Flag-Fc (Überstand) 400 ng/ml TNFwt-Flag (Überstand) 2,5 µg/ml CHX 100 µg/ml M2 100 ng/ml TWEAK-Flag (Überstand)

2.5. Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmedien

Tabelle 2.5 Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmedien

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
ABTS	Roche, Mannheim
ABTS-Puffer	Roche, Mannheim
Acrylamid (30 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Anti-Flag M2 Affinity Gel Freezer-Safe	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Cycloheximid (CHX)	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	AppliChem, Darmstadt
Dulbecco´s PBS	PAA, Pasching, Österreich
Ethanol (EtOH)	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
Killer-TRAIL	Enzo Life science, Lörrach
Kristallviolett	Carl Roth, Karlsruhe
Luminol	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt

Material

Methanol	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
MLN4924 / Pevonedistat	Active Biochem, Hongkong, China
Natrium-dihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	AppliChem, Darmstadt
Natriumazid (Na-Azid)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Necrostatin-1	Enzo Life science, Lörrach
OptEIA IL8-ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Para-Hydro-Xycoumaric acid	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich
Prestained Protein Marker (Broad Range)	New England Biolabs, Frankfurt
RPMI 1640 Medium	PAA, Pasching, Österreich
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
TNF (human)	Geschenk von Daniela Männel
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin	PAA, Pasching, Österreich
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
zVAD-fmk	Bachem, Heidelberg

2.6. Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 2.6 Verbrauchsmaterialien und Geräte

96-Well ELISA Platten (hohe Bindung)	Greiner, Frickenhausen
Amersham Hyperfilm ECL / Röntgenfilme	GE Healthcare, Garching
CO ₂ Inkubator Heraeus Cell Safe	Heraeus, Hanau
Eismaschine	Scotsman, Mailand, Italien
Entwickler-Maschine	Agfa, Düsseldorf
Eppendorf- / Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Falcons	Greiner, Frickenhausen
Feinwaage	Sartorius Acculab Atilon, Göttingen
Gefrierschrank (-80°C)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Material

Gellaufkammern SDS-PAGE / Elektrophoresesystem	PeqLab, Erlangen
Handzähler	neoLab, Heidelberg
Heizblock	PeqLab, Erlangen
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Kühlschrank	Becko, Isenburg
Magnetrührer	neoLab, Heidelberg
Mikroskop	Axio Zeis, Jena
Nass-Blot-Kammer	Peqlab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Nitrocellulose Blotting Membran (0,2µm)	GE Healthcare, Garching
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
pH-Meter	HANNA Instruments, kehl am Rhein
Pipetten	PeqLab, Erlangen
Pipette, 8-Kanal	BRAND, Wertheim
Pipette, Dispension 8-Kanal	Eppendorf, Hamburg
Pipette, Glas	BRAND, Wertheim
Pipette, Plastik	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, Dispension	Eppendorf, Hamburg
Photometer	Anthos Labtec, Siezenheim, Österreich
Pipetus / Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenentwicklerflüssigkeit	Calbe Chemie, Clabe
Röntgenfixiererflüssigkeit	Calbe Chemie, Clabe
SDS-PAGE-Gelelektrophoresekammer	PeqLab, Erlangen
Stromquelle EPS 301	GE Healthcare, Garching
Schüttler	Hartenstein, Würzburg
Sonifizierer	Hielscher, Wanaque, USA
Sterilwerkbank Lamin Air	Heraeus, Hanau

Material

Vortexer	neolab, Heidelberg
Waage BA2100	Sartorius Acculab Atilon, Göttingen
Wäageschälchen	Hartenstein, Würzburg
Whatman Papier	Hartenstein, Würzburg
Wellplatten	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge Eppendorf 5424	Eppendorf, Hamburg

2.7. Computerprogramme

Tabelle 2.7 Computerprogramme

CorelDRAW X4

Mircosoft Office Exel 2007

GraphPad PRISM 5

Mircosoft Office Word 2007

3. Methoden

3.1. Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden unter standardisierten, sterilen Bedingungen (5 % CO₂, 37°C) in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS (hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum) in Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Ernten der adhärennten Zellen wurden diese mit Trypsin in 1 x PBS (0,025 %) für ca. 10 min behandelt, bis diese sich von der Flaschenoberfläche ablösten. Im Anschluss wurde ein Rest von 8 - 10 % der Zellmenge zur Weiterkultivierung in der Flasche gelassen. Die restlichen Zellen wurden 4 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, konnte entweder das Zellpellet in ca. 10 ml RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS und 1 % P/S (Penicillin / Streptomycin) aufgenommen werden und für weitere Versuche die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden oder das Pellet in 1 ml Einfriermedium (10 % DMSO in FCS) resuspendiert und in einem Kryoröhrchen bei -80°C zum Kryokonservieren aufbewahrt werden.

3.2. Toxizitäts-Assay

3.2.1 Zellaussaat

Die Zellen wurden zunächst über Nacht (ü.N.) bei 37°C in einer 96-Wellplatte kultiviert. Pro Well wurden 20.000 Zellen in 100 µl 10 % FCS und 1 % P/S RPMI-Medium ausgesät.

3.2.2 Stimulation

Die verschiedenen Zelllinien wurden je nach Versuchsanordnung als Triplikate entweder als Einfachstimulation oder durch eine Titration von humanem rekombinantem TNF oder Killer-TRAIL stimuliert. Dabei wurde das Medium, welches zum Kultivieren der Zellen verwendet wurde, durch 50 µl der individuellen Vorstimulation in Form von Medium, oder je nach Stimulation, Medium versetzt mit 20 µM ZVAD, 90 µM Necrostatin-1, CHX und 100 ng/ml TWEAK-Flag, ersetzt. Nach 30 min wurden auf die 50 µl Vorstimulation weitere 50 µl von entweder der Einzelkonzentration an 100 ng/ml TNF, 100 ng/ml Killer-TRAIL oder Mediumkontrolle oder eine Titrationsreihe (TNF: 100 ng/ml in 20er Schritten oder Killer-TRAIL: 100

Methoden

ng/ml in 4er Schritten) gegeben. Bei jedem Toxizitäts-Assay darf sowohl eine Mediumkontrolle, d.h. Zellen, die nur mit Medium behandelt sind und dementsprechend 100 % Überlebenswahrscheinlichkeit darstellen, als auch eine Toxizitäts-Kontrolle, bestehend aus 100 µl Tox-Mix, der als Totkontrolle dient und eine Vitalität von 0 % aufweist, nicht fehlen. Über Nacht wurden die Zellen bei 37°C inkubiert.

3.2.3 Färbung und Messung

Am Folgetag wurde der Überstand der stimulierten Zellen abgegossen und durch 70 µl Kristallviolett-Lösung ersetzt. Nach 30 minütiger Einwirkzeit wurde die Kristallviolett-Lösung verworfen, die 96-Well-Platte mit den Zellen ein Mal mit Wasser gewaschen, ausgeklopft und zum Trocknen aufgestellt. Zur Bestimmung der Vitalität wurden die trockenen Toxizitäts-Platten mit dem Photometer bei 595 nm gemessen und anhand des GraphPad PRISM 5 Programms die Messwerte ausgewertet. Die optische Dichte wurde normalisiert, indem die optische Dichte der unbehandelten Zellen (Zellen mit Mediumkontrolle) gleich 100 % und die Tox-Mix-behandelten Zellen gleich 0 % gesetzt wurden, um die prozentuale Überlebenswahrscheinlichkeit der anderen Stimulationen berechnen zu können.

3.2.4 Ermittlung des EC₅₀-Wertes

Der EC₅₀ Wert entspricht der mittleren effektiven Konzentration. Die effektive Konzentration bezieht sich auf den Bereich, bei dem ein halbmaximaler Effekt (50%) beobachtet wird. D. h. in diesem Fall entspricht der EC₅₀ Wert der Stimulationskonzentration, bei der die Hälfte der Zellen gestorben sind.

3.3. Western Blot

3.3.1 Zellaussaat

Die Zellen wurden zunächst ü.N. bei 37°C in einer 6-Wellplatte kultiviert. Pro Well wurden 1×10^6 Zellen in 1 ml 10 % FCS und 1 % P/S RMPI-Medium ausgesät.

3.3.2 Stimulation

Je nach Versuchsanordnung wurden die verschiedenen Zelllinien unterschiedlich behandelt. Dabei wurde 100 ng/ml TNF oder Killer-TRAIL in 1 ml 10 % FCS RPMI-Medium auf die Zellen gegeben und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und / oder unter unterschiedlichen Bedingungen vorinkubiert in Form von 30 minütiger Vorstimulation mit 1 ml Medium oder je nach Stimulation Medium versetzt mit 20 µM zVAD, 90 µM Necrostatin-1, CHX und 100 ng/ml TWEAK-Flag.

3.3.3 Herstellung von Totalzell-Lysaten

Nach der Stimulation der Zellen wurden diese geerntet, indem die Zellen mit einem Zellschaber von der 6-Wellplatte gelöst wurden und samt Überstand in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt wurden und 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert wurden. Darauf folgend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem PBS von Überresten befreit und in 100 - 150 µl Laemmli-Puffer aufgenommen. Nachdem das Zellpellet-Laemmli-Puffer-Gemisch 20 - 25 sec sonifiziert worden war, wurde das Zelllysat noch für 5 min bei 95 °C gekocht und 1 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Die fertigen Lysate wurden entweder gleich auf das Gel aufgetragen oder bei -20°C weggefroren, um sie für einen späteren Zeitpunkt aufzubewahren.

3.3.4 SDS-PAGE und Blotting

Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurde ein 10 % oder 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel gewählt. Dieses Gel besteht aus der unteren Trenngelschicht (10 % / 12 % Acrylamid; 0,374 M Tris pH 8,8; 3,5 mM SDS; 0,1 % APS und 0,1 % TEMED) und der oberen Sammelgelschicht (6 % Acrylamid; 0,123 M Tris pH 6,8; 3,75 mM SDS; 0,1 % APS; 0,1 % TEMED und 3 % Bromphenolblau). Dafür wurden alle Chemikalien für das Trenngel gemischt in die Gelapparatur eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet, um eine gleichmäßig glatte Oberfläche zu schaffen. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen, das Trenngel mit der Sammelgel-Mischung überschichtet und mit einem Kamm für die Probenbeladung versehen. Im Anschluss wurde der Kamm aus der polymerisierten Sammelgelschicht gezogen und die Gellaufapparatur mit 1 x Laufpuffer gefüllt. Je nach zu untersuchendem Protein wurden 5 - 10 µl Totalzell-Lysat auf das Gel

Methoden

gegeben. Die elektrophoretische Auftrennung fand für 1 h und 30 min bei 120 V und 400 mA statt. Nach der Proteinauftrennung wurde das Gel auf eine Nitrocellulose-Membran gelegt und von je zwei in Blott-Puffer getränkten Whatman-Papieren ummantelt. Das Blotten fand für 2 h und 30 min bei 400 mA und 90 V in einer Nass-Blot-Kammer, gefüllt mit Blott-Puffer, statt.

3.3.5 Antikörper-Inkubation und -Detektion

Nach erfolgreichem Blotten wurden unspezifische Proteine mit 5 % Magermilch in 1x PBST / TBST für 1 h bei RT abgeblockt. Nach 3 x Waschen mit PBST / TBST à 5 min wurde der Primärantikörper in 10 ml PBST / TBST auf die Nitrocellulose-Membran gegeben und ü.N. bei 4°C auf den Schüttler gestellt. Am nächsten Tag wurde nach 3 x Waschen mit PBST / TBST à 5 min der Primärantikörper durch 10 ml HRP-gelabeltem Sekundärantikörper ersetzt. Mindestens 1 h bei RT, nachdem der Sekundärantikörper an die Proteine auf der Membran gebunden hatte, konnten die Proteine mittels ECL detektiert werden. Dabei wurde die Membran 3 x für 10 min mit PBST / TBST gewaschen und im Anschluss für 1 min in die ECL-Lösung, welche aus ECL-Lsg 1 (0,1 M TRIS-HCl pH 8,6 mit 0,25 mg/ml Luminol), ECL-Lsg 2 ((1:10) 1,1 mg/ml para-Hydro-*Xycoumaric acid* in DMSO) und ECL-Lsg 3 ((1:3.333) 30% H₂O₂) besteht, getaucht, um in der Dunkelkammer die Proteine mittels Röntgenfilm und Entwicklermaschine sichtbar werden zu lassen.

3.4 IL-8 ELISA

3.4.1 Zellaussaat

Die Zellen wurden zunächst über Nacht bei 37°C in einer 96-Wellplatte kultiviert. Pro Well wurden 20.000 Zellen in 100 µl 10 % FCS und 1 % P/S RMPI-Medium ausplattiert.

3.4.2 Stimulation

Die verschiedenen Zelllinien wurden in Triplikate mit TNF, Killer-TRAIL, TWEAK-Flag oder einer Mediumkontrolle stimuliert. Dabei wurde das Medium, welches zum Kultivieren verwendet wurde, durch 50 µl der speziellen Vorbehandlung in Form von Medium oder Medium, versetzt mit 20 µM ZVAD und 90 µM Necrostatin-1, ersetzt.

Methoden

Nach 30 min wurden auf die 50 µl Vorstimulation weitere 50 µl von 100 ng/ml TNF, Killer-TRAIL, TWEAK-Flag oder einer Mediumkontrolle gegeben. Über Nacht wurden die Zellen bei 37°C inkubiert.

3.4.3 Messung

Zur Bestimmung der IL-8 Produktion wurden 50 µl der 1:10 in PBS verdünnten Zellkulturüberstände der 96-Well-Platte aufgetragen und nach Herstellervorgabe des BD OptEIA Human IL-8 ELISA Kits die Konzentration an IL-8 mittels Photometer bei 405 nm ermittelt und anhand des GraphPad PRISM 5 Programms die Messwerte ausgewertet.

4. Ergebnisse

Inhalt dieser Arbeit ist die Untersuchung der TNF- und TRAIL-induzierten Apoptose und Nekroptose in HeLa Zellen. Diese aus dem Epithel eines menschlichen Zervixkarzinoms stammende Zelllinie ist in der Lage durch Apoptose zu sterben. Aufgrund der fehlenden Expression von RIPK3 sind HeLa Zellen jedoch vor Nekroptose geschützt. Aus diesem Grund wurden HeLa Zellen verwendet, die stabil mit RIPK3 (HeLa-RIPK3) oder zur Kontrolle mit Leervektor transfiziert worden waren (HeLa-LV). Die Zelllinien waren ein Geschenk aus der Arbeitsgruppe von Martin Leverkus (128).

4.1. TNF- und TRAIL-induzierter Zelltod in HeLa-LV Zellen und HeLa-RIPK3 Zellen

Zunächst wurde die Apoptose- und Nekroptose-Induktion unter verschiedenen Bedingungen in den beiden Zelllinien HeLa-LV (Kontrollzelllinie mit Leervektor) und HeLa-RIPK3 untersucht. Als erstes wurde überprüft, inwiefern Caspase-Aktivierung und damit Apoptose-Induktion durch TNF- und TRAIL-Stimulation in HeLa-LV Zellen und HeLa-RIPK3 Zellen unterscheidet (Abb. 4.1.1) Hierzu wurden die Zelllinien HeLa-LV und HeLa-RIPK3 mit einem Inhibitor der Proteinbiosynthese, Cycloheximid (CHX), behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen mit TNF oder TRAIL stimuliert. Am nächsten Tag wurden Totalzelllysate im Western Blot bezüglich des Expressionslevels der Caspase-8, -3 und -9 sowie einiger deren Substrate analysiert. Sowohl in HeLa-LV Zellen als auch in HeLa-RIPK3 Zellen führte die Aktivierung von TNFR1 bzw. TRAILR1/2 zur verstärkten Caspase-8-abhängigen Apoptose-Induktion. Eine Spaltung von RIPK1 wurde nur in CHX-behandelten HeLa-RIPK3 Zellen, die mit TNF bzw. TRAIL stimuliert worden waren, beobachtet. Die RIPK3-Expression scheint also die Caspase-Aktivierung zu verstärken. Zur Bestätigung der Annahme zeigte die Detektion von CYLD, einem Caspase-8-Substrat, und PARP, einem Caspase-3-Substrat, gleichfalls eine verstärkte Prozessierung in HeLa-RIPK3 Zellen (Abb. 4.1.1).

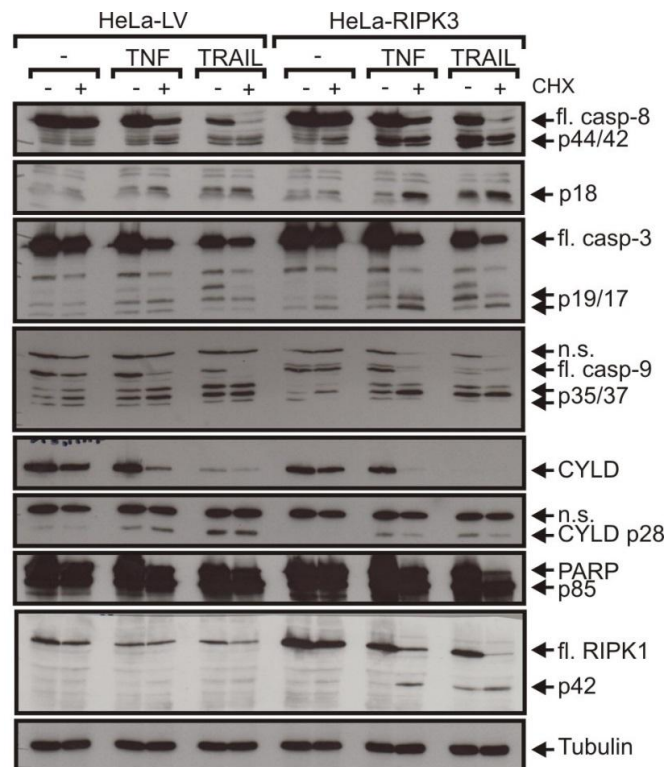


Abbildung 4.1.1 TNF- und TRAIL-induzierte Caspase-Aktivierung in HeLa-LV Zellen und HeLa-RIPK3 Zellen

HeLa-LV Zellen und HeLa-RIPK3 Zellen wurden 30 min wie angegeben mit 2,5 µg/ml CHX vorbehandelt. Im Anschluss wurden die Zellen entweder mit 100 ng/ml TNF oder 100 ng/ml TRAIL ü.N. stimuliert. Mittels Western Blot wurden die Caspasen und deren Substrate untersucht. n.s. = nicht spezifisch, fl. = *full length* / volle Länge

Durch Zugabe von ZVAD kann die Apoptose inhibiert werden. Entsprechend behandelte HeLa-LV Zellen und HeLa-RIPK3 Zellen sollten daher ausschließlich an Nekroptose sterben (Abb. 4.1.2). Nach 8 stündiger Stimulation mit TNF oder TRAIL in Anwesenheit von CHX/ZVAD konnte anhand des Western Blots dargestellt werden, dass es in HeLa-LV Zellen zu keiner RIPK1-Phosphorylierung kam. In CHX/ZVAD-behandelten HeLa-RIPK3 Zellen hingegen, die 8 Stunden mit TNF oder TRAIL stimuliert wurden, konnte eine verstärkte Phosphorylierung von RIPK1 nachgewiesen werden. Ebenso kam es bei HeLa-RIPK3 Zellen zu einer RIPK1-Spaltung sowohl bei TNF/CHX-stimulierten Zellen als auch bei TRAIL-stimulierten Zellen mit und ohne CHX. ZVAD- bzw. CHX/ZVAD-behandelte Zellen zeigten keinerlei Spaltung von RIPK1, d.h. der Caspase-Inhibitor ZVAD wirkte effektiv. Folglich führt eine Phosphorylierung von RIPK1 in HeLa-RIPK3 Zellen zum

Ergebnisse

nekroptotischen Zelltod. HeLa-LV Zellen hingegen zeigen keine nekroptotische RIPK1-Phosphorylierung. (Abb. 4.1.2).

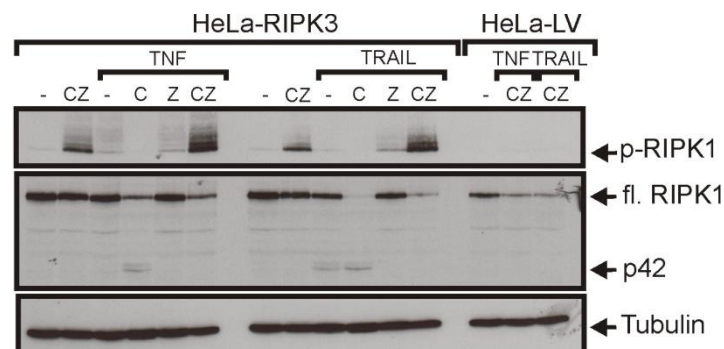


Abbildung 4.1.2 TNF- und TRAIL-induzierte RIPK1-Aktivierung in HeLa-LV Zellen und HeLa-RIPK3 Zellen

HeLa-LV Zellen und HeLa-RIPK3 Zellen wurden 30 min wie angegeben mit 2,5 µg/ml CHX (C) und 20 µM ZVAD (Z) inkubiert und im Folgenden mit 100 ng/ml TNF oder 100 ng/ml TRAIL für 8 h stimuliert. Mittels Western Blot-Analyse von Totalzell-Lysaten wurde die Phosphorylierung und Spaltung von RIPK1 analysiert. fl. = *full length* / volle Länge

Zusätzlich wurden Toxizitäts-Assays durchgeführt. Hierzu wurden HeLa-LV Zellen bzw. HeLa-RIPK3 Zellen zunächst mit ZVAD, Necrostatin-1 oder beidem wahlweise in Kombination mit und ohne CHX für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 ng/ml TNF oder TRAIL über Nacht stimuliert und am nächsten Tag die Zellen mit Kristallviolett gefärbt (Abb. 4.1.3). Nicht nur die Überlebenswahrscheinlichkeit, sondern auch der EC₅₀ Wert (mittlere effektive Konzentration) konnte bei den TNF- und TRAIL- stimulierten HeLa Zellen und HeLa-RIPK3 Zellen ermittelt werden (Tab. 4.1). Die mittlere effektive Konzentration entspricht in diesem Fall der Konzentration an TNF oder TRAIL, die in der Hälfte der jeweiligen Zellpopulation Zelltod induziert.

HeLa-LV Zellen starben (24 % Vitalität / 2,2 ng/ml EC₅₀-Wert) nur durch die Kombination von TNF und CHX. Die alleinige Gabe von TNF hatte keinen Einfluss auf die Zellvitalität. TNF/CHX-Stimulation führte auch bei Zugabe von Necrostatin-1 zum Zelltod (43 %). Nur die Verabreichung von ZVAD bzw. von ZVAD/Necrostatin-1 konnte das Zellsterben verhindern. Folglich starben die HeLa-LV Zellen ausschließlich auf apoptotischem Weg.

Ergebnisse

Die Zellvitalität ging nach alleiniger Stimulation mit TRAIL nur geringfügig zurück, während TRAIL in Anwesenheit von CHX zum Zelltod führte (14 %). Auch in der Anwesenheit von Necrostatin-1 induzierte TRAIL den Zelltod, während die Behandlung mit ZVAD und ZVAD/Necrostatin-1 HeLa-LV Zellen vor dem zytotoxischen TRAIL-Effekt schützte.

Folglich starben die Zellen auch bei TRAIL-Stimulation ausschließlich an Apoptose. Zusätzlich ließ sich erkennen, dass die Zellen sensibler auf die Stimulation mit TRAIL als auf TNF reagierten.

Auch TNF-stimulierte HeLa-RIPK3 Zellen überlebten. Die Zellen starben bei Stimulation mit TNF/CHX (40 % / 24 ng/ml) unabhängig der Anwesenheit von ZVAD (62 %) oder Necrostatin-1 (63 %).

Dies lässt darauf schließen, dass TRAIL-behandelte HeLa-RIPK3 Zellen sowohl durch Apoptose als auch durch Nekroptose sterben. Entsprechend schützte die Verabreichung von ZVAD/Necrostatin-1 TNF/CHX-behandelte HeLa-RIPK3 Zellen vollständig (Abb. 4.1.3 und Tab. 4.1). TRAIL/CHX-stimulierte HeLa-RIPK3 Zellen zeigten ein signifikantes Zellsterben, selbst wenn die Zellen mit ZVAD oder Necrostatin-1 behandelten wurden. Nur die Kombination aus ZVAD/Necrostatin-1 konnte das TRAIL/CHX-induzierte Zellsterben verhindern. Demzufolge induziert TRAIL/CHX auch in HeLa-RIPK3 Zellen Apoptose und Nekroptose (Abb. 4.1.3 und Tab. 4.1).

Die Toxizitäts-Assays zeigten auf zellulärer Ebene die gleichen Ergebnisse wie die in den Western Blots auf Proteinebene erhobenen Daten, nämlich dass HeLa-LV Zellen nur durch Apoptose, HeLa-RIPK3 Zellen jedoch durch Apoptose und Nekroptose sterben (Abb. 4.1.1 und 4.1.2).

Ergebnisse

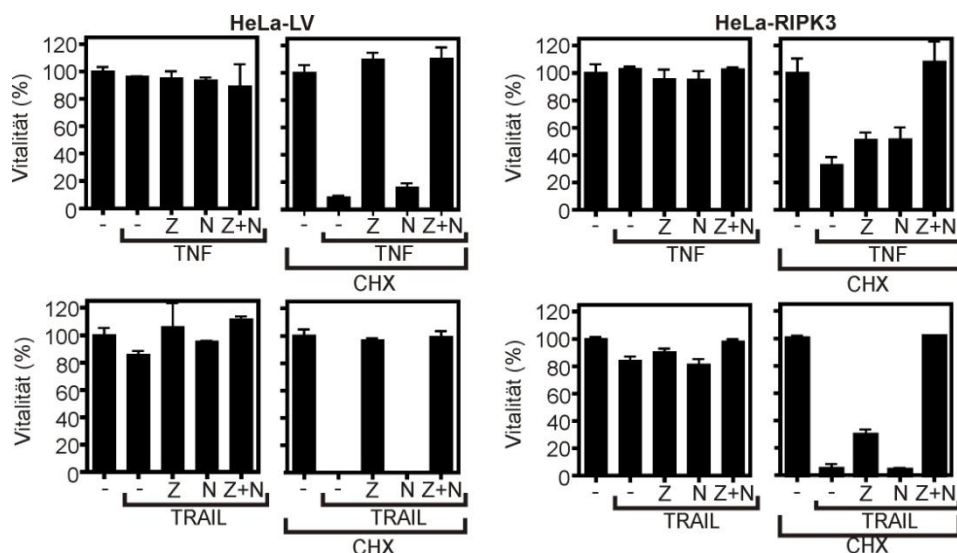


Abbildung 4.1.3 Toxizitäts-Assay mit TNF- und TRAIL-stimulierten HeLa-LV Zellen und HeLa-RIPK3 Zellen

HeLa-LV Zellen und HeLa-RIPK3 Zellen wurden wie angegeben mit 2,5 µg/ml CHX, 20 µM ZVAD (Z) und 90 µM Necrostatin-1 (N) für 30 min vorbehandelt und dann mit 100 ng/ml TNF oder 100 ng/ml TRAIL ü.N. stimuliert. Am Folgetag wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und gemessen, die erworbenen Messwerte mit GraphPad PRISM 5 ausgewertet und mittels Corel DRAW graphisch dargestellt.

Tabelle 4.1 EC₅₀ Werte von HeLa Zellen und HeLa-RIPK3 Zellen

	HeLa-LV			HeLa-RIPK3		
	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	7	86 ± 15		11	96 ± 13	
TNF + Z	3	95 ± 7		7	95 ± 15	
TNF + N	3	84 ± 17		5	95 ± 11	
TNF + ZN	3	93 ± 8		4	97 ± 8	
TNF + C	2	24 ± 1	2,2 ± 0,9	4	40 ± 6	24 ± 24
TNF + CZ	7	99 ± 13		4	62 ± 7	
TNF + CN	2	43 ± 13		3	63 ± 20	
TNF + CZN	5	100 ± 14		4	102 ± 7	
TRAIL	6	90 ± 9		11	93 ± 10	
TRAIL + Z	5	99 ± 6		7	92 ± 12	
TRAIL + N	2	66 ± 3		5	77 ± 5	
TRAIL + ZN	3	92 ± 6		5	93 ± 7	
TRAIL + C	4	14 ± 19	1,6 ± 0,6	6	7 ± 6	1,7 ± 2,3
TRAIL + CZ	7	96 ± 13		5	21 ± 20	2,8 ± 2
TRAIL + CN	3	23 ± 10	1,1 ± 0,1	5	10 ± 11	1,2 ± 1,1
TRAIL + CZN	4	93 ± 9		4	101 ± 2	

n= Anzahl der Experimente ; %= Vitalität; EC₅₀= Konzentration bei 50% Vitalität ; C= CHX
N= Necrostatin-1 ; Z= ZVAD

Ergebnisse

Für eine nähere Betrachtung der RIPK1-Aktivierung und -Spaltung nach Aktivierung des TNFR1 oder der TRAIL-Todesrezeptoren wurden HeLa-RIPK3 (Kontroll)-Zellen (CRISPR-Leervektor/Cas-9 behandelte HeLa-RIPK3 Zellen) für 2, 4 oder 8 Stunden mit 100 ng/ml TNF oder TRAIL stimuliert. Die Zellen wurden in der Anwesenheit von ZVAD, CHX oder beidem inkubiert und anschließend Totalzelllysate hergestellt. Mittels Western Blot zeigte sich, dass mit der zunehmenden Dauer der Inkubation mit TNF, TNF/ZVAD und TNF/CHX/ZVAD die Phosphorylierung von RIPK1 zunahm. Keine Phosphorylierung konnte bei TNF/CHX-stimulierten Zellen erkannt werden. Eine deutlich erhöhte TRAIL-induzierte Phosphorylierung von RIPK1 konnte auch in ZVAD- und CHX/ZVAD-behandelten Zellen entdeckt werden, eine geringere Phosphorylierung von RIPK1 war bei der alleinigen TRAIL-Stimulation zu sehen. TRAIL/CHX-Behandlung wies nur nach 2 h eine Phosphorylierung auf. Auffällig war, dass Spaltprodukte von pRIPK1 bei den TRAIL/CHX-inkubierten HeLa-RIPK3 Zellen zu erkennen waren, nicht jedoch bei TNF/CHX-Gabe. Außerdem konnte nach 4 - 8 h in TRAIL/CHX-stimulierten Zellen eine Spaltung von RIPK1 gezeigt werden (Abb. 4.1.4).

Durch Inhibierung der Apoptose durch ZVAD sterben die CHX-vorbehandelten TNF- und TRAIL-stimulierten HeLa-RIPK3 Zellen an Nekroptose (Abb. 4.1.4).

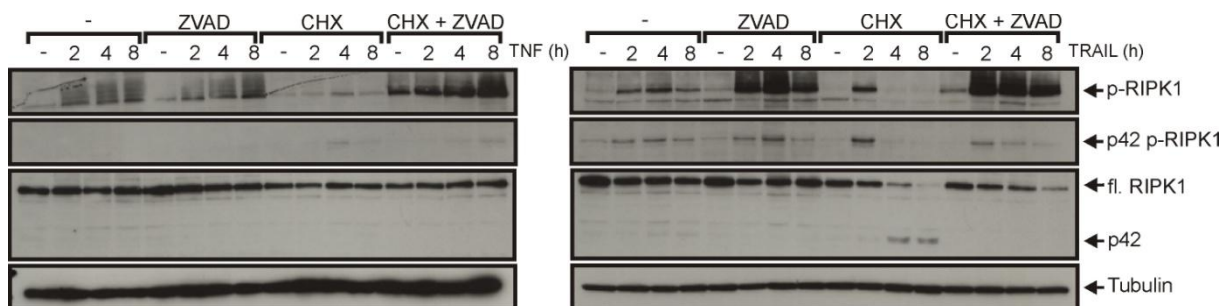


Abbildung 4.1.4 TNF- bzw. TRAIL-stimulierte und CHX- und / oder ZVAD-inkubierte HeLa-RIPK3 (Kontrolle) Zellen

HeLa-RIPK3 crisp. cas. Kontrolle Zellen wurden 30 min vorher entweder mit 2,5 µg/ml CHX und / oder 20 µM ZVAD vorbehandelt und mit 100 ng/ml TNF oder TRAIL für 0-2-4 oder 8 h stimuliert. Mittels Western Blot wurde die Phosphorylierung und Spaltung von RIPK1 sichtbar gemacht. fl. = *full length* / volle Länge

Ergebnisse

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass TNF und TRAIL in HeLa-LV Zellen nur Apoptose induzieren, doch in HeLa-RIPK3 Zellen sowohl Apoptose als auch Nekroptose aktivieren können.

4.2. Relevanz der DD-Adapterproteine TRADD, FADD und RIPK1 für Caspase-Aktivierung und Zelltodinduktion durch TNF und TRAIL

Um herauszufinden welche Rolle die DD-Adapterproteine TRADD, FADD und RIPK1 in der TNFR1- und TRAILR1/2-Signaltransduktion spielen, wurden HeLa-RIPK3 Varianten untersucht, in denen die für TRADD, FADD und RIPK1 kodierenden Gene mittels des CRISPR/Cas9-Systems ausgeknockt wurden. Diese im Folgenden als HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}), HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO}) und HeLa-RIPK3-RIPK1_{KO} (RIPK1_{KO}) bezeichneten Varianten, sowie alle weiteren *Knockout*-Zelllinien wurden von Frau Dr. Siegmund zur Verfügung gestellt. (Abb. 4.2.1).

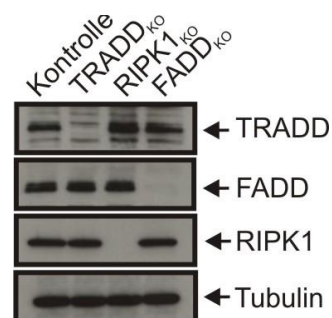


Abbildung 4.2.1 Nachweis der Deletion bei Einzel-KO Zelllinien

Von den Zelllinien HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO}), HeLa-RIPK3-RIPK1_{KO} (RIPK1_{KO}) und HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}) wurden Totalzelllysate hergestellt und mittels Western Blot den *Knockout* der einzelnen DD-Adapterproteine nachgewiesen.

Mittels Toxizitäts-Assays wurde analysiert, inwieweit das Entfernen der DD-Adapterproteine TRADD, FADD und RIPK1 einen Einfluss auf die Zellvitalität hat (Abb. 4.2.2 und 4.2.3 und Tab. 4.2). Dafür wurden HeLa-RIPK3- RIPK1_{KO}, -FADD_{KO} und -TRADD_{KO} 30 min mit ZVAD, Necrostatin-1 oder beide Reagenzien mit und ohne CHX vorbehandelt und anschließend über Nacht mit TNF oder TRAIL stimuliert (Abb.

4.2.2 und 4.2.3). Um die Sensitivität der einzelnen DD-Adapterprotein-defizienten HeLa-RIPK3 Varianten besser beurteilen zu können, wurden die verschiedenen Zellen mit einer abnehmenden Konzentration von TNF (20er Titrationschritten) oder Killer-TRAIL (4er Titrationschritten) stimuliert (Abb. 4.2.3). Durch Titration von TNF bzw. TRAIL konnte für die Kontrollzellen und die Einzel-DD-Adapterprotein-KO Zellen der EC₅₀ Wert ermittelt werden (Tab. 4.2).

Kontrollzellen zeigten keine Anzeichen eines Zelltods bei der alleinigen Inkubation mit TNF oder TRAIL. Nach Zusatz von CHX starben diese Zellen jedoch nach Stimulation mit TNF oder TRAIL an Nekroptose und Apoptose (10 - 70 % / 2,5 ng/ml). Weder die Gabe von ZVAD noch die von Necrostatin-1 reichte nach TRAIL/CHX- oder TNF/CHX-Stimulation aus, um die Zellen vor dem Zelltod zu schützen (1,3 - 4 ng/ml). Nur die kombinierte Verabreichung von ZVAD mit Necrostatin-1 konnte den TNF- und TRAIL-induzierten Zelltod verhindern.

RIPK1_{KO} Zellen starben nach Stimulation mit TNF/CHX (50 % / 1,1 ng/ml) bzw. TRAIL/CHX (9 % / 3,2 ng/ml). Die Verabreichung von Necrostatin-1 zu TNF/CHX oder TRAIL/CHX verhinderte den Zelltod nicht (13 - 30 % / 1 ng/ml). Jedoch führte die Zugabe von ZVAD zum vollständigen Überleben der Zellen. So lässt sich schlussfolgern, dass diese Zelllinie nach Inkubation mit TNF/CHX oder TRAIL/CHX ausschließlich an Apoptose stirbt. Dementsprechend ist das DD-Adapterprotein RIPK1 essentiell für die Nekroptose.

FADD_{KO} Zellen wurden mit CHX behandelt und mit TRAIL stimuliert, doch wurde kein Zelltod induziert. Unabhängig von der CHX-Zugabe wiesen TNF-stimulierte FADD_{KO} Zellen ein hohes Maß an Zelltod auf (10 - 25 % / 0,05 - 2 ng/ml). Die Apoptose-Aktivierung konnte bei TNF-stimulierten FADD_{KO} Zellen durch Verabreichung von ZVAD nicht verhindert werden (7 - 23 % / 0,04 - 0,4 ng/ml). Die Gabe von Necrostatin-1 hingegen führte dazu, dass TNF-stimulierte FADD_{KO} Zellen keinerlei Zellsterben aufwiesen. FADD ist daher essentiell für die Apoptose-Induktion durch TNFR1 und für die Nekroptose- und Apoptose-Aktivierung durch TRAILR1/2.

TRADD_{KO} Zellen zeigten bei Inkubation mit TNF/ZVAD oder TRAIL/ZAVD eine reduzierte Vitalität (ca. 84 %). Wenn TRADD_{KO} Zellen mit TNF/CHX oder TRAIL/CHX stimuliert wurden, wiesen die Zellen, unabhängig von der Zugabe von ZVAD oder Necrostatin-1, geringere Überlebenswahrscheinlichkeit auf (6 - 28 % / 0,05 - 4,2 ng/ml). Nach Stimulation mit TNF oder TRAIL sterben TRADD_{KO} Zellen an

Ergebnisse

Nekroptose, doch nach zusätzlicher Zugabe von CHX können diese an Apoptose und Nekroptose sterben (Abb. 4.2.2 und 4.2.3 und Tab. 4.2).

Beim Vergleich der EC_{50} -Werte der verschiedenen Einzel-KO-Zelllinien stellte sich heraus, dass $FADD_{KO}$ Zellen und $TRADD_{KO}$ Zellen durch Inkubation mit TNF/CHX oder TNF/CHX/ZVAD die geringste Konzentration an Stimulus brauchten um weniger als 50 % Überlebenswahrscheinlichkeit zu haben (Tab 4.2).

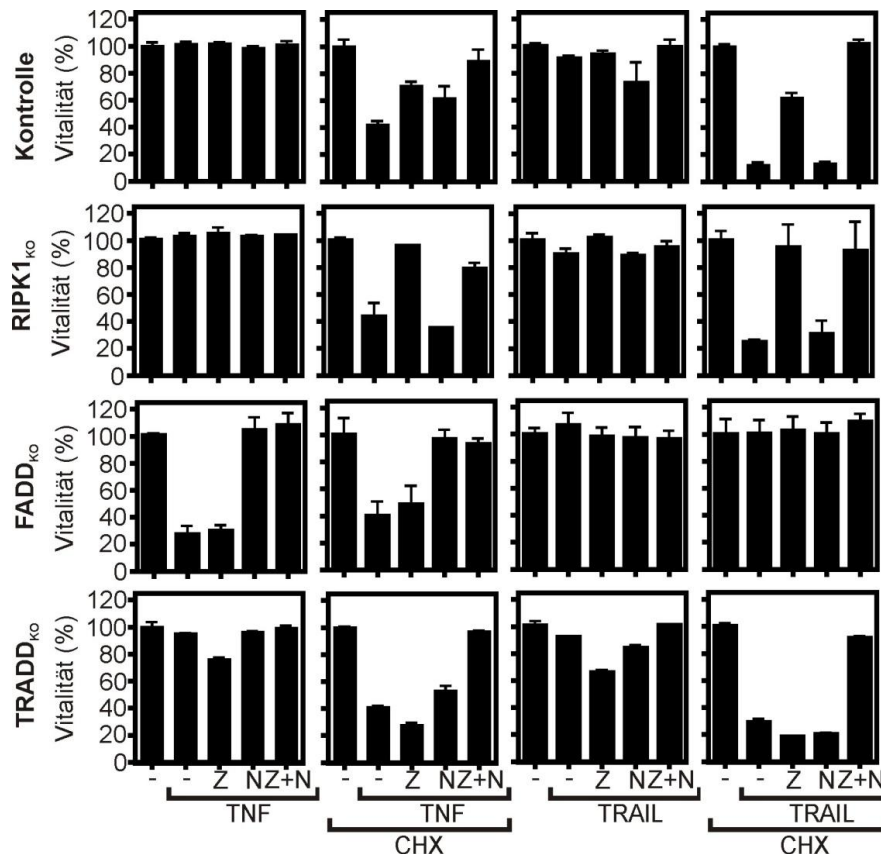


Abbildung 4.2.2 Toxizitäts-Assay von TNF- oder TRAIL-stimulierten Einzel-DD-Adapterprotein-KO Zellen

HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-RIPK1_{KO} (RIPK1_{KO}), HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}) und HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO}) Zellen wurden 30 min wie angegeben mit 2,5 μ g/ml CHX, 20 μ M ZVAD (Z) und 90 μ M Necrostatin-1 (N) vorstimuliert und später mit 100 ng/ml TNF oder Killer-TRAIL ü.N. inkubiert. Anschließend wurden die verbleibenden lebenden Zellen mit Kristallviolett quantifiziert und die erhaltenen Messwerte mit GraphPad PRISM 5 ausgewertet.

Tabelle 4.2 EC₅₀ Werte der Einzel-DD-Adapterprotein-KO Zellen

	Kontrolle			FADD _{KO}		
	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	45	94 ± 21		20	10 ± 20	2 ± 1,4
TNF + Z	39	98 ± 15		4	7 ± 7	0,4 ± 0,5
TNF + N	29	97 ± 12		21	96 ± 14	
TNF + ZN	35	96 ± 15		25	99 ± 13	
TNF + C	9	24 ± 20	2,5 ± 3,9	5	25 ± 20	0,05 ± 0,06
TNF + CZ	4	19 ± 10	1,3 ± 2,6	4	23 ± 18	0,04 ± 0,03
TNF + CN	21	64 ± 12		16	96 ± 13	
TNF + CZN	23	95 ± 13		20	98 ± 14	
TRAIL	33	86 ± 24		31	96 ± 18	
TRAIL + Z	27	79 ± 25		28	92 ± 22	
TRAIL + N	17	65 ± 18		26	95 ± 14	
TRAIL + ZN	25	95 ± 15		22	97 ± 13	
TRAIL + C	19	7 ± 14	2,5 ± 3,8	31	88 ± 24	
TRAIL + CZ	8	28 ± 18	3,9 ± 1	22	89 ± 23	
TRAIL + CN	5	9 ± 7	4 ± 3,5	22	89 ± 20	
TRAIL + CZN	17	98 ± 10		17	92 ± 15	

	TRADD _{KO}			RIPK1 _{KO}		
	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	29	93 ± 18		24	98 ± 15	
TNF + Z	28	84 ± 22		19	101 ± 9	
TNF + N	26	90 ± 16		21	92 ± 17	
TNF + ZN	22	96 ± 15		17	98 ± 15	
TNF + C	6	6 ± 5	0,05 ± 0,09	7	22 ± 15	1,1 ± 2,5
TNF + CZ	4	22 ± 5	0,03 ± 0,03	15	97 ± 11	
TNF + CN	4	28 ± 12	0,1 ± 0,06	4	30 ± 15	1 ± 1,5
TNF + CZN	17	95 ± 14		15	99 ± 10	
TRAIL	16	93 ± 12		21	87 ± 13	
TRAIL + Z	10	83 ± 18		15	96 ± 13	
TRAIL + N	9	79 ± 10		13	77 ± 12	
TRAIL + ZN	12	100 ± 10		16	94 ± 12	
TRAIL + C	9	9 ± 12	1,9 ± 2	7	9 ± 7	3,2 ± 1,2
TRAIL + CZ	6	11 ± 14	1,9 ± 0,9	12	95 ± 15	
TRAIL + CN	5	15 ± 10	4,2 ± 3,5	5	13 ± 12	1 ± 1,3
TRAIL + CZN	8	96 ± 11		11	95 ± 8	

n= Anzahl der Experimente ; %= Vitalität; EC₅₀= Konzentration bei 50% Vitalität ; C= CHX
N= Necrostatin-1 ; Z= ZVAD

Ergebnisse

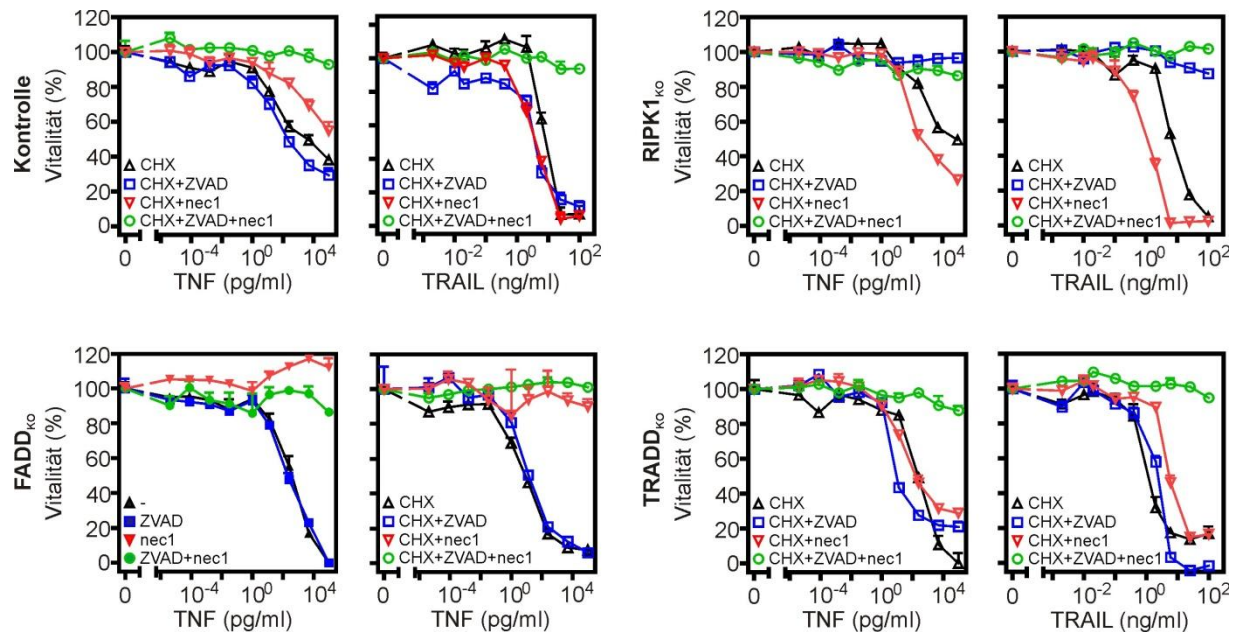


Abbildung 4.2.3 Einzel-DD-Adapterprotein-KO Zellen stimuliert mit abnehmenden Konzentrationen an TNF oder TRAIL

HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-RIPK1_{KO} (RIPK1_{KO}), HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}) und HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO}) Zellen wurden mit den angegebenen Kombinationen an 2,5 µg/ml CHX, 20 µM ZVAD (Z) und 90 µM Necrostatin-1 (N) 30 min behandelt und dann mit 100 ng/ml TNF in 20er Titrationschritten oder 100 ng/ml Killer-TRAIL in 4er Titrationschritten ü.N. stimuliert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt, gemessen und die Messwerte mit GraphPad PRISM 5 graphisch dargestellt.

RIPK1 ist für die Nekroptose essentiell. FADD ist notwendig für die TNF-induzierte Apoptose und ermöglicht die TRAIL-induzierte Apoptose und Nekroptose.

Da Kontrollzellen sowie Einzel-KO Zellen in den Toxizitäts-Assays überwiegend nur Zelltod-Induktion nach vorheriger CHX-Zugabe zeigten (Ausnahme bilden die FADD_{KO} Zellen bei TNF-Stimulation), wurden die Kontrollzellen, FADD_{KO} Zellen, TRADD_{KO} Zellen und RIPK1_{KO} Zellen mit CHX vorbehandelt und im Anschluss mit TNF oder TRAIL stimuliert, um die Caspase-Aktivierung mittels Western Blot zu analysieren (Abb. 4.2.4). Die Western Blot Analyse ergab, dass bei Inkubation mit TNF/CHX mit Ausnahme der FADD_{KO} Zellen alle Zellvarianten eine Spaltung von Caspase-8, -3, CYLD und PARP zeigten. Kontrollzellen, TRADD_{KO} Zellen und RIPK1_{KO} Zellen wiesen spätestens nach 6 stündiger TNF/CHX-Stimulation eine

Ergebnisse

Prozessierung der untersuchten Proteine auf. Dabei lassen TRADD_{KO} Zellen schon nach 3 h TNF/CHX-Inkubationszeit eine Spaltung der Proteine erkennen.

TRAIL/CHX-inkubierte Kontrollzellen zeigten nach einer Stunde, TRADD_{KO} Zellen und RIPK1_{KO} Zellen nach 3 h Spaltprodukte bei den untersuchten Caspasen, CYLD und PARP (Abb. 4.2.4). Diese Western Blot Daten bekräftigen die in den Toxizitäts-Assays gefundenen Befunde (Abb. 4.2.2 und 4.2.3), dass FADD_{KO} Zellen vor dem apoptotischen Zelltod geschützt sind, aber Kontrollzellen, TRADD_{KO} Zellen und RIPK1_{KO} Zellen durch Apoptose sterben.

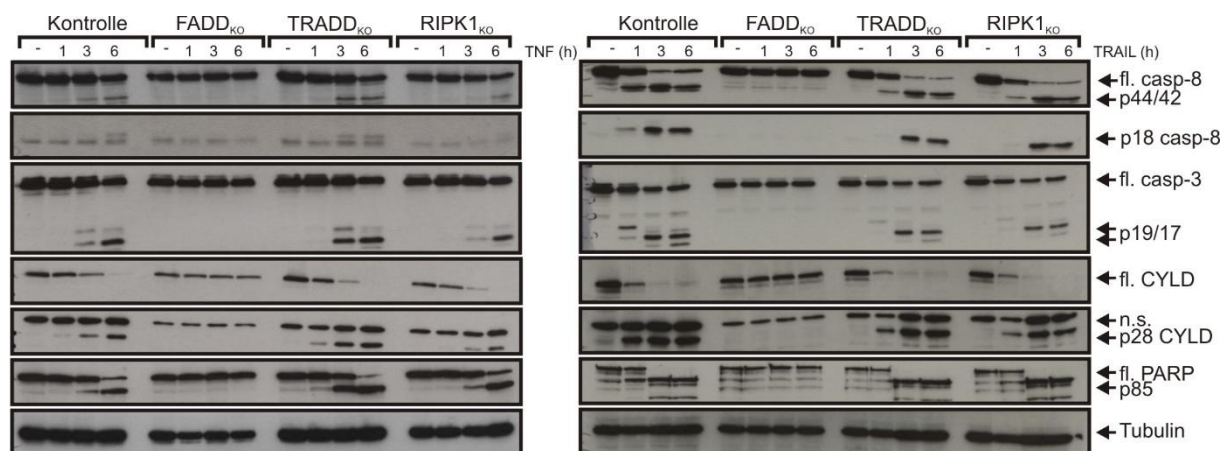


Abbildung 4.2.4 Caspase-Aktivierung in TNF- und TRAIL-stimulierten Kontrollzellen und Einzel-KO Zellen

HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3- FADD_{KO} (FADD_{KO}), HeLa-RIPK3- TRADD_{KO} (TRADD_{KO}) und HeLa-RIPK3- RIPK1_{KO} (RIPK1_{KO}) Zellen wurden auf Caspase-Aktivierung nach TNF- bzw. TRAIL-Stimulation mittels Western Blot untersucht, indem Totalzelllysate hergestellt wurden. Dabei wurden die Zellen vorher 30 min mit 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CHX behandelt und anschließend für 0, 1, 3 oder 6 h mit TNF oder Killer-TRAIL (100 ng/ml) stimuliert. n.s. = nicht spezifisch, fl. = *full length* / volle Länge

FADD_{KO} Zellen zeigten im Western Blot keine Spaltung von Caspasen oder Caspase-Substraten und somit keine Apoptose-Induktion (Abb. 4.2.4). Des Weiteren wurden Kontrollzellen und FADD_{KO} Zellen mittels Western Blot, hinsichtlich der Fähigkeit RIPK1 zu phosphorylieren, vergleichend untersucht. Letzteres ist ein Merkmal des nekroptotischen Zelltods (Abb. 4.2.5). Dabei wurden die zwei Zelllinien entweder nur mit TNF, TNF/CHX/ZVAD oder TRAIL/CHX/ZVAD inkubiert.

Ergebnisse

Stimulation mit TNF von FADD_{KO} Zellen führte zur Phosphorylierung und Abnahme von RIPK1. Bei Kontrollzellen war keine RIPK1-Phosphorylierung oder Veränderung der Menge an RIPK1 nach TNF-Stimulation erkennbar. FADD_{KO} Zellen sind folglich im Vergleich zu Kontrollzellen empfindlicher gegenüber Nekroptose. Bei zusätzlicher Gabe von CHX/ZVAD zu TNF zeigte sich, dass mit längeren Stimulationszeiten die Phosphorylierung von RIPK1 zunahm, gleichzeitig der Gehalt an RIPK1 bei beiden Zelllinien abnahm. Doch war p-RIPK1 bei FADD_{KO} Zellen stärker ausgeprägt. Bei Inkubation beider Zelllinien mit TRAIL/CHX/ZVAD ließen Kontrollzellen eine starke Phosphorylierung von RIPK1 und eine Reduktion an RIPK1 erkennen, während FADD_{KO} Zellen keinerlei p-RIPK1 aufwiesen (Abb. 4.2.5).

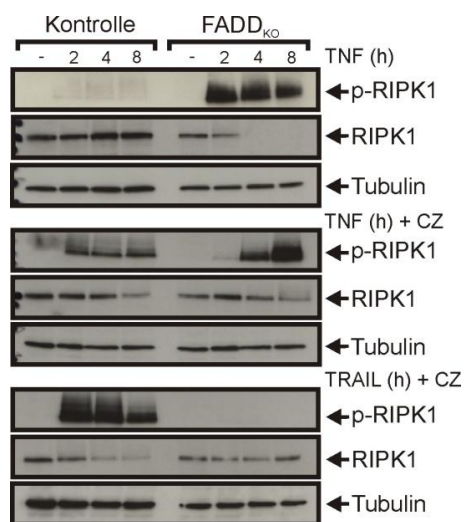


Abbildung 4.2.5 Western Blot Analyse von p-RIPK1 bei TNF-, TNF/CHX/ZVAD- oder TRAIL/CHX/ZVAD-stimulierten Kontrollzellen und FADD_{KO} Zellen

HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle) und HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}) Zellen wurden mittels Western Blot auf die Phosphorylierung von RIPK1 nach vorheriger TNF-, TNF/CHX/ZVAD oder TRAIL/CHX/ZVAD-Stimulation untersucht. Dabei wurden die Zellen für 0, 2, 4 oder 8 h mit TNF (100 ng/ml), TNF/CHX/ZVAD oder TRAIL (100 ng/ml) +CHX/ZVAD stimuliert. CHX (2,5 µg/ml) und ZVAD (20 µM) wurden 30 min vor dem ersten Zeitwert auf die Zellen gegeben.

TNF/CHX/ZVAD-stimulierte Kontrollzellen reagierten schwach auf den nekroptotischen Zelltod. Jedoch unter TRAIL/CHX/ZVAD-Stimulationsbedingung starben die Kontrollzellen verstärkt an Nekroptose. TRAIL/CHX/ZVAD-stimulierte

Ergebnisse

FADD_{KO} Zellen zeigten keine Veränderung in ihrer Vitalität, wurden die Zellen, unabhängig von CHX/ZVAD, mit TNF stimuliert, starben diese an Nekroptose.

Die erhöhte Phosphorylierung von RIPK1 korrespondierte mit der in den Zytotoxizitäts-Experimenten beobachteten verstärkten Nekroptose (Abb. 4.2.5).

Nach Vergleich der Phosphorylierung von RIPK1 bei Kontrollzellen und FADD_{KO} Zellen war es von Interesse zu erfahren, inwiefern RIPK1 und TRADD die Nekroptose-Induktion beeinflussen. Es wurden daher Kontrollzellen, FADD_{KO} Zellen, TRADD_{KO} Zellen und RIPK1_{KO} Zellen mit TNF oder TRAIL stimuliert und Lysate für die Western Blot Analyse der RIPK1-Phosphorylierung hergestellt.

In RIPK1_{KO} Zellen ließen sich erwartungsgemäß nach TNF- und TRAIL-Stimulation weder RIPK1 noch p-RIPK1 nachweisen. TRADD_{KO} Zellen zeigten bei Inkubation mit TNF eine ähnlich starke Intensität in der RIPK1-Phosphorylierung wie Kontrollzellen. Bei TRAIL-Zugabe wiesen TRADD_{KO} Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen weniger Phosphorylierung von RIPK1 und geringere Mengen an RIPK1 auf (Abb. 4.2.6).

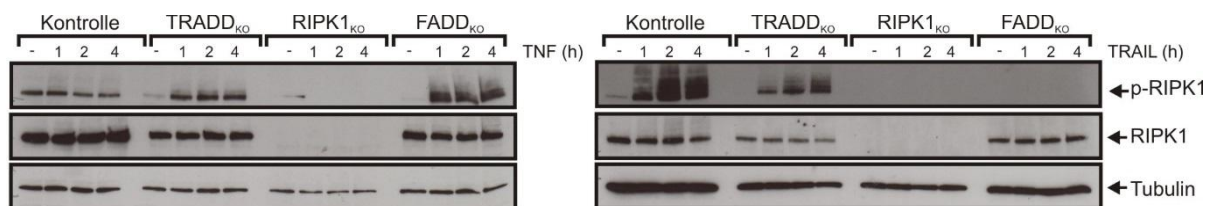


Abbildung 4.2.6 Phosphorylierung von RIPK1 in Kontrolle und Einzel-KO Zellen

HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO}), HeLa-RIPK3-RIPK1_{KO} (RIPK1_{KO}) und HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}) wurden mittels Western Blot auf die Anwesenheit von RIPK1 und deren Phosphorylierung untersucht. Die Zelllinien wurden für 0, 1, 2 oder 4 h mit TNF oder Killer-TRAIL (100 ng/ml) stimuliert und später als Totalzelllysate für die Western Blot Analyse auf das Gel aufgetragen.

Die Ergebnisse des Western Blots stimmen mit den gesammelten Daten der Toxizitäts-Assays überein (Abb. 4.2.2 und 4.2.3). D.h. diese Daten unterstützen die Erkenntnis, dass RIPK1 essentiell für die Nekroptose ist, während TRADD keinen Einfluss auf die Nekroptose ausübt.

Um die vorher ermittelten Ergebnisse noch deutlicher vergleichen zu können, wurden TRADD_{KO} Zellen mit CHX, CHX/ZVAD, CHX/nec-1 oder CHX/ZVAD/nec-1

Ergebnisse

vorbehandelt, anschließend mit TRAIL stimuliert und in einem gemeinsamen Western Blot die Caspase-Aktivierung und die RIPK1-Phosphorylierung analysiert (Abb. 4.2.7).

TRAIL-stimulierte TRADD_{KO} Zellen zeigten Apoptose-Induktion nach vorheriger CHX oder CHX/nec-1 Zugabe, indem Caspase-8, -3 und -9 sowie CYLD und PARP gespalten wurden. Auch konnte eine Spaltung von RIPK1 bei Inkubation mit TRAIL/CHX oder TRAIL/CHX/nec-1 festgestellt werden. Eine Nekroptose-Induktion konnte lediglich bei der TRAIL/CHX/ZVAD-Stimulation durch die Phosphorylierung von RIPK1 nachgewiesen werden.

Dies lässt vermuten, dass bei TRAIL/CHX-stimulierten TRADD_{KO} Zellen nur die apoptotische Signalkaskade aktiviert wird, ist diese inhibiert z.B. durch ZVAD, sterben die Zellen an Nekroptose.

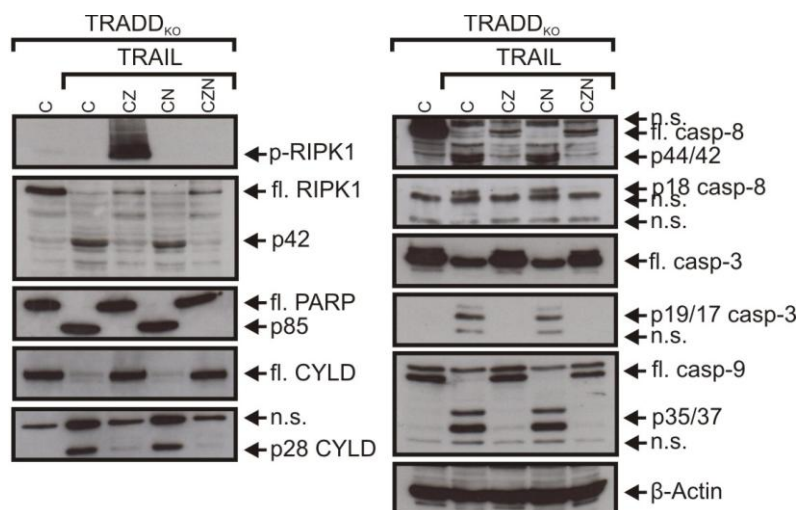


Abbildung 4.2.7 Apoptose- und Nekroptose-Induktion in TRADD_{KO} Zellen

Bei HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO}) Zellen wurde die Apoptose- und Nekroptose-Induktion mittels Western Blot nachgewiesen. Dabei wurden die Zellen wie angegeben 30 min mit 2,5 µg/ml CHX (C), 20 µM ZVAD (Z) und 90 µM Necrostatin-1 (N) vorbehandelt und im Anschluss 8 h mit Killer-TRAIL (100 ng/ml) stimuliert. Später wurden Totalzelllysate hergestellt und mittels Western Blot analysiert. n.s. = nicht spezifisch, fl. = *full length* / volle Länge

Des Weiteren wurde mit Hilfe von ELISA der IL-8 Gehalt ermittelt um festzustellen, ob inflammatorische Signalwege aktiv sind. Vergleichend wurden Kontrollzellen den einzelnen KO-Zelllinien gegenübergestellt und mit TNF, TRAIL oder TWEAK mit und

Ergebnisse

ohne ZVAD/nec-1 stimuliert (Abb. 4.2.8). TWEAK alleine induziert durch die fehlende *death domain* in seinem Rezeptor (Fn14) keinen Zelltod, kann aber die Produktion des NF κ B-Zielgens induzieren und dient hier als Positivkontrolle.

FADD_{KO} Zellen, verglichen mit Kontrollzellen, zeichneten sich durch einen hohen Gehalt an IL-8 nach TNF-Stimulation aus (ca. 2 OD). Durch die Unterbindung von Apoptose und Nekroptose mittels ZVAD/nec-1-Behandlung war die IL-8 Menge deutlich geringer (ca. 1 OD). Auch TWEAK-stimulierte FADD_{KO} Zellen wiesen eine leicht erhöhte Menge an IL-8 auf, bei ZVAD/nec-1-Zugabe war dieses nicht mehr sichtbar.

Sowohl TRADD_{KO} Zellen als auch RIPK1_{KO} Zellen ließen im Gegensatz zu FADD_{KO} Zellen kaum eine erhöhte IL-8 Produktion erkennen. Nur bei TNF- oder TRAIL-inkubierten RIPK1_{KO} Zellen konnte unabhängig von ZVAD/nec-1 Zugabe ein minimal erhöhter IL-8 Gehalt gemessen werden (> 0.5 OD). TRADD_{KO} Zellen hingegen ließen ohne ZVAD/nec-1-Verabreichung bei TNF-, TRAIL- oder TWEAK-Stimulation eine kleine Zunahme an IL-8 erkennen (> 0.5 OD), bei ZVAD/nec-1-Gabe war die IL-8 Menge nicht mehr signifikant erhöht (< 0.5 OD) (Abb. 4.2.8).

Durch die Vorbehandlung mit ZVAD/nec-1 sank die Menge an IL-8 bei allen Einzel-KO Zellen, d.h. bei Aktivierung von Apoptose oder Nekroptose (unabhängig davon was induziert wurde) wurde die Ausschüttung an IL-8 verstärkt. Nur das Fehlen von FADD konnte nach TNF-Stimulation eine deutliche Zunahme von IL-8 verursachen. Die Abwesenheit von FADD bewirkt ein Hochregulieren von inflammatorischen Signalwegen bzw. die Anwesenheit von RIPK1 und TRADD gemeinsam ist essentiell für die Signalweiterleitung von inflammatorischen Signalwegen.

Ergebnisse

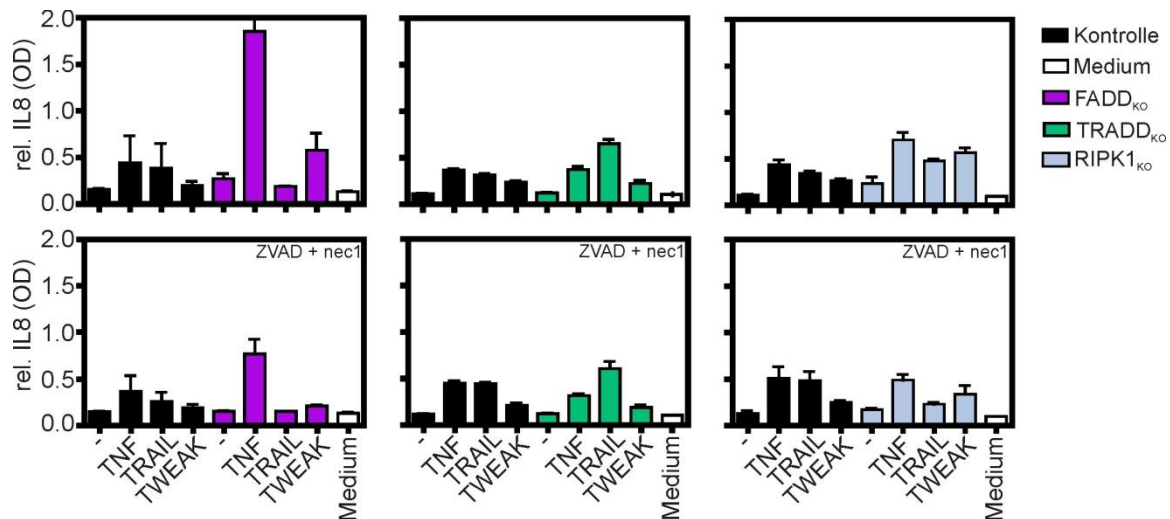


Abbildung 4.2.8 IL-8 Produktion nach TNF-, TRAIL- oder TWEAK-Stimulation von Einzel-DD-Adapterprotein-KO Zellen

Vergleichend untersucht wurden HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle) mit entweder HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}), HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO}) oder HeLa-RIPK3-RIPK1_{KO} (RIP_{KO}) Zellen. Die Zellen wurden 30 min vorweg u.a. mit 20 μ M ZVAD und 90 μ M Necrostatin-1 (nec1) vorinkubiert und anschließend mit TNF, Killer-TRAIL oder TWEAK-Flag (je 100 ng/ml) stimuliert. Am folgenden Tag wurde der IL-8 Gehalt mittels ELISA nachgewiesen.

Zusammenfassend, waren RIPK1_{KO} Zellen vollständig gegen TNFR1- und TRAILR1/2-induzierten Zelltod durch ZVAD-Gabe geschützt und dementsprechend ist RIPK1 essentiell für die TNFR1- / TRAILR1/2-induzierte Nekroptose. Wohingegen das DD-Adapterprotein FADD essentiell für die TNFR1-induzierte Apoptose ist, aber gegenläufig in HeLa-RIPK3 Zellen keine Relevanz für die TRAILR1/2-induzierte Apoptose hat. Im Gegensatz dazu waren in FADD_{KO} Zellen sowohl die TNFR1- als auch die TRAILR1/2-induzierte Aktivierung der Caspasen und damit die Apoptose vollständig unterdrückt. Das Ausschalten von TRADD sensitiviert die TRADD_{KO} Zellen für die TNF/CHX- bzw. TRAIL/CHX-induzierte Nekroptose und Apoptose.

4.3. Doppel-Knockout von TRADD und RIPK1 in HeLa-RIPK3 Zellen

Als Nächstes wurde die Doppel-Knockout-Zelllinie HeLa-RIPK3-TRADD/RIPK1_{DKO} (TRADD/RIPK1_{DKO}) vergleichend mit HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} Zellen und HeLa-RIPK3-RIPK1_{KO} Zellen untersucht (Abb. 4.3.1).

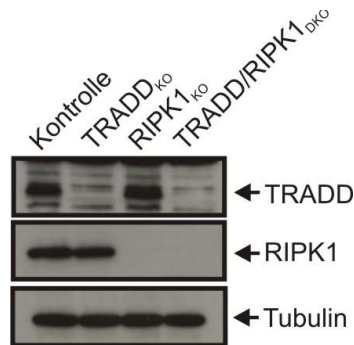


Abbildung 4.3.1 Nachweis des Doppel-Knockouts von TRADD und RIPK1

Bei den Zelllinien HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO}), HeLa-RIPK3-RIPK1_{KO} (RIPK1_{KO}) und HeLa-RIPK3-TRADD/RIPK1_{DKO} (TRADD/RIPK1_{DKO}) wurde mittels Western Blot das erfolgreiche Entfernen von TRADD und RIPK1 überprüft.

TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen wurden mit TRADD_{KO} Zellen und RIPK1_{KO} Zellen mittels Toxizitäts-Assay verglichen. Hierzu wurden die Zelllinien mit CHX in Kombination mit ZVAD, Necrostatin-1, oder beiden Reagenzien inkubiert und anschließend mit TNF oder TRAIL behandelt, um den Effekt des Doppel-Knockouts auf die Apoptose- und Nekroptose-Induktion zu überprüfen (Abb. 4.3.2 und 4.3.3 und Tab. 4.3).

CHX-behandelte Kontrollzellen und TRADD_{KO} Zellen starben sowohl bei Stimulation mit TNF als auch TRAIL an Nekroptose und Apoptose. RIPK1_{KO} Zellen dagegen wiesen nur apoptotisches Zellsterben auf (Abb. 4.3.2). Der Doppel-Knockout von TRADD und RIPK1 in HeLa-RIPK3 Zellen schützte bei jeglicher Stimulationskombination mit TNF fast vollständig vor dem Zellsterben (87-98%). Bei Inkubation mit TRAIL/CHX (12% / 6,7 ng/ml) oder TRAIL/CHX/Necrostatin-1 (12% / 0,9 ng/ml) starben die TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen (Abb. 4.3.2 und 4.3.3 und Tab. 4.3). Die zusätzliche Behandlung mit ZVAD war in beiden Fällen vollständig protektiv (Abb. 4.3.2).

Dies bedeutet, dass TRAIL-stimulierte TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen nur durch Apoptose sterben (Abb. 4.3.2 und 4.3.3 und Tab. 4.3).

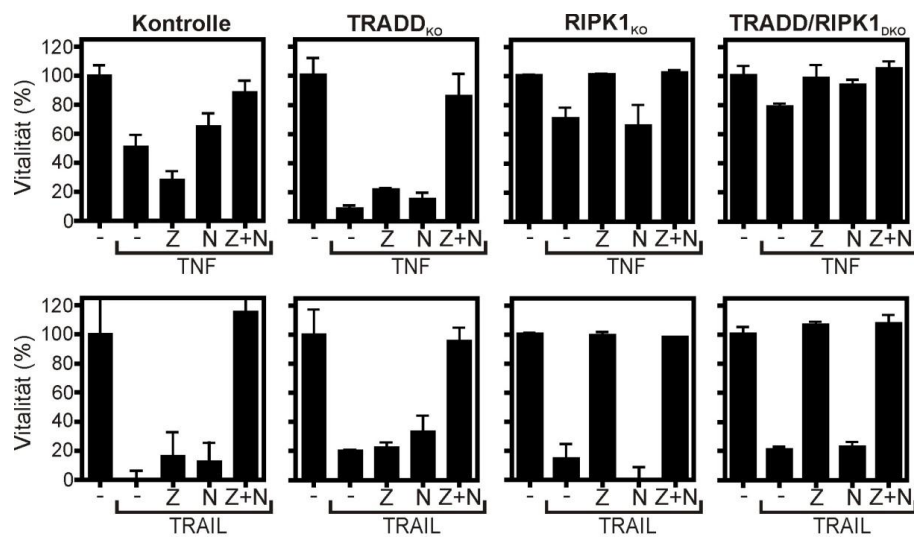


Abbildung 4.3.2 Vitalitätsuntersuchung von TNF- und TRAIL-stimulierten TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen

CHX-sensibilisierte mit TNF- oder TRAIL-stimulierte HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-RIPK1_{KO} (RIPK1_{KO}), HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO}) und HeLa-RIPK3-TRADD/RIPK1_{DKO} (TRADD/RIPK1_{DKO}) Zellen wurden 30 min wie angegeben mit 2,5 µg/ml CHX, 20 µM ZVAD (Z) und 90 µM Necrostatin-1 (N) vorstimuliert und später mit 100 ng/ml TNF oder Killer-TRAIL ü.N. inkubiert. Anschließend wurden die verbleibenden lebenden Zellen mit Kristallviolett quantifiziert und die erhaltenen Messwerte mit GraphPad PRISM 5 ausgewertet.

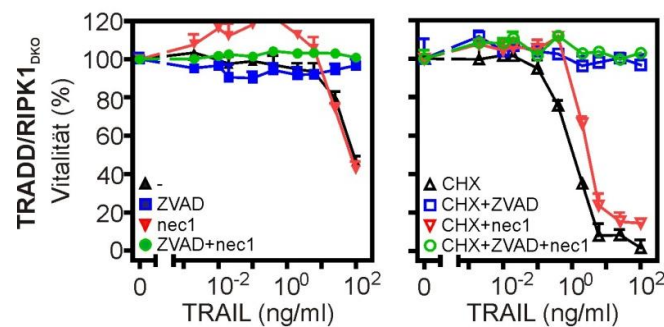


Abbildung 4.3.3 TRAIL-Titration bei TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen

HeLa-RIPK3-TRADD/RIPK1_{DKO} (TRADD/RIPK1_{DKO}) Zellen wurden 30 min vorweg mit den angegebenen Kombinationen an 2,5 µg/ml CHX, 20 µM ZVAD und 90 µM Necrostatin-1 (nec-1) stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 100 ng/ml TRAIL in 4er Titrationsschritten ü.N. inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und gemessen, die Messwerte mit GraphPad PRISM 5 ausgewertet und der EC₅₀ Wert ermittelt.

Tabelle 4.3 EC₅₀ Werte von TRAIL-stimulierten TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen

TRADD/RIPK1 _{DKO}	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	30	97 ± 13	
TNF + Z	18	97 ± 12	
TNF + N	22	94 ± 12	
TNF +ZN	22	92 ± 12	
TNF + C	13	87 ± 18	
TNF + CZ	16	97 ± 13	
TNF + CN	19	90 ± 14	
TNF +CZN	15	98 ± 14	
TRAIL	13	77 ± 20	
TRAIL + Z	12	92 ± 13	
TRAIL + N	9	68 ± 16	
TRAIL + ZN	10	98 ± 9	
TRAIL + C	4	12 ± 13	6,7 ± 12
TRAIL + CZ	8	98 ± 12	
TRAIL + CN	4	12 ± 10	0,9 ± 1,4
TRAIL +CZN	11	97 ± 12	

n= Anzahl der Experimente ; %= Vitalität; EC₅₀= Konzentration bei 50% Vitalität; C= CHX
N= Necrostatin-1 ; Z= ZVAD

TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen erwiesen sich vom TNF/CHX-induziertem Zelltod weitgehend geschützt, aber sie starben an TRAIL/CHX-induzierter Apoptose. Dies könnte darauf hindeuten, dass RIPK1 einen größeren Einfluss auf das Zellüberleben hat als TRADD, da TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen unter den gleichen Stimulationsbedingungen starben wie RIPK1_{KO} Zellen. Dies bestätigt die Annahme, dass RIPK1 unabdingbar für die Nekroptose ist, und TRADD eine eher untergeordnete Rolle bei der Zelltodinduktion spielt (Abb. 4.3.2 und 4.3.3 und Tab. 4.3).

Auf Proteinebene wurde mittels Western Blot Analyse der apoptotische Zelltod bei Kontrollzellen, TRADD_{KO} Zellen, RIPK1_{KO} Zellen und TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen untersucht, indem die verschiedenen Zelllinien mit CHX vorbehandelt und anschließend für 0, 1, 3 oder 6 h mit TNF oder TRAIL stimuliert wurden (Abb. 4.3.4). Bei TNF-stimulierten Kontrollzellen, TRADD_{KO} Zellen und RIPK1_{KO} Zellen wurde über den Stimulationszeitraum Caspase-8, -3, CYLD und PARP gespalten. TNF-stimulierte TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen wiesen keine Prozessierung der genannten Proteine auf. Alle untersuchten Zelllinien ließen bei Stimulation mit TRAIL eine Aktivierung und Spaltung der untersuchten Proteine erkennen (Abb. 4.3.4).

Ergebnisse

Somit bestätigt sich das Ergebnis der Zytotoxizitäts-Experimente, dass der Doppel-*Knockout* von TRADD und RIPK1 in HeLa-RIPK3 Zellen die TNF-, nicht aber die TRAIL-vermittelte Aktivierung der Apoptose verhindert.

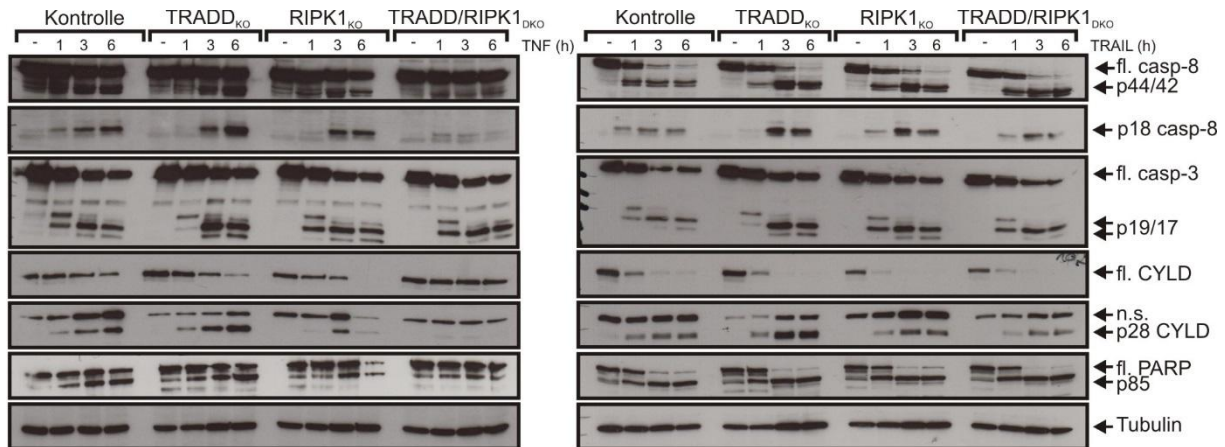


Abbildung 4.3.4 Caspase-Aktivierung nach TNF- und TRAIL-Stimulation in TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen

Caspase-Aktivierung wurde bei HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO}), HeLa-RIPK3-RIPK1_{KO} (RIPK1_{KO}) und HeLa-RIPK3-TRADD/RIPK1_{DKO} (TRADD/RIPK1_{DKO}) Zellen untersucht. Dafür wurden die Zelllinien 30 min vor dem ersten Zeitwert mit 2,5 µg/ml CHX vorbehandelt und anschließend 0, 1, 3 oder 6 h mit 100 ng/ml TNF oder 100 ng/ml Killer-TRAIL stimuliert. Im Anschluss wurden Totalzelllysate hergestellt und mittels Western Blot Analyse die angegebenen Proteine detektiert. n.s. = nicht spezifisch, fl. = *full length* / volle Länge

Mittels Western Blot wurden Kontrollzellen, TRADD_{KO} Zellen, RIPK1_{KO} Zellen und TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen im Hinblick auf die RIPK1-Phosphorylierung überprüft, indem die verschiedenen Zelllinien mit CHX/ZVAD vorbehandelt wurden und anschließend mit TNF oder TRAIL inkubiert wurden.

Kontrollzellen und TRADD_{KO} Zellen reagierten auf TNF- und TRAIL-Stimulation mit RIPK1-Phosphorylierung. Eine geringe RIPK1-Spaltung und damit eine – Prozessierung konnte erkannt werden. Weder RIPK1_{KO} Zellen noch TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen ließen nach Inkubation mit TNF oder TRAIL eine Phosphorylierung von RIPK1 erkennen (Abb. 4.3.5).

Ergebnisse

Diese Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass RIPK1_{KO} Zellen und TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen durch den *Knockout* von RIPK1 vor dem nekroptotischen Zelltod geschützt sind.

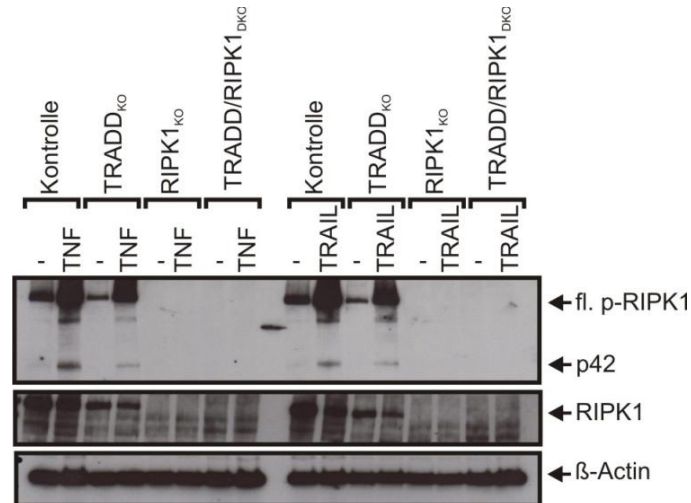


Abbildung 4.3.5 Ausbleibende RIPK1-Phosphorylierung in TNF- oder TRAIL-stimulierten TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen

Die RIPK1-Phosphorylierung wurde bei HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO}), HeLa-RIPK3-RIPK1_{KO} (RIPK1_{KO}) und HeLa-RIPK3-TRADD/RIPK1_{DKO} (TRADD/RIPK1_{DKO}) Zellen untersucht. Nach 30 minütiger Inkubation von 2,5 µg/ml CHX und 20µM ZVAD wurden die Zellen 6 h mit 100 ng/ml TNF oder 100 ng/ml Killer-TRAIL stimuliert, Totalzelllysate angefertigt und mittels Western Blot Analyse die angegebenen Proteine detektiert.

Die Phosphorylierung von IκBα, als Indikator der Aktivierung des klassischen NFκB-Signalwegs, wurde bei Kontrollzellen, TRADD_{KO} Zellen, RIPK1_{KO} Zellen und TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen mittels Western Blot analysiert, indem die verschiedenen Zelllinien mit MLN4924 (Pevonedistat), ein NEDD8 (Neddylin) Aktivierungsenzym (NAE) Inhibitor, vorbehandelt wurden und anschließend für 0, 20 oder 60 min mit TNF oder TRAIL stimuliert wurden (Abb. 4.3.6). MLN4924 verhindert die K48-Ubiquitylierung von phosphoryliertem IκBα und verhindert so dessen Degradation und die NFκB-vermittelte Resynthese des IκBα-Proteins. Dies erleichtert die Interpretation der Analyse der IκBα-Phosphorylierung.

Nach Inkubation mit TNF oder TRAIL ließen Kontrollzellen, TRADD_{KO} Zellen und RIPK1_{KO} Zellen eine verstärkte Phosphorylierung von IκBα und somit eine

Ergebnisse

Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges erkennen. TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen zeigten weder einen Anstieg des I κ B α -Proteinlevels noch deren Phosphorylierung unabhängig ob die Zelllinien mit TNF oder TRAIL behandelt wurden (Abb. 4.3.6).

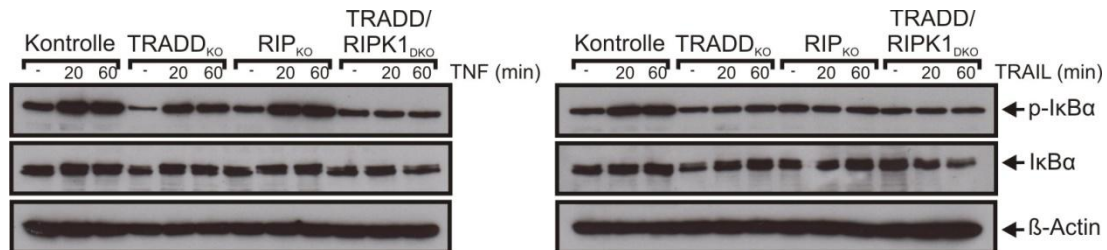


Abbildung 4.3.6 NF κ B-Signalweg-Aktivierung bei TRADD_{KO} Zellen und RIPK1_{KO} Zellen

HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO}), HeLa-RIPK3-RIPK1_{KO} (RIPK1_{KO}) und HeLa-RIPK3-TRADD/RIPK1_{DKO} (TRADD/RIPK1_{DKO}) Zellen wurden mittels Western Blot untersucht, indem die Zelllinien 15 min vor jedem Zeitwert mit 20 μ M MLN4924 vorbehandelt und für 0, 20 oder 60 min mit 100 ng/ml TNF oder 100 ng/ml TRAIL inkubiert wurden. Im Anschluss wurden Totalzelllysate erstellt.

Mittels ELISA wurde weiterhin untersucht, ob durch Stimulation mit TNF, TRAIL oder TWEAK in Kombination mit und ohne ZVAD und Necrostatin-1 (ZVAD + nec-1) in TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen das NF κ B-Zielgen IL-8 noch induziert wird (Abb. 4.3.7).

TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen produzierten weniger IL-8 unabhängig davon, ob sie mit TNF, TRAIL oder TWEAK stimuliert worden waren (ca. 0.5 OD) (Abb. 4.3.7).

Weitestgehend unabhängig von der Apoptose- oder Nekroptose-Induktion war die IL-8 Produktion ohne TRADD und RIPK1 kaum vorhanden. Nur mit TRAIL zeigte sich eine geringe Induktion, die aber durch ZVAD + nec-1 inhibiert wurde. Dies spricht dafür, dass diese geringe IL8-Induktion ein sekundärer Effekt des Zelltodes ist und nicht eine direkte Wirkung der unmittelbaren TRAIL Signaltransduktion. TRADD und RIPK1 sind zusammen essentiell für die Aktivierung von proinflammatorischen Signalwegen.

Ergebnisse

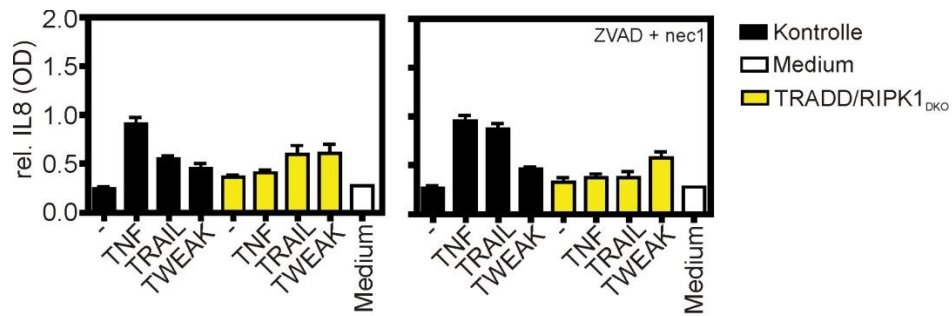


Abbildung 4.3.7 Verringerte IL-8 Produktion von stimulierten TRADD/RIPK1_{DKO} Zellen

IL-8 Produktion von HeLa-RIPK3-TRADD/RIPK1_{DKO} (TRADD/RIPK1_{DKO}) Zellen und von HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle) Zellen wurde mittels ELISA gemessen und der IL-8 Gehalt der beiden Zelllinien miteinander verglichen. Die Zellen wurden 30 min u.a. mit 20 µM ZVAD und 90 µM Necrostatin-1 (ZVAD + nec1) vorinkubiert und anschließend mit TNF, Killer-TRAIL oder TWEAK-Flag (je 100 ng/ml) stimuliert.

4.4. Doppel-Knockout von FADD in Kombination mit TRADD oder RIPK1 in HeLa-RIPK3 Zellen

Die Doppel-KO -Zelllinien HeLa-RIPK3-FADD/RIPK1_{DKO} (FADD/RIPK1_{DKO}) und HeLa-RIPK3-FADD/TRADD_{DKO} (FADD/TRADD_{DKO}) wurden mit HeLa-RIPK3-Kontrolle und den Einzel-KO Zelllinien HeLa-RIPK3-FADD_{KO}, HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} und HeLa-RIPK3-RIPK1_{KO} verglichen inwieweit diese an TNF- oder TRAIL-induziertem apoptotischen und / oder nekroptotischen Zelltod sterben können (Abb. 4.4.1).

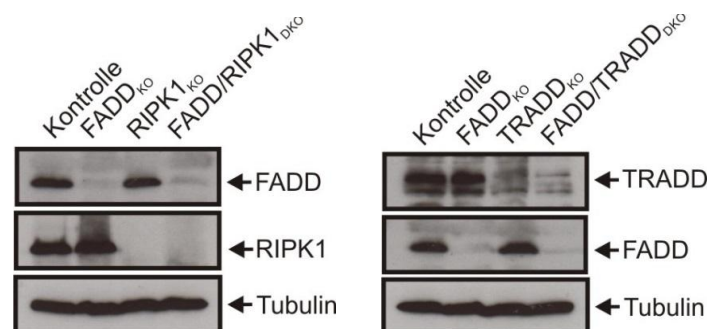


Abbildung 4.4.1 Nachweis des Doppel-Knockouts von FADD und RIPK1 in FADD/RIPK1_{DKO} Zellen und von FADD und TRADD in FADD/TRADD_{DKO} Zellen

Auf der linken Seite wurden die Zelllinien HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}), HeLa-RIPK3-RIPK1_{KO} (RIPK1_{KO}) und HeLa-RIPK3-FADD/RIPK1_{DKO}

Ergebnisse

(FADD/RIPK1_{DKO}), und auf der rechten Seite wurden HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}), HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO}) und HeLa-RIPK3-FADD/TRADD_{DKO} (FADD/TRADD_{DKO}) untersucht. Mittels Western-Blot-Analyse wurde der Doppel-Knockout von FADD + RIPK1 und FADD + TRADD in den HeLa-RIPK3 Zellen deutlich gemacht.

Ein direkter Vergleich wurde zwischen FADD/RIPK1_{DKO} Zellen und FADD/TRADD_{DKO} Zellen im Toxizitäts-Assay angestellt, indem die Zelllinien mit CHX, ZVAD und Necrostatin-1 vorbehandelt und mit TNF oder TRAIL stimuliert wurden.

FADD/RIPK1_{DKO} Zellen zeigten keine Zelltodinduktion, egal ob die Zellen mit TNF/CHX oder TRAIL/CHX inkubiert wurden oder zusätzlich ZVAD oder Necrostatin-1 hinzugegeben wurde (87 - 100 %). FADD/TRADD_{DKO} Zellen wiesen bei Gabe von TNF/CHX unabhängig von ZVAD eine hohe Anzahl an toten Zellen auf (6- 11% / 0,04 - 0,3 ng/ml). Die TRAIL/CHX-Stimulation beeinflusste geringfügig die Zellvitalität der FADD/TRADD_{DKO} Zellen (72 %) (Abb. 4.4.2 und 4.4.3 und Tab. 4.4).

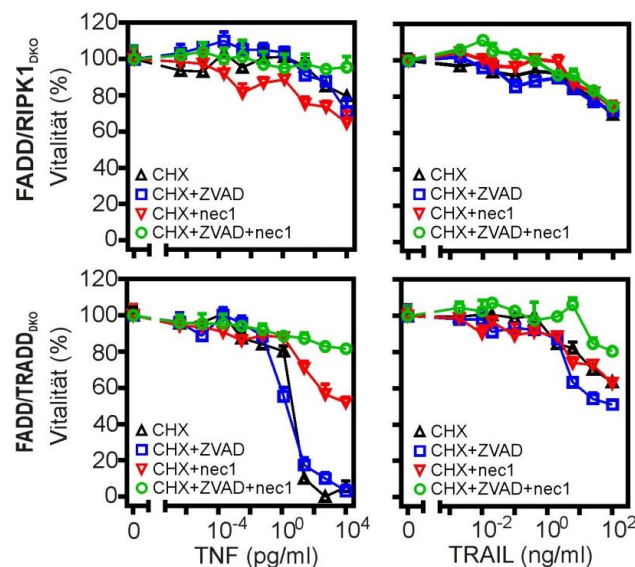


Abbildung 4.4.2 Kein Zellsterben von TNF- und TRAIL-stimulierten FADD/RIPK1_{DKO} Zellen und Zelltodinduktion in TNF/CHX-stimulierten FADD/TRADD_{DKO} Zellen

CHX-sensitivierte mit TNF oder TRAIL stimulierte HeLa-RIPK3-FADD/RIPK1_{DKO} (FADD/RIPK1_{DKO}) Zellen und HeLa-RIPK3-FADD/TRADD_{DKO} (FADD/TRADD_{DKO}) Zellen wurden mit den angegebenen Kombinationen an 2,5 µg/ml CHX, 20 µM ZVAD und 90 µM Necrostatin-1 (nec1) inkubiert und nach 30 min mit 100 ng/ml TNF in 20er Titrationschritten oder 100 ng/ml Killer-TRAIL in 4er Titrationschritten ü.N. stimuliert. Anschließend wurden

Ergebnisse

die verbleibenden lebenden Zellen mit Kristallviolett quantifiziert und die erhaltenen Messwerte mit GraphPad PRISM 5 ausgewertet.

Tabelle 4.4 Zellvitalität von FADD/RIPK1_{DKO} Zellen und FADD/TRADD_{DKO} Zellen sowie EC₅₀ Werte von stimulierten FADD/TRADD_{DKO} Zellen

	FADD/RIPK1 _{DKO}			FADD/TRADD _{DKO}		
	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	19	100 ± 13		16	89 ± 15	
TNF + Z	17	100 ± 10		12	84 ± 11	
TNF + N	15	95 ± 8		17	90 ± 18	
TNF + ZN	15	97 ± 14		16	98 ± 15	
TNF + C	11	94 ± 13		4	6 ± 9	0,3 ± 0,5
TNF + CZ	15	92 ± 13		4	11 ± 20	0,04 ± 0,06
TNF + CN	12	90 ± 16		8	68 ± 20	
TNF + CZN	11	98 ± 13		11	94 ± 13	
TRAIL	12	99 ± 9		10	81 ± 13	
TRAIL + Z	16	98 ± 16		11	76 ± 19	
TRAIL + N	16	92 ± 11		10	77 ± 22	
TRAIL + ZN	19	96 ± 10		15	95 ± 13	
TRAIL + C	14	87 ± 26		9	72 ± 21	
TRAIL + CZ	11	88 ± 16		5	95 ± 14	
TRAIL + CN	12	87 ± 16		7	75 ± 23	
TRAIL + CZN	10	95 ± 7		10	93 ± 12	

n= Anzahl der Experimente ; %= Vitalität; EC₅₀= Konzentration bei 50% Vitalität; C= CHX
N= Necrostatin-1 ; Z= ZVAD

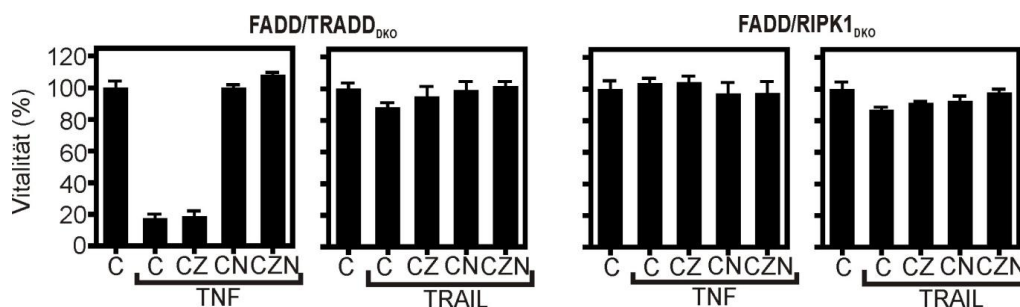


Abbildung 4.4.3 Toxizitäts-Assay von TNF- und TRAIL-stimulierten FADD/RIPK1_{DKO} Zellen und FADD/TRADD_{DKO} Zellen

CHX-sensibilisierte mit TNF oder TRAIL stimulierte HeLa-RIPK3-FADD/RIPK1_{DKO} (FADD/RIPK1_{DKO}) Zellen und HeLa-RIPK3-FADD/TRADD_{DKO} (FADD/TRADD_{DKO}) Zellen wurden wie angegeben mit 2,5 µg/ml CHX (C), 20 µM ZVAD (Z) und 90 µM Necrostatin-1 (N) inkubiert und nach 30 min mit 100 ng/ml TNF oder Killer-TRAIL als Triplikate ü.N. stimuliert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt, gemessen und die Messwerte ausgewertet.

Ergebnisse

FADD/RIPK1_{DKO} Zellen ließen keinerlei Zelltodinduktion erkennen und waren demzufolge vor Apoptose und Nekroptose geschützt. Dies bekräftigt die vorhergehenden Ergebnisse, bei denen FADD notwendig für die Apoptose-Induktion und RIPK1 essentiell für die Nekroptose-Aktivierung ist.

Dagegen starben FADD/TRADD_{DKO} Zellen bei Stimulation mit TNF/CHX und konnten durch Necrostatin-1 Zugabe vor dem Zelltod geschützt werden. RIPK1 ist ausreichend für die TNF-induzierte Nekroptose.

Mittels Western Blot wurde des Weiteren die Aktivierung von Caspasen in HeLa-RIPK3-FADD/RIPK1_{DKO} und HeLa-RIPK3-FADD/TRADD_{DKO} untersucht. Dafür wurden die Zellen mit CHX vorbehandelt und anschließend mit TNF oder TRAIL stimuliert (Abb. 4.4.4 und 4.4.5).

FADD/RIPK1_{DKO} Zellen wurden mit Kontrollzellen, FADD_{KO} Zellen und RIPK1_{KO} Zellen verglichen. Nur Kontrollzellen und RIPK1_{KO} Zellen zeigten bei Verabreichung von TNF/CHX bzw. TRAIL/CHX eine Spaltung von Caspase-8, -3, CYLD und PARP (Abb. 4.4.4). Sowohl TNF- und TRAIL-stimulierte FADD_{KO} Zellen als auch FADD/RIPK1_{DKO} Zellen wiesen hingegen keine Prozessierung der genannten Proteine auf (Abb. 4.4.4). Somit bestätigten diese Western Blot Experimente die Befunde der Zytotoxizitäts-Experimente (Abb. 4.4.2, 4.4.3, 4.2.2 und 4.2.3).

Im Western Blot wurden FADD/TRADD_{DKO} Zellen mit Kontrollzellen, FADD_{KO} Zellen und TRADD_{KO} Zellen verglichen. Hierzu wurden die Zellen mit CHX vorbehandelt und anschließend mit TNF oder TRAIL stimuliert.

Bei Kontrollzellen und TRADD_{KO} Zellen war eine Spaltung von Caspase-8, -3, CYLD und PARP bei 1, 3 und 6 h nach Inkubation mit TNF/CHX oder TRAIL/CHX zu erkennen. TNF/CHX- und TRAIL/CHX-behandelte FADD_{KO} Zellen zeigten wie bereits gezeigt (Abb. 4.4.2 und 4.4.3 und Tab. 4.4) keine Spaltung der untersuchten Proteine. TNF/CHX-stimulierte FADD/TRADD_{DKO} Zellen hingegen ließen nach 3 und 6 h eine Caspase-Aktivierung (Caspase-8-, -3-, CYLD- und PARP-Spaltung) erkennen. Bei TRAIL/CHX-inkubierten FADD/TRADD_{DKO} Zellen zeigte sich eine geringe Spaltung von Caspase-8, Caspase-3 und PARP (Abb. 4.4.5).

TRADD hat somit einen inhibitorischen Effekt auf einen FADD-unabhängigen Apoptoseinduktions-Weg.

Ergebnisse

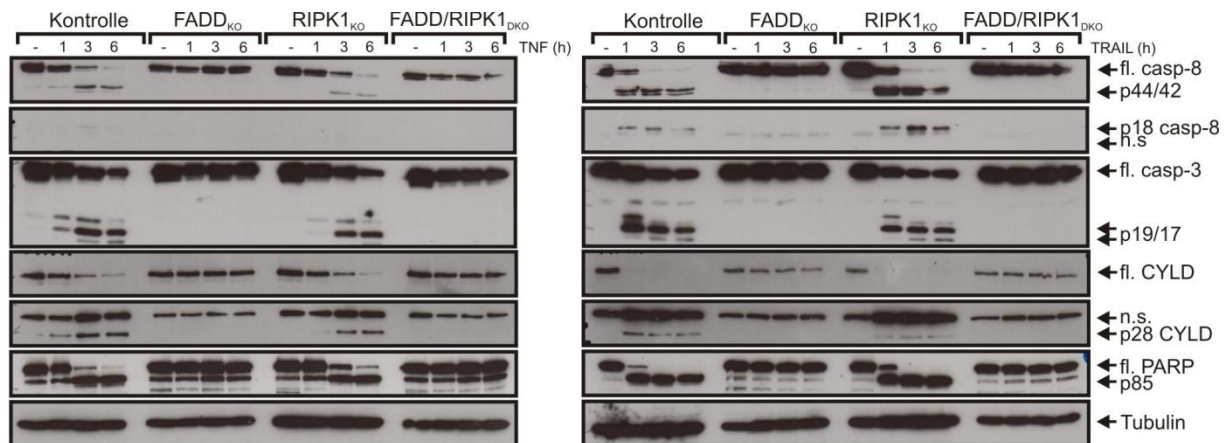


Abbildung 4.4.4 Keine Caspase-Aktivierung nach TNF- oder TRAIL-Stimulation in FADD/RIPK1_{DKO} Zellen

Caspase-Aktivierung wurde nach Stimulation mit TNF bzw. Killer-TRAIL (100 ng/ml) für 0, 1, 3 oder 6 h bei HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}), HeLa-RIPK3-RIPK1_{KO} (RIPK1_{KO}) und HeLa-RIPK3-FADD/RIPK1_{DKO} (FADD/RIPK1_{DKO}) Zellen untersucht. Vor der Inkubation mit TNF oder TRAIL wurden die Zellen 30 min vor dem ersten Zeitwert mit 2,5 µg/ml CHX vorbehandelt. Daraufhin wurden Totalzelllysate hergestellt und mittels Western Blot Analyse die angegebenen Proteine überprüft. n.s. = nicht spezifisch, fl. = *full length* / volle Länge

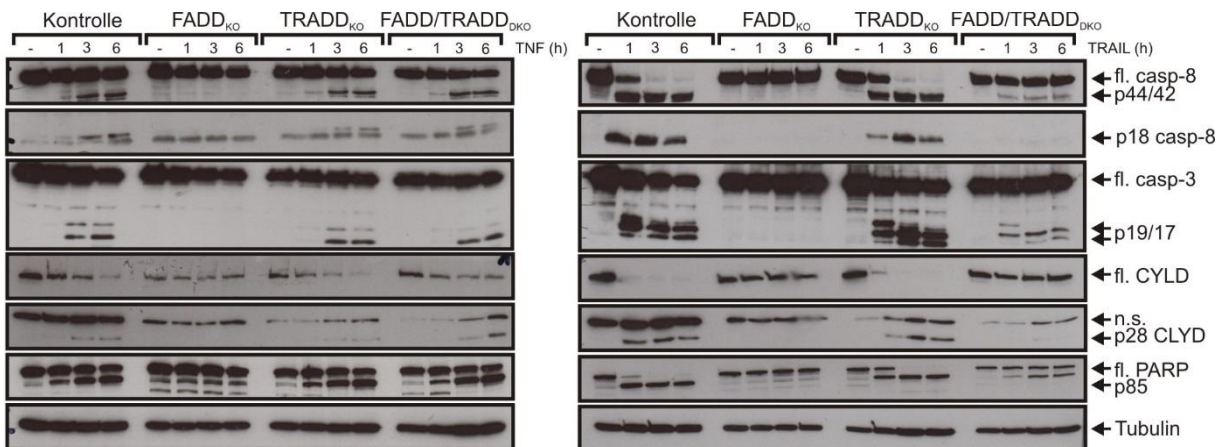


Abbildung 4.4.5 Caspase-Aktivierung in TNF-stimulierten FADD/TRADD_{DKO} Zellen

Caspase-Aktivierung wurde durch Stimulation mit TNF bzw. Killer-TRAIL (100 ng/ml) für 0, 1, 3 oder 6 h bei HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}), HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO}) und HeLa-RIPK3-FADD/TRADD_{DKO} (FADD/TRADD_{DKO}) Zellen untersucht. Vor der TNF- oder TRAIL-Inkubation wurden die Zellen 30 min vorher mit 2,5 µg/ml CHX vorbehandelt. Nach Ablauf der Zeit wurden Totalzelllysate hergestellt und mittels Western Blot Analyse die angegebenen Proteine untersucht. n.s. = nicht spezifisch, fl. = *full length* / volle Länge

Ergebnisse

Mittels ELISA wurden FADD/RIPK1_{DKO} Zellen und FADD/TRADD_{DKO} Zellen vergleichend bezüglich der Todesrezeptor-induzierten proinflammatorischen Aktivität untersucht. Dazu wurde die Menge an IL-8 nach Stimulation mit TNF, TRAIL oder TWEAK in Kombination mit und ohne ZVAD + nec1 analysiert (Abb. 4.4.6).

Bei FADD/TRADD_{DKO} Zellen war durch die Inkubation mit TNF, TRAIL und TWEAK die IL-8 Menge erhöht (0.5 - 1.3 OD). FADD/RIPK1_{DKO} Zellen exprimierten eine leicht erhöhte Menge an IL-8 zu den Kontrollzellen (ca. 0.5 OD). Wenn FADD/TRADD_{DKO} Zellen und FADD/RIPK1_{DKO} Zellen zusätzlich mit ZVAD + nec1 stimuliert wurden, führte nur eine TNF- oder TWEAK-Stimulation zu einer erhöhten IL-8 Produktion. Im Vergleich mit den Kontrollzellen zeigten TRAIL-stimulierte FADD/TRADD_{DKO} Zellen und FADD/RIPK1_{DKO} Zellen eine Reduktion an IL-8 (Abb 4.4.6).

Bei Untersuchung bezüglich der Todesrezeptor-induzierten proinflammatorischen Aktivität zeigte sich, dass durch FADD-Knockout bei FADD/TRADD_{DKO} Zellen und FADD/RIPK1_{DKO} Zellen TRADD oder RIPK1 alleine ausreichend sind um TNF-induzierte inflammatorische Signalwege zu aktivieren. Für die TRAIL-induzierte - Aktivierung reicht TRADD bzw. RIPK1 nicht aus, da FADD essentiell ist.

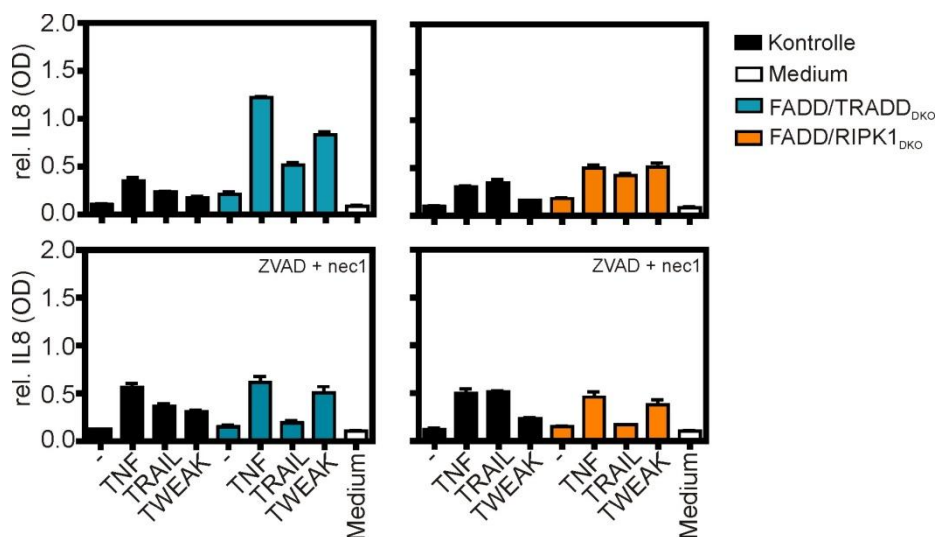


Abbildung 4.4.6 IL-8-Induktion bei TNF-, TRAIL- und TWEAK-stimulierten FADD/TRADD_{DKO} Zellen und FADD/RIPK1_{DKO} Zellen

Mittels ELISA wurde die IL-8 Menge bei HeLa-RIPK3-FADD/TRADD_{DKO} (FADD/TRADD_{DKO}) Zellen bzw. HeLa-RIPK3-FADD/RIPK1_{DKO} (FADD/RIPK1_{DKO}) Zellen im Vergleich mit HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle) Zellen ermittelt. 30 min wurden die Zellen u.a. mit 20 μ M ZVAD und 90 μ M Necrostatin-1 (ZVAD + nec1) vorinkubiert und später mit TNF, Killer-TRAIL oder TWEAK-Flag (je 100 ng/ml) stimuliert und am Folgetag mittels ELISA analysiert.

Ergebnisse

Der *Knockout* von FADD + RIPK1 schützt die Zelle vor dem zytotoxischen Effekt von TNF und TRAIL. In FADD/TRADD_{DKO} Zellen löste RIPK1 infolge von TNFR1-Aktivierung Nekroptose aus und setzte zusätzlich inflammatorische Signalwege in Gang. Die Apoptose konnte wiederum durch die inhibierende Wirkung von TRADD auf FADD bei der TNFR1-Signaltransduktion aktiviert werden.

4.5. Einfluss von FADD und Caspase-8 auf die Nekroptose

HeLa-RIPK3-casp-8_{KO} (casp-8_{KO}) Zellen und HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}) Zellen wurden auf die Fähigkeit hin untersucht an TNF- oder TRAIL-induziertem nekroptotischem Zelltod sterben zu können (Abb. 4.5.1).

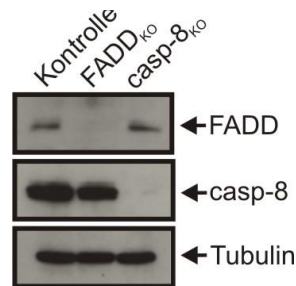


Abbildung 4.5.1 Nachweis des *Knockouts* von FADD und Caspase-8

Die Expression von FADD und Caspase-8 wurde in den Zelllinien HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}) und HeLa-RIPK3-casp-8_{KO} (casp-8_{KO}) mittels Western Blot untersucht.

Für den Toxizitäts-Assay wurden casp-8_{KO} Zellen und FADD_{KO} Zellen mit CHX, ZVAD (Z) und Necrostatin-1 (N) in allen vorher untersuchten Kombinationen vorstimuliert und anschließend mit TNF oder TRAIL inkubiert (Abb. 4.5.2).

TRAIL-stimulierte FADD_{KO} Zellen zeigten unabhängig von der Zugabe von CHX keine Zelltodinduktion. Unabhängig von CHX-Zugabe induzierte TNF in FADD_{KO} Zellen stark Nekroptose (10 – 25 % / 0.04 – 2 ng/ml) (Abb. 4.5.2, 4.2.2 und 4.2.3 und Tab. 4.2). TNF-stimulierte casp-8_{KO} Zellen zeigten kein Zellsterben. Wurden die Zellen jedoch mit TNF/CHX inkubiert, zeigte sich unabhängig von der zusätzlichen Gabe an ZVAD eine Reduktion lebender Zellen (62 %). TRAIL- und TRAIL/CHX-stimulierte casp-8_{KO} Zellen wiesen eine Zelltodinduktion auf, egal ob diese mit oder ohne ZVAD vorbehandelt wurden (Tab. 4.5). Sowohl bei FADD_{KO} Zellen als auch bei

Ergebnisse

casp-8_{KO} Zellen hatte ZVAD auf den TNF- oder TRAIL-induzierten Zelltod keinen Einfluss (Abb. 4.5.2). Es wurde dementsprechend nur der nekroptotische Zelltod induziert.

Tabelle 4.5 TNF- und TRAIL-induzierter Zelltod in casp-8_{KO} Zellen

casp-8 _{KO}	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	14	89 ± 11	
TNF + Z	17	91 ± 14	
TNF + N	12	98 ± 10	
TNF +ZN	12	100 ± 10	
TNF + C	16	62 ± 14	
TNF + CZ	12	63 ± 11	
TNF + CN	15	98 ± 12	
TNF +CZN	15	96 ± 14	
TRAIL	15	86 ± 15	
TRAIL + Z	13	77 ± 24	
TRAIL + N	10	99 ± 6	
TRAIL + ZN	9	100 ± 6	
TRAIL + C	13	65 ± 11	
TRAIL + CZ	8	62 ± 7	
TRAIL + CN	13	92 ± 16	
TRAIL +CZN	10	97 ± 12	

n= Anzahl der Experimente ; %= Vitalität; EC₅₀= Konzentration bei 50% Vitalität; C= CHX
N= Necrostatin-1 ; Z= ZVAD

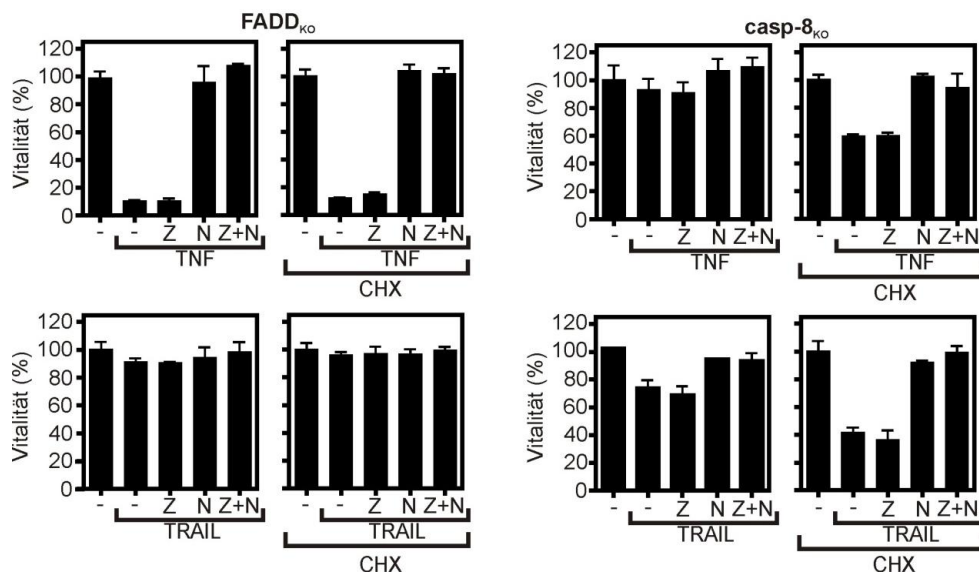


Abbildung 4.5.2 TNF- und TRAIL-induzierter Zelltod in casp-8_{KO} Zellen und TNF-induzierter Zelltod in FADD_{KO} Zellen

HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}) und HeLa-RIPK3-casp-8_{KO} (casp-8_{KO}) Zellen wurden als Triplikate in den angegebenen Kombinationen mit 2,5 µg/ml CHX, 20 µM ZVAD (Z) und 90

Ergebnisse

μ M Necrostatin-1 (N) 30 min vorstimuliert und anschließend mit 100 ng/ml TNF oder Killer-TRAIL ü.N. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt, gemessen, die Messwerte mit GraphPad PRISM 5 ausgewertet und mit Corel DRAW X4 graphisch dargestellt.

FADD_{KO} Zellen und casp-8_{KO} Zellen wurden weiterhin mittels Western Blot Analyse bezüglich der Prozessierung von Caspasen untersucht. Dafür wurden die Zellen mit CHX vorbehandelt und anschließend für 0, 4 und 8 h mit TNF oder TRAIL stimuliert (Abb. 4.5.3).

Nach TNF/CHX- und TRAIL/CHX-Stimulation zeigten nur Kontrollzellen eine Spaltung von Caspase-8, -3, RIPK1 und PARP (Abb. 4.5.3). Die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Experimente werden somit bestätigt (Abb. 4.5.2 und Tab. 4.5), nämlich dass nach Deletion von FADD oder Caspase-8 HeLa-RIPK3 Zellen nicht mehr durch Apoptose sterben können.

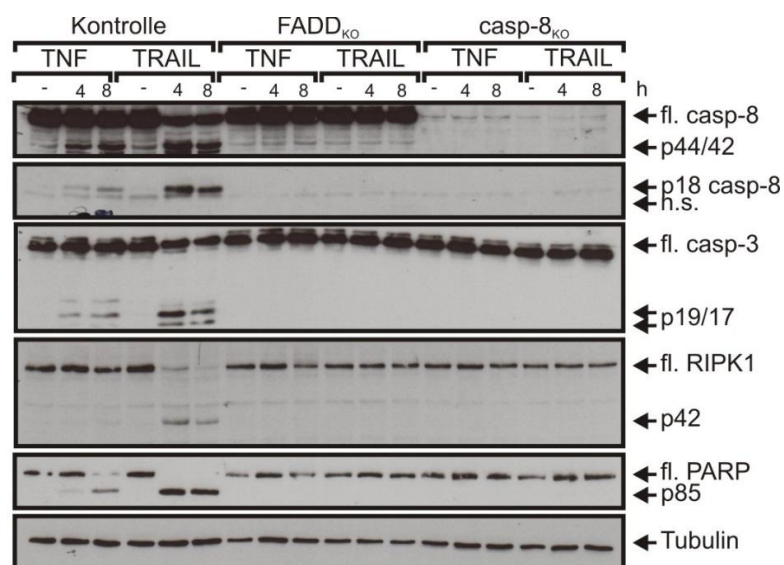


Abbildung 4.5.3 Untersuchung der TNF- und TRAIL-induzierten Caspase-Aktivierung in FADD_{KO} Zellen und casp-8_{KO} Zellen

Die Zelllinien HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}) und HeLa-RIPK3-casp-8_{KO} (casp-8_{KO}) wurden 30 min mit 2,5 μ g/ml CHX vorstimuliert und anschließend 0, 4 oder 8 h mit 100 ng/ml TNF oder Killer-TRAIL inkubiert. Darauf folgend wurden Totalzelllysate hergestellt und mittels Western Blot Analyse die Expression der angegebenen Proteine untersucht. n.s. = nicht spezifisch, fl. = *full length* / volle Länge

Ergebnisse

Durch den *Knockout* von FADD oder Caspase-8 können die HeLa-RIPK3 Zellen nicht mehr durch Apoptose sterben. Die mögliche Nekroptose-Induktion wurde mittels Western Blot Analyse bezüglich der RIPK1-Phosphorylierung untersucht (Abb. 4.5.4). Kontrollzellen zeigten nach TNF-Zugabe keine RIPK1-Phosphorylierung. TRAIL-stimulierte Kontrollzellen ließen einen Anstieg an p-RIPK1 erkennen. TNF-stimulierte FADD_{KO} Zellen wiesen über den Stimulationszeitraum eine starke Zunahme von p-RIPK1 auf. Bei TRAIL-stimulierten casp-8_{KO} Zellen konnte eine geringe Phosphorylierung von RIPK1 detektiert werden (Abb. 4.5.4).

Diese Ergebnisse bekräftigen, dass FADD_{KO} Zellen nach TNFR1-Aktivierung eine starke Nekroptose-Induktion zeigen, wohingegen casp-8_{KO} Zellen, weniger stark als FADD_{KO} Zellen, TNF- und TRAIL-induzierte Nekroptose zeigen.

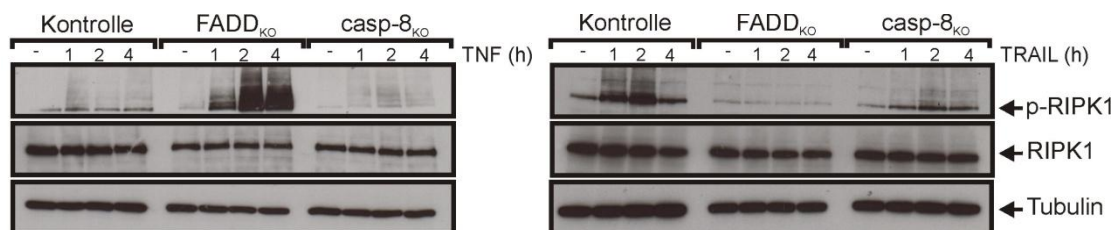


Abbildung 4.5.4 TNF- und TRAIL-induzierte RIPK1-Phosphorylierung in FADD_{KO} Zellen und casp-8_{KO} Zellen

Die Zelllinien HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}) und HeLa-RIPK3-casp-8_{KO} (casp-8_{KO}) wurden 0, 1, 2 oder 4 h mit 100 ng/ml TNF oder Killer-TRAIL stimuliert. Nach Ablauf der Zeit wurden Totalzelllysate angefertigt und mittels Western Blot Analyse die angegebenen Proteine nachgewiesen.

Abschließend wurde mittels ELISA die TNF-, TRAIL- und TWEAK-induzierte Produktion des NFκB-Zielgens IL-8 in FADD_{KO} Zellen und casp-8_{KO} Zellen untersucht (Abb. 4.5.5).

Verglichen mit den Kontrollzellen zeigten TNF-stimulierte FADD_{KO} Zellen und casp-8_{KO} Zellen einen starken Anstieg von IL-8 (ca. 2 OD). Im Gegensatz zu FADD_{KO} Zellen war bei casp-8_{KO} Zellen auch bei Zugabe von TRAIL (1,5 OD) oder TWEAK (1 OD) der IL-8 Gehalt erhöht. Trotz der Vorbehandlung mit ZVAD und Necrostatin-1, und der damit verbundenen Blockierung der Zelltod-Induktion, war mehr IL-8 bei TNF-stimulierten FADD_{KO} Zellen und casp-8_{KO} Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen vorhanden (ca. 1 OD) (Abb. 4.5.5).

Ergebnisse

Hervorzuheben ist, dass protektierte Zellen (ZVAD+nec1) kein IL-8 nach TRAIL-Stimulation mehr induzierten. FADD und Caspase-8 scheinen daher für die TRAIL-induzierte NF κ B-Signaltransduktion essentiell zu sein.

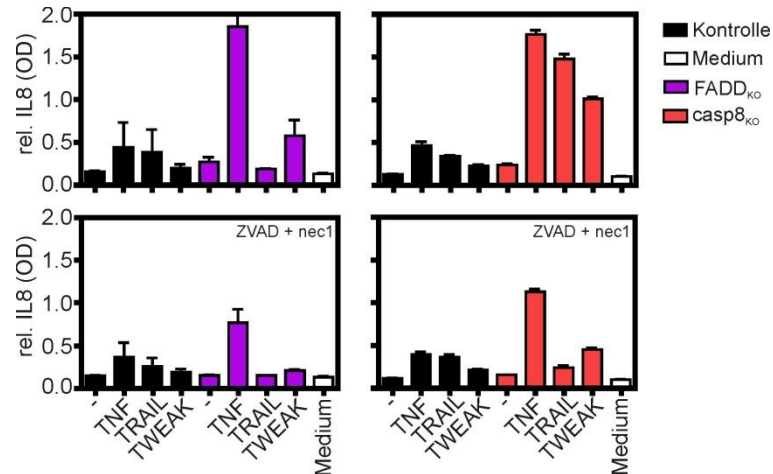


Abbildung 4.5.5 TNF- und TRAIL-induzierte IL-8 Produktion in FADD_{ko} Zellen und casp-8_{ko} Zellen

Mittels ELISA wurde die IL-8 Menge von HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-FADD_{ko} (FADD_{ko}) und HeLa-RIPK3-casp-8_{ko} (casp-8_{ko}) ermittelt. 30 min wurden die Zellen u.a. mit 20 μ M ZVAD und 90 μ M Necrostatin-1 (ZVAD + nec1) vorinkubiert und später mit TNF, Killer-TRAIL oder TWEAK-Flag (je 100 ng/ml) stimuliert und anschließend der IL-8 Gehalt gemessen.

4.6. TWEAK verstärkt TNF- und TRAIL-induzierte Nekroptose

Als Nächstes wurde die Frage untersucht, inwiefern TWEAK den TNF- oder TRAIL-induzierten Zelltod beeinflusst.

Dafür wurden Kontrollzellen, TRADD_{ko} Zellen, casp-8_{ko} Zellen und FADD_{ko} Zellen wie angegeben mit TWEAK, CHX und ZVAD vorinkubiert und anschließend mit TNF oder TRAIL stimuliert (Abb. 4.6.1).

Es zeigte sich, dass die zusätzliche Verabreichung von TWEAK/ZVAD den TNF-induzierten Zelltod bei Kontrollzellen deutlich verstärkte (11 % / 0,004 ng/ml). Jegliche untersuchte Kombination mit TWEAK/CHX führte in TNF-stimulierten Kontrollzellen zum Zelltod (3 - 22 % / 0,03 - 0,2 ng/ml). Wurden die Kontrollzellen jedoch mit TRAIL stimuliert, starben die Zellen nur bei der zusätzlichen

Ergebnisse

Gabe von CHX und / oder TWEAK (7 - 28 % / 1,1 - 4 ng/ml). Ebenso wurde der Zelltod bei den TWEAK-vorbehandelten TNF- oder TRAIL-stimulierten TRADD_{KO} Zellen induziert (1 - 21 % / 0,002 - 12 ng/ml). Ähnliches zeigte sich auch bei der TNF-Stimulation von casp-8_{KO} Zellen und FADD_{KO} Zellen. Diese starben, wenn TWEAK zugegeben wurde (4 - 19 % / 0,00001 - 0,01 ng/ml). Im Gegensatz zu den FADD_{KO} Zellen starben casp-8_{KO} Zellen unabhängig von ZVAD bei der kombinierten Stimulation von TRAIL mit TWEAK (11 - 19 % / 3 - 6 ng/ml) (Abb. 4.6.1 und Tab. 4.6).

Sowohl der TNF-induzierte Zelltod als auch die TRAIL-induzierte Nekroptose werden durch Zugabe von TWEAK verstärkt. D.h. durch Zugabe von TWEAK wird eine geringere Konzentration an TNF oder TRAIL für die Zelltod-Induktion benötigt.

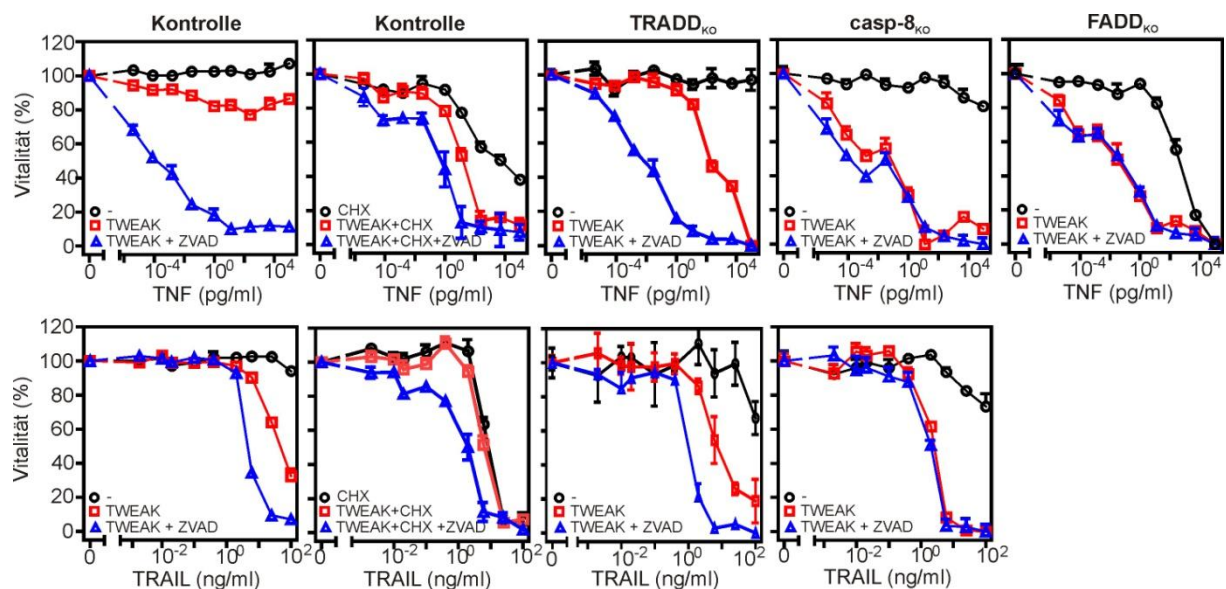


Abbildung 4.6.1 TWEAK verstärkt die TNF- und TRAIL- induzierte Nekroptose

Die Zelllinien HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle), HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO}), HeLa-RIPK3-casp-8_{KO} (casp-8_{KO}) und HeLa-RIPK3-FADD_{KO} (FADD_{KO}) wurden mit TNF (100 ng/ml in 20er) und TRAIL (100 ng/ml in 4er) stimuliert. 30 min zuvor wurden die Zellen wie angegeben mit 2,5 µg/ml CHX, 100 ng/ml TWEAK-Flag und 20 µM ZVAD vorbehandelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt.

Neben den Kontrollzellen, TRADD_{KO} Zellen, casp-8_{KO} Zellen und FADD_{KO} Zellen wurden auch die zuvor genannten HeLa-RIPK3 Varianten, mit TWEAK vorstimuliert und mit TNF und TRAIL inkubiert, untersucht (Tab. 4.6).

Ergebnisse

Ohne auf die einzelnen HeLa-RIPK3 Varianten einzugehen, kann generell festgestellt werden, dass beim direkten Vergleich der verschiedenen Zelllinien durch die zusätzliche Stimulation mit TWEAK das TNF- und TRAIL-induzierte Zellsterben deutlich verstärkt wird. (Tab. 4.2 - 4.6, siehe auch Anhang Tab. 9.1.1 und 9.1.2).

Tabelle 4.6 EC₅₀ Werte von TWEAK-vorinkubierten TNF- und TRAIL-stimulierten Zellen

Kontrolle	-			TWEAK		
	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	45	94 ± 21		10	74 ± 26	
TNF + Z	39	98 ± 15		4	11 ± 9	0,0004 ± 0,0008
TNF + N	29	97 ± 12		20	75 ± 28	
TNF + ZN	35	96 ± 15		12	101 ± 8	
TNF + C	9	24 ± 20	2,5 ± 3,9	8	9 ± 12	0,03 ± 0,03
TNF + CZ	4	19 ± 10	1,3 ± 2,6	4	22 ± 23	0,2 ± 0,4
TNF + CN	21	64 ± 12		4	3 ± 4	0,03 ± 0,03
TNF + CZN	23	95 ± 13		8	94 ± 13	
TRAIL	33	86 ± 24		7	20 ± 24	33 ± 41
TRAIL + Z	27	79 ± 25		4	9 ± 9	1,5 ± 2,2
TRAIL + N	17	65 ± 18		4	20 ± 24	38 ± 42
TRAIL + ZN	25	95 ± 15		6	94 ± 9	
TRAIL + C	19	7 ± 14	2,5 ± 3,8	5	9 ± 8	2,6 ± 2,7
TRAIL + CZ	8	28 ± 18	3,9 ± 1	4	24 ± 18	1,1 ± 0,9
TRAIL + CN	5	9 ± 7	4 ± 3,5	4	18 ± 22	1,4 ± 1,4
TRAIL + CZN	17	98 ± 10		3	103 ± 2	

FADD _{KO}	-			TWEAK		
	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	20	10 ± 20	2 ± 1,4	13	10 ± 11	0,00002 ± 0,00005
TNF + Z	4	7 ± 7	0,4 ± 0,5	4	4 ± 8	0,00001 ± 0,00005
TNF + N	21	96 ± 14		17	92 ± 23	
TNF + ZN	25	99 ± 13		15	94 ± 9	
TNF + C	5	25 ± 20	0,05 ± 0,06	4	18 ± 16	0,005 ± 0,008
TNF + CZ	4	23 ± 18	0,04 ± 0,03	4	14 ± 17	0,004 ± 0,006
TNF + CN	16	96 ± 13		12	96 ± 14	
TNF + CZN	20	98 ± 14		12	93 ± 14	
TRAIL	31	96 ± 18		17	89 ± 18	
TRAIL + Z	28	92 ± 22		14	88 ± 16	
TRAIL + N	26	95 ± 14		14	93 ± 14	
TRAIL + ZN	22	97 ± 13		10	97 ± 8	
TRAIL + C	31	88 ± 24		13	84 ± 17	
TRAIL + CZ	22	89 ± 23		11	88 ± 19	
TRAIL + CN	22	89 ± 20		12	87 ± 16	
TRAIL + CZN	17	92 ± 15		10	95 ± 15	

Ergebnisse

TRADD _{KO}	-			TWEAK		
	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	29	93 ± 18		9	7 ± 12	0,09 ± 0,1
TNF + Z	28	84 ± 22		4	11 ± 12	0,002 ± 0,003
TNF + N	26	90 ± 16		15	70 ± 15	
TNF + ZN	22	96 ± 15		13	98 ± 13	
TNF + C	6	6 ± 5	0,05 ± 0,09	4	1 ± 1	0,005 ± 0,004
TNF + CZ	4	22 ± 5	0,03 ± 0,03	4	21 ± 16	0,002 ± 0,0009
TNF + CN	4	28 ± 12	0,1 ± 0,06	4	7 ± 7	0,01 ± 0,01
TNF + CZN	17	95 ± 14		7	95 ± 13	
TRAIL	16	93 ± 12		6	9 ± 9	12 ± 11
TRAIL + Z	10	83 ± 18		4	1 ± 2	0,7 ± 0,5
TRAIL + N	9	79 ± 10		5	62 ± 10	
TRAIL + ZN	12	100 ± 10		10	95 ± 8	
TRAIL + C	9	9 ± 12	1,9 ± 2	4	5 ± 7	0,5 ± 0,6
TRAIL + CZ	6	11 ± 14	1,9 ± 0,9	5	5 ± 12	1 ± 1
TRAIL + CN	5	15 ± 10	4,2 ± 3,5	5	6 ± 8	1 ± 2
TRAIL + CZN	8	96 ± 11		4	97 ± 21	

RIPK1 _{KO}	-			TWEAK		
	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	24	98 ± 15		10	99 ± 8	
TNF + Z	19	101 ± 9		9	97 ± 12	
TNF + N	21	92 ± 17		11	90 ± 17	
TNF + ZN	17	98 ± 15		9	97 ± 12	
TNF + C	7	22 ± 15	1,1 ± 2,5	7	21 ± 16	0,7 ± 1
TNF + CZ	15	97 ± 11		7	94 ± 10	
TNF + CN	4	30 ± 15	1 ± 1,5	5	20 ± 17	0,8 ± 1,7
TNF + CZN	15	99 ± 10		6	93 ± 10	
TRAIL	21	87 ± 13		8	84 ± 15	
TRAIL + Z	15	96 ± 13		8	94 ± 17	
TRAIL + N	13	77 ± 12		4	76 ± 11	
TRAIL + ZN	16	94 ± 12		6	98 ± 4	
TRAIL + C	7	9 ± 7	3,2 ± 1,2	4	2 ± 3	1,1 ± 0,9
TRAIL + CZ	12	95 ± 15		4	79 ± 9	
TRAIL + CN	5	13 ± 12	1 ± 1,3	4	9 ± 15	1,5 ± 0,6
TRAIL + CZN	11	95 ± 8		3	103 ± 4	

FADD/ RIPK1 _{DKO}	-			TWEAK		
	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	19	100 ± 13		14	98 ± 8	
TNF + Z	17	100 ± 10		13	98 ± 14	
TNF + N	15	95 ± 8		14	96 ± 15	
TNF + ZN	15	97 ± 14		12	95 ± 8	
TNF + C	11	94 ± 13		8	96 ± 10	
TNF + CZ	15	92 ± 13		8	95 ± 12	
TNF + CN	12	90 ± 16		9	94 ± 16	
TNF + CZN	11	98 ± 13		6	94 ± 12	
TRAIL	12	99 ± 9		10	98 ± 10	

Ergebnisse

TRAIL + Z	16	98 ± 16		8	95 ± 8	
TRAIL + N	16	92 ± 11		9	93 ± 8	
TRAIL + ZN	19	96 ± 10		11	94 ± 10	
TRAIL + C	14	87 ± 26		4	91 ± 7	
TRAIL + CZ	11	88 ± 16		4	86 ± 12	
TRAIL + CN	12	87 ± 16		4	96 ± 6	
TRAIL + CZN	10	95 ± 7		4	97 ± 11	

FADD/ TRADD _{DKO}	-			TWEAK		
	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	16	89 ± 15		9	1 ± 2	0,004 ± 0,009
TNF + Z	12	84 ± 11		4	12 ± 13	0,02 ± 0,03
TNF + N	17	90 ± 18		12	68 ± 14	
TNF + ZN	16	98 ± 15		13	96 ± 12	
TNF + C	4	6 ± 9	0,3 ± 0,5	3	14 ± 22	0,00001 ± 0,00002
TNF + CZ	4	11 ± 20	0,04 ± 0,06	3	12 ± 13	0,004 ± 0,003
TNF + CN	8	68 ± 20		3	85 ± 4	
TNF + CZN	11	94 ± 13		8	98 ± 12	
TRAIL	10	81 ± 13		5	74 ± 19	
TRAIL + Z	11	76 ± 19		4	21 ± 20	1,6 ± 0,4
TRAIL + N	10	77 ± 22		12	74 ± 22	
TRAIL + ZN	15	95 ± 13		13	90 ± 11	
TRAIL + C	9	72 ± 21		6	67 ± 20	
TRAIL + CZ	5	95 ± 14		5	24 ± 24	1,7 ± 2
TRAIL + CN	7	75 ± 23		5	69 ± 15	
TRAIL + CZN	10	93 ± 12		8	92 ± 15	

TRADD/ RIPK1 _{DKO}	-			TWEAK		
	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	30	97 ± 13		19	103 ± 12	
TNF + Z	18	97 ± 12		14	96 ± 19	
TNF + N	22	94 ± 12		17	91 ± 21	
TNF + ZN	22	92 ± 12		14	98 ± 11	
TNF + C	13	87 ± 18		15	91 ± 16	
TNF + CZ	16	97 ± 13		9	94 ± 13	
TNF + CN	19	90 ± 14		10	92 ± 18	
TNF + CZN	15	98 ± 14		7	95 ± 13	
TRAIL	13	77 ± 20		14	80 ± 24	
TRAIL + Z	12	92 ± 13		9	95 ± 18	
TRAIL + N	9	68 ± 16		8	67 ± 15	
TRAIL + ZN	10	98 ± 9		9	99 ± 5	
TRAIL + C	4	12 ± 13	6,7 ± 12	4	9 ± 12	1,9 ± 2,1
TRAIL + CZ	8	98 ± 12		4	94 ± 11	
TRAIL + CN	4	12 ± 10	0,9 ± 1,4	4	6 ± 5	1,6 ± 1,7
TRAIL + CZN	11	97 ± 12		3	101 ± 8	

Ergebnisse

casp-8 _{KO}	-			TWEAK		
	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	14	89 ± 11		5	14 ± 11	0,001 ± 0,001
TNF + Z	17	91 ± 14		5	18 ± 17	0,01 ± 0,008
TNF + N	12	98 ± 10		8	98 ± 11	
TNF + ZN	12	100 ± 10		9	99 ± 14	
TNF + C	16	62 ± 14		3	9 ± 9	0,002 ± 0,0008
TNF + CZ	12	63 ± 11		3	16 ± 23	0,1 ± 0,02
TNF + CN	15	98 ± 12		8	88 ± 23	
TNF + CZN	15	96 ± 14		6	98 ± 6	
TRAIL	15	86 ± 15		5	13 ± 17	6 ± 6
TRAIL + Z	13	77 ± 24		5	3 ± 4	4 ± 3
TRAIL + N	10	99 ± 6		4	99 ± 10	
TRAIL + ZN	9	100 ± 6		4	93 ± 8	
TRAIL + C	13	65 ± 11		6	11 ± 13	3 ± 2
TRAIL + CZ	8	62 ± 7		4	19 ± 13	5 ± 0,8
TRAIL + CN	13	92 ± 16		5	89 ± 3	
TRAIL + CZN	10	97 ± 12		4	100 ± 7	

n= Anzahl der Experimente ; %= Vitalität; EC₅₀= Konzentration bei 50% Vitalität; C= CHX
N= Necrostatin-1 ; Z= ZVAD

Kontrollzellen und TRADD_{KO} Zellen wurden wie angegeben mit TWEAK und ZVAD vorinkubiert, anschließend mit TNF oder TRAIL 6 Stunden stimuliert und mittels Western Blot-Analyse die Phosphorylierung und Spaltung von RIPK1 untersucht (Abb. 4.6.2).

Kontrollzellen zeigten eine verstärkte Phosphorylierung von RIPK1 bei Inkubation mit TNF und TRAIL in Kombination mit TWEAK. Im gleichem Maße verringerte sich die Expression von RIPK1. Die Zugabe von ZVAD zur TNF- und TRAIL-Stimulation in Kombination mit TWEAK nahm in dem Fall keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von RIPK1.

Nur bei der kombinierten Zugabe von TWEAK und ZVAD zur TNF- oder TRAIL-Stimulation zeigten TRADD_{KO} Zellen eine erhöhte RIPK1 Phosphorylierung. Die Spaltung von RIPK1 trat lediglich bei der TNF- und TRAIL-Stimulation in Kombination mit TWEAK auf (Abb. 4.6.2).

Die Ergebnisse aus der Western Blot Analyse bestätigen die Ergebnisse aus den Zytotoxizitäts-Assays, dass TWEAK die TNF- und TRAIL-induzierte Nekroptose in Kontrollzellen und TRADD_{KO} Zellen verstärkt.

Ergebnisse

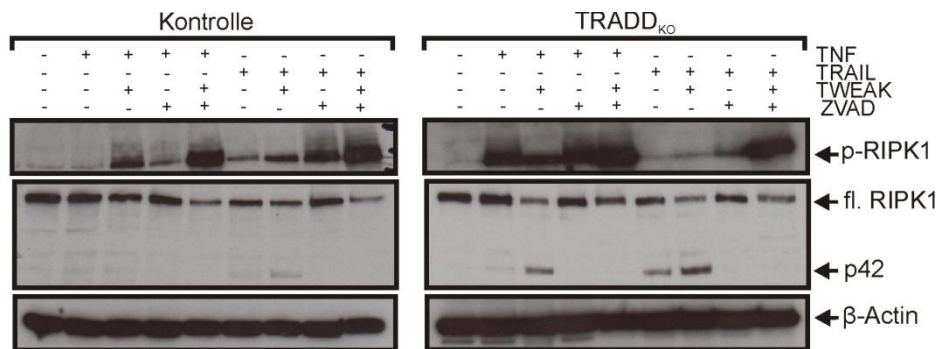


Abbildung 4.6.2 TWEAK verstärkt die TNF- und TRAIL-induzierte Nekroptose in Kontrollzellen und TRADD_{KO} Zellen

Die Zelllinien HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle) und HeLa-RIPK3-TRADD_{KO} (TRADD_{KO}) wurden in den angegebenen Kombinationen 30 min vorher mit 100 ng/ml TWEAK-Flag, 2,5 µg/ml CHX und 20 µM ZVAD vorstimuliert und dann 6 h mit 100 ng/ml TNF oder Killer-TRAIL inkubiert. Nach der Herstellung der Totalzelllysate wurden mittels Western Blot Analyse die angegebenen Proteine detektiert. fl. = *full length* / volle Länge

FADD/RIPK1_{DKO} Zellen und Kontrollzellen wurden miteinander auf den TWEAK-verstärkenden TNF- und TRAIL-induzierten Zelltod verglichen (Abb. 4.6.3).

Kontrollzellen starben bei Stimulation mit TNF oder TRAIL in Kombination mit CHX unabhängig von ZAVD. Durch das Hinzufügen von TWEAK war ein stärkerer Zelltod-Effekt erkennbar. FADD/RIPK1_{DKO} Zellen zeigten bei jeder Stimulationsbedingung keine Veränderung in deren Vitalität (Abb. 4.6.3).

TWEAK löst nur in Zelllinien einen verstärkenden TNF- und TRAIL-induzierten Zelltod aus, in denen TNF und TRAIL ohne TWEAK einen Zelltod induzieren. Zellen, die mit TNF oder TRAIL kein Zellsterben zeigten, konnten auch mit Zugabe von TWEAK nicht sterben.

Ergebnisse

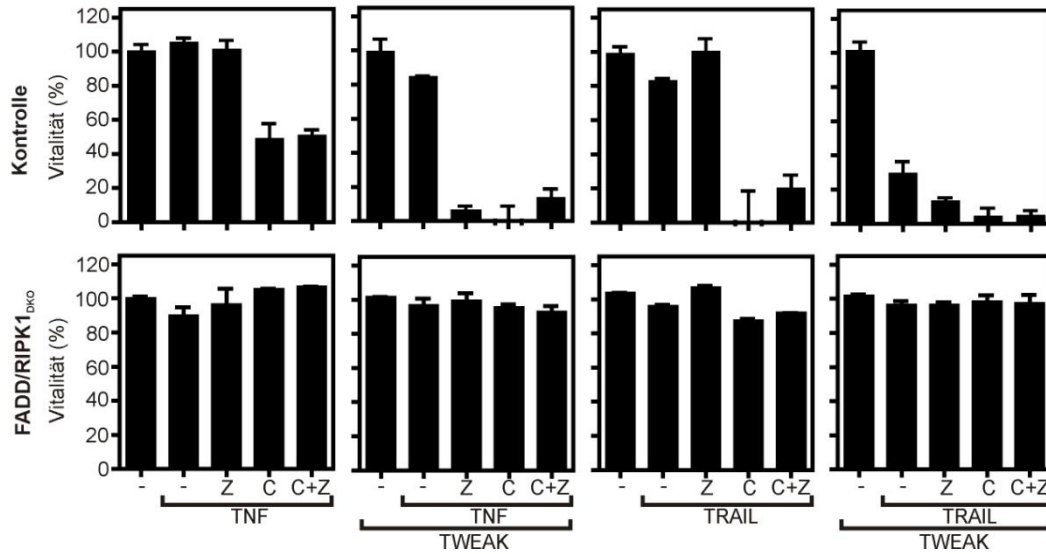


Abbildung 4.6.3 TWEAK-Einfluss auf TNF- und TRAIL-stimulierte FADD/RIPK1_{DKO}

Zellen

HeLa-RIPK3-Kontrolle (Kontrolle) und HeLa RIPK3-FADD/RIPK1_{DKO} (FADD/RIPK1_{DKO}) Zellen wurden als Triplikate wie angegeben mit 2,5 µg/ml CHX (C), 20 µM ZVAD (Z) und 100 ng/ml TWEAK-Flag 30 min vorstimuliert und anschließend mit 100 ng/ml TNF oder Killer-TRAIL ü.N. inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und gemessen.

5. Diskussion

Die Adapterproteine TRADD, FADD und RIPK1 sind in der TNFR1- und TRAILR1/2-Signalweiterleitung involviert. Jedoch gibt es keinen umfassenden Überblick über das Rezeptorspezifische Zusammenspiel dieser Proteine.

5.1. Krankheiten und Therapie

Das NFκB-System steuert die Genexpression und beeinflusst somit in Zellen deren Überleben, Differenzierung, Proliferation und Apoptose (81, 129). Durch den großen Wirkungsbereich vom NFκB-System, Apoptose, Nekroptose, sowie von TNFR1, TRAILR1 und TRAILR2 kann es zu Fehlern in der Signalkaskade kommen und so eine Reihe von Krankheiten auslösen (77). Diese Krankheiten sind u.a. Krebs, Autoimmunkrankheiten, neurodegenerative und kardiovaskuläre Krankheiten (11). U.a. spielen Caspasen eine Rolle in amyotrophischer lateraler Sklerose, Alzheimer oder Huntington's Krankheit (16, 130-132). Speziell wirkt sich die Nekroptose bzw. die RIPK1- und RIPK3-vermittelte Entzündungsantwort in vielen humanen Krankheiten, wie z.B. in TNF-vermittelter Hypothermie, systemischen Inflammationen, ischämischen Reperfusionsschäden, neurodegenerativen Verletzungen, akuten Nierenverletzungen, Virusinfektionen, Morbus Gaucher, Morbus Crohn, rheumatischer Arthritis, Multiple Sklerose und progressiver Artherosklerose aus (29-30, 47, 133-135). Eine Studie hat ergeben, dass bei entzündeten Schleimhäuten von Kindern mit Morbus Crohn, geschwürige oder allergische Colitis, RIPK3 und MLKL hochreguliert und dabei die Caspase-8 Expression runterreguliert wird und somit vermutet wird, dass Nekroptose ein wichtiges Ereignis bei der Verstärkung von Entzündungen ist (28, 136). Zudem wird vermutet, dass eine Vielzahl von bakteriellen Pathogenen, wie z.B. *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *L. monocytogenes* oder *Escherichia coli*, porenförmige Toxine freisetzen, die *Ripk1*-, *Ripk3*- oder *Mkl*-vermittelte Nekroptose in Makrophagen auslöst, was zu bakterieller hämorrhagischer Pneumonie führt (47, 137). Gründe u.a. für die Entstehung dieser Krankheiten sind die fehlerhafte Aktivierung der Todesrezeptoren, denn es kommt z.B. durch die

TNFR1-Stimulierung zu proinflammatorischer Aktivierung, nicht nur durch die Ligand-Rezeptor-Bindung, sondern auch durch die Aktivierung durch verschiedene Stimuli, wie z.B. Zytokine (z.B. IL-1), bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), doppelsträngige RNA, durch die Übertragung bei viralen Infektionen, Erkennung von Antigenen in B- und T-Zellen, DNA-Schäden, ROS oder UV-Strahlung (12, 77, 79, 81-82, 85, 138-139). Dabei kann die kanzerogene Wirkung von TNF über die Aktivierung von proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren des NFκB-Systems erfolgen, welche u.a. die Expression von Genen hochreguliert und mit Tumorzell-Überleben, -Proliferation, -Invasion, Angiogenese und Metastasierung verknüpft ist (11). Ein therapeutischer Ansatz wäre, Todesrezeptoren in krankhaften Zellen wie z.B. Krebszellen spezifisch zu aktivieren und diese zu zerstören (14, 32). Ein anderes Verfahren wäre die selektive Inhibition von Nekroptose (und / oder die Vereinfachung von apoptotischem Zelltod), um Entzündungen zu limitieren und dadurch sekundäre Gewebsschäden zu reduzieren. Doch andererseits wäre es auch wichtig, den nekroptotischen Tod von Krebszellen, welche resistent gegen Apoptose sind, zu induzieren (47, 61, 140-143). Hierbei erfassen z.B. dendritische Zellen zwar apoptotische wie auch nekroptotische Zellen, doch nur die nekroptotischen Zellen stimulieren die dendritischen Zellen dazu, Lymphocyten zu aktivieren (93, 144). Dementsprechend wäre ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen sowie pro- und anti-nekroptotischen Signalen wichtig, da sie darüber entscheiden, ob die Zelle in Apoptose oder Nekroptose geht, überlebt oder proliferiert (129). Möglicherweise könnte durch die Beeinflussung der DD-Adapterproteine FADD, TRADD und RIPK1 sowie Casapase-8 die Induktion von Apoptose oder Nekroptose gesteuert werden. Die Untersuchung von RIPK1, FADD und TRADD kann dabei möglicherweise helfen, therapeutische Mittel für die Behandlung von Krankheiten mit nekrotischem, apoptotischem oder entzündlichem Hintergrund zu finden, um ein entstandenes Ungleichgewicht aus inflammatorischen Prozessen, Apoptose und Nekroptose wieder in Einklang zu bringen.

5.2. In vivo und in vitro Versuche in der Literatur von FADD, TRADD und RIPK1

Aus dem vorherigen Abschnitt ist hervorgegangen, wie wichtig die Erforschung der DD-Adapterproteine ist, um mögliche Therapieansätze zu entwickeln und evtl. Krankheiten zu heilen. Aus diesem Grund wurde in einer Vielzahl an Publikationen das Zusammenspiel der Adapterproteine FADD, TRADD und RIPK1 sowie Caspase-8 in vivo (28-29, 54, 64) und in vitro (63, 93) untersucht und dabei deren Wirkung auf Apoptose, Nekroptose und NFκB-Weg analysiert. Der Einsatz verschiedener Methoden und Zelllinien durch unterschiedliche Arbeitsgruppen führte aber zu teils widersprüchlichen Ergebnissen (63, 93).

Nicht alle Zelllinien sterben gleichermaßen durch Apoptose und Nekroptose, sondern einige Zelllinien sind resistent gegen diese Formen von Zelltod (63, 145-146). In einer Publikation wurde berichtet, dass die Abwesenheit von FADD zum TNF-vermittelten Caspase-unabhängigen Zelltod führte und somit hatte FADD in diesem Fall einen anti-nekroptischen Effekt in TNF-stimulierten T-Zellen (93). Zudem wurde von einer anderen Arbeitsgruppe herausgefunden, dass für die Todesrezeptor-induzierte Nekroptose RIPK1 erforderlich ist (63, 93) und dass *RIPK1^{-/-}* Zellen meist sensitiv gegenüber TNF-induzierter Apoptose sind (29). Gegensätzliche Erkenntnisse erzielten Dannappel et al. (147) und Duprez et al. (148), denn Dannappel et al. (147) fand in seiner Studie heraus, dass die RIPK1-Aktivität nicht notwendig für die Aktivierung des NFκB-Systems ist, aber den Zelltod durch Apoptose oder Nekroptose vermittelt. Das Fehlen von RIPK1 inhibierte nicht RIPK3-vermittelte Nekroptose von FADD-defizienten IECs (*intestinal cells*) und Keratinozyten (28, 147). Auf der anderen Seite erläuterte Duprez et al. (148), dass das Fehlen von RIPK1 sowie das Fehlen von RIPK3 schützend auf Mäuse, die TNF-induzierte SIRS (Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom) hatten, wirkte (28, 148).

Dies lässt keine zuverlässige Schlussfolgerung auf das Zusammenspiel dieser DD-Adapterproteine nach Aktivierung der Todesrezeptoren TNFR1 und TRAILR1/2 zu.

Als zusätzliches Problem tritt auf, dass in Mausexperimenten einige *Knockout* Mäuse nicht lebensfähig waren oder schwerwiegende Krankheitsbilder aufwiesen.

Diskussion

Bei Abwesenheit von Caspase-8 oder FADD sind Mäuse nicht lebensfähig, sie starben ca. am E 10.5 Embryonaltag (38, 47, 54, 149-151). Bereits im Uterus wiesen die *Knockout*-Mäuse Venen-, Herz- und Blutzell-Formationsstörungen auf, die später zu Entzündungen und Gewebedegeneration führten (29, 64). Durch einen Doppel-*Knockout* von Caspase-8 und RIPK3 (54) (64, 152) oder FADD und RIPK1 (64, 117) konnte die embryonale Letalität von Mäusen aufgehoben werden (29, 38). Doch ausgewachsene Caspase-8-RIPK3- bzw. FADD-RIPK3-Doppel-*Knockout* Mäuse hatten lymphoakkumulative Krankheiten (47, 54, 153), was darauf hindeutet, dass die Mäuse Caspase-8 und RIPK3 für die Entwicklung brauchten. Auch Mäuse, die ausschließlich ein Defizit an RIPK1 aufwiesen, starben kurz nach der Geburt, assoziiert mit abnormer Entwicklung des Immunsystems (29, 44, 47, 154). Dieses Phänomen konnte auch nicht durch die zusätzliche Deletion von FADD korrigiert werden (64, 117), was ebenso die Wichtigkeit von RIPK1 für die Entwicklung und das Wachstum der Maus widerspiegelt. Die tödlichen Folgen am E 10.5 bei den *Casp8*^{-/-} Mäusen konnte durch den Genverlust von TNFR1 (*Tnfr1*) unterbunden werden (38, 155).

Anhand dieser Beispiele wird deutlich, dass die in vivo und in vitro Studien teils widersprüchlich sind und nur Teilaspekte untersucht wurden. Deswegen ist eine umfassende Studie über den Einfluss von FADD, TRADD, RIPK1 und Caspase-8 auf Apoptose, Nekroptose und NFκB-Wege notwendig. Diese Arbeit schließt diese Lücke, indem verschiedene *Knockout*-Zelllinien mit identischem genetischem Hintergrund hergestellt und das Zusammenspiel von FADD, TRADD, RIPK1 und Caspase-8 untersucht wurde. Zudem wurden in dieser Arbeit nicht nur Versuche mit den einzeln ausgeknockten DD-Adapterproteinen in den HeLa-RIPK3 Zellen durchgeführt, sondern auch Doppel-*Knockouts* von FADD/TRADD, FADD/RIPK1 und TRADD/RIPK1 analysiert, um neue Erkenntnisse über die Wirkung des jeweiligen DD-Adapterproteins zu erhalten.

5.3. Auswirkungen der *Knockouts* von FADD, TRADD und RIPK1 auf die TNF- und TRAIL-Induktion in HeLa-RIPK3 Zellen

Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit den HeLa-RIPK3 *Knockout*-Zelllinien nach Aktivierung des TNFR1 bzw. TRAILR1/2 durch die DD-Adapterproteine FADD, TRADD und RIPK1, um den klassischen NF κ B-Signalweg, die Apoptose und die Nekroptose zu induzieren, kann aus den Untersuchungsergebnissen geschlossen werden, dass TRADD und RIPK1 gemeinsam oberhalb von FADD in der TNFR1-Signalkaskade, doch unterhalb von FADD und Caspase-8 im TRAILR1/2-Signalweg wirken (Tab. 5.3). Dies kann damit erklärt werden, dass bei der TNFR1-Signalkaskade FADD einen untergeordneten Einfluss auf die RIPK3-Aktivierung und damit auf die Nekroptose-Induktion hat (II & IX). Denn FADD rekrutiert die anti-nekroptotischen Moleküle Caspase-8 und FLIP_L, die die Aktivierung der Nekroptose verstärkt unterdrücken, wodurch die Abwesenheit von FADD für die TNF-induzierte Nekroptose sensitivierend wirkt. Doch durch die FADD-Positionierung nach TRADD und RIPK1 hat dies eine untergeordnete Auswirkung (IX). Einerseits vermittelt FADD die Caspase-8-Aktivierung, woraufhin die Apoptose leichter induziert werden kann (VI). Dies bekräftigt die TRADD / RIPK1 – FADD Reihenfolge in der TNFR1-Signalkaskade mit der receptorspezifischen Rolle von TRADD und RIPK1 in der TNFR1-induzierten Apoptose (V). Andererseits kann aber auch RIPK1 direkt mit Caspase-8 interagieren und so FADD-unabhängig die Apoptose induzieren (VIII). RIPK1, welches oberhalb in der TNFR1-Signalkaskade von FADD wirkt, ist im Gegensatz zu FADD essentiell für die Nekroptose-Aktivierung (II).

Kurze Zeit (Sekunden bis Minuten) nach der TNFR1-Aktivierung interagiert TRADD mit TRAF2, woraufhin cIAP1/2 rekrutiert werden. cIAP1 und cIAP2, E3 Ligasen, schützen durch die RIPK1 Ubiquitylierung vor nekroptotischer RIPK1-RIPK3-Interaktion und vor apoptotischer RIPK1-abhängiger Caspase-8 Aktivierung (23, 128, 156-159). Ebenso kann durch die Interaktion von TRADD, TRAF2, cIAP1/2, ubiquitylierten RIPK1 und LUBAC, welches mit dem ubiquitylierten RIPK1 interagiert, der klassische NF κ B-Signalweg aktiviert werden (IV) (156, 158). Durch schnelle NF κ B-Aktivierung wirkt diese bei der TNFR1-Signalkaskade anti-

Diskussion

nekroptotisch und unterbindet die Caspase-8 Aktivierung und die damit folgende Apoptose-Induktion. Wenn hingegen TRADD abwesend ist oder der TRAF2-interagierende Rezeptor Fn14 durch die Bindung mit TWEAK aktiv ist, kann dies zu einer Beeinflussung von Apoptose und Nekroptose führen (III & X) (23). Denn durch die TRADD / RIPK1 – FADD Reihenfolge kann TRADD gegen die RIPK1-vermittelte Nekroptose und gegen die FADD-abhängige Caspase-8-Aktivierung wirken, indem der zytoplasmatische Pool an TRAF2 und cIAP1/2 verringert wird. Im Fall der Abwesenheit von TRADD werden diese entweder nicht rekrutiert oder sie interagieren mit Fn14 (8, 29, 128, 158, 160-161), sodass die anti-nekroptotische bzw. -apoptotische Wirkung von TRAF2 und cIAP1/2 unterbunden ist und es zu einer Verstärkung der TNF-induzierten Nekroptose bzw. Apoptose kommt (X) (Tab. 5.3). Durch den Doppel-*Knockout* von TRADD und RIPK1 kann weder der klassische NFκB-Signalweg aktiviert werden, noch die Nekroptose induziert werden. Letztendlich bleibt nur die Induktion der Apoptose.

Bei TRAILR1/2-Aktivierung agiert FADD mit Caspase-8 oberhalb von TRADD und RIPK1 in der Signalkaskade (162). Somit hat FADD eine wichtige Funktion in der RIPK3-Aktivierung und damit auf die Nekroptose-Induktion (II & IX). Außerdem beeinflusst FADD durch die FADD - TRADD / RIPK1 Reihenfolge weitergehend die Aktivierung des klassischen NFκB-Signalwegs (VII) (53, 163-164) und die Apoptose, abhängig und unabhängig von Caspase-8 (VI) (165-167). Doch auch bei der TRAILR1/2-Signalkaskade ist RIPK1 unverzichtbar für die Nekroptose (II). Durch die Positionierung von FADD – TRADD / RIPK1 hat TRADD nur einen Einfluss auf die Nekroptose nicht aber wie bei der TNFR1-Aktivierung auf die Apoptose (III). Aus den gleichen Gründen wie bei der TNFR1- führt auch bei der TRAILR1/2-Signalkaskade ein Fehlen von TRADD oder die Bindung von TWEAK an Fn14 zur Reduktion vom zytoplasmatischen TRAF2-cIAP1/2 Pool, wodurch eine verstärkte Nekroptose-Antwort ausgelöst wird (III & X) (Tab. 5.3) (23, 128, 157-159). Zudem kann durch die viel schneller erfolgende Caspase-8 Aktivierung der zeitlich später aktivierte klassische NFκB-Signalweg keinen Einfluss auf die Apoptose nehmen.

Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen Folgendes (Tab.5.3):

- I. RIPK3-exprimierende Zellen (z.B. HeLa-RIPK3 Zellen) können an Apoptose und Nekroptose sterben (Abb. 4.1.3 und Tab. 4.1).
- II. RIPK1 ist essentiell für die Nekroptose-Induktion, egal, ob durch TNFR1 oder TRAILR1/2 induziert. Doch reicht RIPK1 alleine (ohne FADD und TRADD) nur bei der TNF-induzierten Nekroptose aus, nicht aber bei der TRAIL-induzierten Nekroptose, welche auch FADD benötigt (Abb. 4.2.2, 4.2.3, 4.2.6, 4.4.2 und 4.4.3 und Tab. 4.2 und 4.3).
- III. TRADD inhibiert die TNF-induzierte Apoptose und Nekroptose (Abb. 4.2.2, 4.2.3).
- IV. RIPK1 und TRADD sind unverzichtbar für die NFκB-Aktivierung durch TNFR1 oder TRAILR1/2 (Abb. 4.2.8, 4.3.6 und 4.3.7).
- V. RIPK1 und TRADD spielen eine wichtige Rolle bei der TNF-induzierten Apoptose, doch keine Rolle bei der TRAIL-induzierten Apoptose (Abb. 4.3.2 - 4.3.4 und Tab. 4.3).
- VI. FADD allein (ohne RIPK1 und TRADD) ist ausreichend für die TRAILR1/2 Caspase-8 Aktivierung, aber nicht im Falle des TNFR1 (Abb. 4.2.2, 4.2.4, 4.3.2 - 4.3.4 und Tab. 4.2 und 4.3).
- VII. FADD ist notwendig für die TRAIL-, aber nicht für die TNF-induzierte entzündungsfördernde NFκB-Signalaktivierung (Abb. 4.2.8).
- VIII. In Abwesenheit von FADD und TRADD vermittelt RIPK1 eine residuelle TNF-, aber nicht eine TRAIL-induzierte Caspase-8 Aktivierung (Abb. 4.4.2, 4.4.3 und 4.4.5 und Tab. 4.4).
- IX. FADD wird für die TRAIL-induzierte Nekroptose benötigt, wirkt aber gegenläufig auf die TNF-induzierte Nekroptose in einer Caspase-8 abhängigen und einer Caspase-8 unabhängigen Weise (Abb. 4.5.2- 4.5.4).
- X. TWEAK sensitiviert für die TNF- und TRAIL-induzierte Nekroptose (Abb. 4.6.1 - 4.6.3 und Tab. 4.6).

Tabelle 5.3 Zelltodinduktion bei den einzelnen HeLa-RIPK3-Knockout-Zelllinien nach TNF- und TRAIL-Stimulation

Varianten	TNF					TRAIL				
	Apoptose		Nekroptose		NFκB /IL-8	Apoptose		Nekroptose		NFκB /IL-8
	N	CN	Z	CZ		N	CN	Z	CZ	
HeLa		X			-	(X)	X			-
Kontrolle		(X)		X	X	(X)	X		X	X
FADD _{KO}			X	X	X					
TRADD _{KO}		X		X	X		X		X	X
RIPK1 _{KO}		X			X		X			X
FADD/RIPK1 _{DKO}					X					X
FADD/TRADD _{DKO}		(X)		X	X					X
TRADD/RIPK1 _{DKO}						(X)	X			
casp-8 _{KO}				(X)	X				(X)	X

Varianten	TNF				TRAIL				NFκB /IL-8
	Apoptose		Nekroptose		Apoptose		Nekroptose		
	N	CN	Z	CZ	N	CN	Z	CZ	
+ TWEAK									
Kontrolle		X	X	X	X	X	X	X	X
FADD _{KO}			X	X					X
TRADD _{KO}	(X)	X	X	X	(X)	X	X	X	X
RIPK1 _{KO}		X				X			X
FADD/RIPK1 _{DKO}									X
FADD/TRADD _{DKO}	(X)		X	X		(X)	X	X	X
TRADD/RIPK1 _{DKO}					(X)	X			
casp-8 _{KO}			X	X			X	X	X

X = Zelltod (< 50% Vitalität) / IL-8-Induktion (X) = Zelltod (70- 50% Vitalität)

- = nicht untersucht

5.4. Modell über das Zusammenspiel von FADD, TRADD und RIPK1 nach TNFR1- und TRAIL1/2-Aktivierung

Aus den erworbenen Ergebnissen lässt sich ein Modell (Abb. 5.4) erstellen, indem einerseits TRADD und RIPK1 sowie FADD und Caspase-8 sich gegenseitig in der TNF- und TRAIL-induzierten Signalweiterleitung beeinflussen und andererseits die Caspase-8 Aktivierung mit FADD und RIPK1, die NFκB-Induktion durch RIPK1 und TRADD und schließlich die RIPK3-Aktivierung mit RIPK1 verbunden sind.

Nach Aktivierung vom TNFR1 kommt es nach kurzer Zeit (Sekunden bis wenige Minuten) zur Rekrutierung von TRADD. Durch die Protein-Protein-Interaktion auf Plasmamembran Ebene zwischen TRADD und RIPK1 gegenseitig sowie mit TNFR1 können im Folgenden TRADD und RIPK1 mit TRAF2 und cIAP1/2 den klassischen NFκB-Signalweg aktivieren. Wenn Fn14 aktiv ist, reduziert dieser die Wirkung von TRAF2 und cIAP1/2 in der TNFR1 Signaltransduktion, sodass nur eine reduzierte NFκB-Signalkaskade erfolgen kann. Nach einem längeren Zeitraum (Minuten bis Stunden) kann durch das Zusammenspiel von TRADD, RIPK1, FADD, TRAF2 und cIAP1/2 im Zytoplasma der klassische NFκB-Signalweg, die Apoptose oder die Nekroptose, abhängig von den im Komplex vorliegenden Proteinen, aktiviert werden. Bei Aktivierung von TRAILR1/2 interagiert der Rezeptor zunächst nur mit FADD. FADD sorgt nach kurzer Zeit (Sekunden bis wenige Minuten) für die Rekrutierung von FLIP_L, RIPK1 und Caspase-8, mit denen es Protein-Protein-Interaktionen eingeht. Es beeinflussen sich nur RIPK1 und Caspase-8 sowie FLIP_L und Caspase-8 gegenseitig in ihrer Wirkung. CHX reduziert die FLIP_L-Expression, wodurch RIPK1 in seiner Funktionalität gestört ist und keine NFκB-Aktivierung stattfinden kann. Bei Inhibierung von Caspase-8 durch ZVAD ist keine Spaltung von Caspase-8 mehr möglich und somit kann keine Apoptose mehr induziert werden.

Je nachdem welcher folgende Signalweg aktiviert wird, kommt es auf zytoplasmatischer Ebene nach wenigen Minuten bis mehreren Stunden zur Zusammenlagerung von TRADD, RIPK1, RIPK3, FADD, Caspase-8, FLIP_L, TRAF2 und cIAP2. Dabei reduziert CHX die FLIP_L-Expression, sodass dies wieder Einfluss auf RIPK1 hat und so die NFκB-Aktivierung blockiert wird. ZVAD blockiert Caspase-8, wodurch die Apoptose unterbunden wird. Necrostatin-1 verhindert den Wirkmechanismus von RIPK1 wodurch RIPK3 nicht mit RIPK1 interagieren kann und

die Nekroptose inhibiert wird. Wirkt Fn14 durch seine Aktivierung auf die Protein-Protein-Interaktion ein, indem es die Rekrutierung von TRAF2 und cIAP1/2 unterbindet, ist keine NFκB-Aktivierung möglich, was im Umkehrschluss verstärkend auf die Nekroptose wirkt (Abb. 5.4).

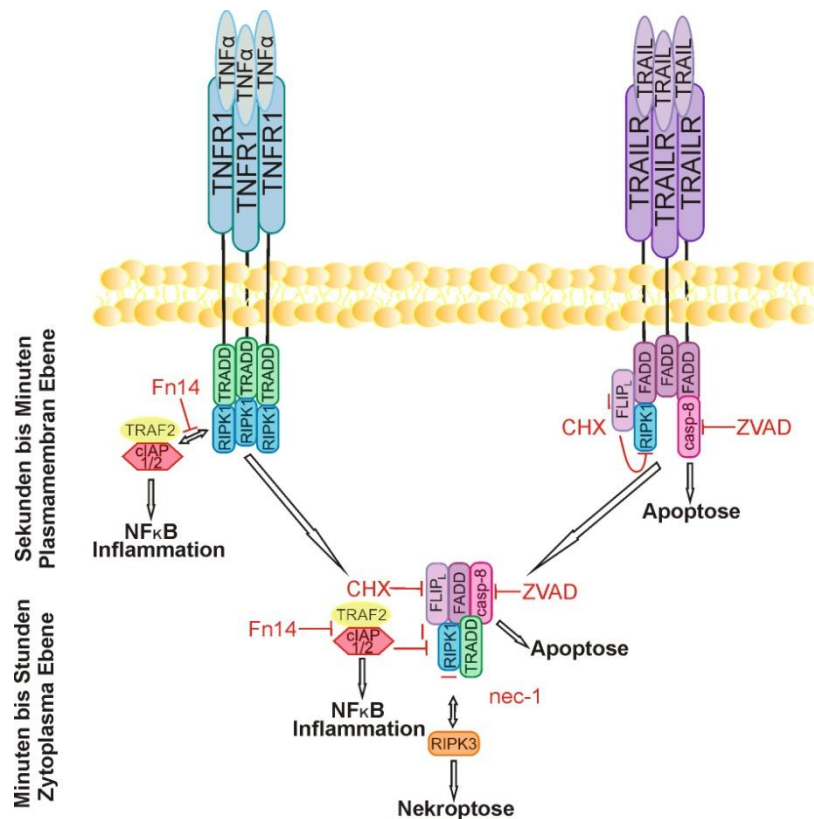


Abbildung 5.4 Modell von TNFR1 und TRAIL Todesrezeptor 1/2 Signalkaskade

Kurze Zeit nach der Rezeptoraktivierung werden auf Plasmamembran Ebene beim TNFR1 die Todesdomän-Adapterproteine TRADD und RIPK1 rekrutiert. Nach deren Anlagerung können die Proteine zusammen mit TRAF2 und cIAP1/2 den klassischen NFκB-Signalweg induzieren. Wenn Fn14 aktiviert wurde, kann dieser die Anlagerung von TRAF2 und cIAP1/2 verhindern und so die Aktivierung des NFκB-Signalwegs unterbinden. Im Gegensatz lagert sich FADD nach wenigen Sekunden bzw. Minuten an die intrazelluläre Todesdomäne des TRAILR1/2 an und führt zur Rekrutierung von FLIP_L, casp-8 und RIPK1. Dadurch kann u.a. die Apoptose bei aktiver casp-8 induziert werden. Dieser Vorgang kann aber durch den Einsatz von ZVAD unterbunden werden. CHX verhindert durch die Blockierung von FLIP_L und RIPK1 die Induktion von inflammatorischen Signalwegen. Beim TNFR1 und beim TRAILR1/2 kann es anschließend auf zytoplasmatischer Ebene zur Zusammenlagerung der Proteine kommen. Dabei lagern sich FADD, TRADD, RIPK1, casp-8 und FLIP_L zusammen. Je nachdem ob Caspase-8 aktiv ist und nicht durch ZVAD blockiert wird, kann die Apoptose eingeleitet werden. Wenn RIPK3 anwesend ist und RIPK1 nicht durch nec-1 inhibiert wird oder durch TRAF2 bzw. cIAP1/2 gehemmt wird, kann die Nekroptose aktiviert werden. Ebenso kann der NFκB-Signalweg induziert werden, falls TRAF2 und cIAP1/2 anwesend sind, nicht durch Fn14 blockiert werden und die Translation nicht durch CHX gehemmt wird.

Diskussion

Zusammenfassend kann definiert werden, dass die Caspase-8 Aktivierung und die Apoptose-Induktion, die RIPK1-RIPK3-Aktivierung und die Nekroptose sowie der klassische NFκB-Signalweg in einem Todesrezeptor-spezifischen Schema wirkt und somit die unterschiedlichen Auswirkungen des *Knockouts* von FADD, TRADD und RIPK1 in der TNFR1- und TRAILR1/2-Signalkaskade erklärt. Doch stellt sich weiterhin die Frage, ob zwei oder mehr stabile Komplexe auf der zytoplasmatischen Ebene existieren, indem die Proteine miteinander interagieren.

6. Zusammenfassung

Die NFκB-Signalwege, Apoptose und Nekroptose sind essentielle Prozesse in der Immunantwort. Außerdem sind diese Signalwege Teil der Regulation von Zelldifferenzierung, -proliferation, -tod und Entzündungsreaktionen. Dabei wird zuerst der Rezeptor (TNFR1 oder TRAILR 1/2) aktiviert, die rekrutierten DD-Adapterproteine TRADD, FADD und RIPK1 leiten dann die entsprechende Signalkaskade weiter und bestimmen durch ihre Zusammenwirkung, ob der NFκB-Signalweg, Apoptose oder Nekroptose induziert wird.

TNFR1 und TRAILR 1/2 benötigen die DD-Adapterproteine TRADD, FADD und RIPK1 für die Zelltodinduktion, deren konkrete Bedeutung in Bezug auf Rezeptorspezifität, Zusammenwirken und Relevanz allerdings noch unklar ist. Um das Zusammenspiel dieser Proteine besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit Nekroptose-kompetente RIPK3-exprimierende HeLa-Zellen verwendet, bei denen die DD-Adapterproteine FADD, TRADD und RIPK1 einzeln oder in Kombination von zweien ausgeknockt wurden. Es stellte sich heraus, dass RIPK1 essentiell für die TNFR1- und TRAILR 1/2-vermittelte Nekroptose-Induktion ist, doch RIPK1 alleine, d.h. ohne FADD- oder TRADD-Mitbeteiligung, nur bei der TNFR1-Nekroptose-Induktion ausreicht. Wiederum inhibiert TRADD die TNFR1- und TRAILR 1/2-induzierte Nekroptose. RIPK1 und TRADD sind aber unverzichtbar für die NFκB-Aktivierung durch TNFR1 oder TRAILR 1/2 und spielen eine wichtige Rolle bei TNFR1-induzierter Apoptose. Andererseits ist FADD alleine ausreichend für die TRAILR 1/2-bezogene Caspase-8 Aktivierung. Zudem ist FADD notwendig für die TRAIL-induzierte NFκB-Signalaktivierung. In Abwesenheit von FADD und TRADD vermittelt RIPK1 die TNF-induzierte Caspase-8 Aktivierung. FADD wird für die TRAIL-induzierte Nekroptose benötigt, aber gegenläufig wirkt die TNF-induzierte Nekroptose in einer Caspase-8 abhängigen und unabhängigen Weise. Zudem sensitiviert TWEAK die TNF- und TRAIL-induzierte Nekroptose.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die Auswirkung von TNFR1 und TRAILR 1/2 auf die Aktivierung der unterschiedlichen Signalkaskaden untersucht. Des Weiteren wurde gezeigt, in welcher Weise sich das Zusammenspiel von TRADD, FADD und RIPK1 auf die Induktion von NFκB, Apoptose und Nekroptose auswirkt.

7. Summary

The NF κ B-pathways, apoptosis and necroptosis are basic components of the immune response. Furthermore, they are involved in the regulation of cell differentiation, proliferation, cell death and inflammation. After the receptor (TNFR1 or TRAILR1/2) is activated, the recruited DD-adaptor proteins TRADD, FADD and RIPK1 transmit the signal thereby determining whether NF κ B-pathways, apoptosis and necroptosis are induced.

TNFR1 and TRAIL 1/2 depend on the DD-adaptor proteins TRADD, FADD and RIPK1 for cell death induction and inflammatory signaling. However, the precise role of these molecules is poorly understood, especially with respect to receptor-specific, cooperative and redundant activities. In order to elucidate the interdependencies of these proteins, variants of the necroptosis competent RIPK3-expressing HeLa transfectant lacking expression of TRADD, RIPK1 and FADD or any combination of two of these molecules were generated and evaluated with respect to TNF- and TRAIL-induced signaling. It turned out that RIPK1 is essential for necroptosis induction by TNFR1 and TRAILR 1/2, RIPK1 alone, in the absence of FADD and TRADD, is only sufficient for the induction of TNFR1 dependent necroptosis. Otherwise, TRADD inhibits TNFR1- and TRAILR 1/2-induced necroptosis. RIPK1 and TRADD are indispensable for TNFR1- and TRAILR 1/2-induced NF κ B activation and play a decisive role in TNFR1-induced apoptosis. On the contrary, FADD alone is enough for TRAILR 1/2-induced caspase-8 activation. Furthermore, FADD is required for TRAIL-induced NF κ B activation. In absence of FADD and TRADD, RIPK1 alone mediates TNF-induced caspase-8 activation. FADD is necessary for TRAIL-induced necroptosis, but antagonizes TNF-induced necroptosis in a caspase-8 dependent and independent manner. Besides TWEAK sensitizes for both a TNF- and TRAIL-induced necroptosis.

To summarize, in the scope of this work, we were able to analyze the effects of TNFR1 and TRAIL 1/2 on the activation of the respective signaling cascades. Moreover, we showed how the interaction of TRADD, FADD and RIPK1 influence the activation of NF κ B, apoptosis and necroptosis.

8. Literaturverzeichnis

1. R. M. Locksley, N. Killeen, M. J. Lenardo, *Cell* **104**, 487 (Feb 23, 2001).
2. J. L. Bodmer, P. Schneider, J. Tschopp, *Trends Biochem Sci* **27**, 19 (Jan, 2002).
3. H. Wajant, K. Pfizenmaier, P. Scheurich, *Cell Death Differ* **10**, 45 (Jan, 2003).
4. J. H. Naismith, S. R. Sprang, *Trends in biochemical sciences* **23**, 74 (Feb, 1998).
5. C. A. Smith, T. Farrah, R. G. Goodwin, *Cell* **76**, 959 (Mar 25, 1994).
6. A. Ashkenazi, *Nat Rev Cancer* **2**, 420 (Jun, 2002).
7. C. Bossen *et al.*, *J Biol Chem* **281**, 13964 (May 19, 2006).
8. L. Cabal-Hierro, P. S. Lazo, *Cell Signal* **24**, 1297 (Jun, 2012).
9. F. K. Chan, *Cytokine* **37**, 101 (Feb, 2007).
10. F. K. Chan *et al.*, *Science* **288**, 2351 (Jun 30, 2000).
11. B. B. Aggarwal, S. C. Gupta, J. H. Kim, *Blood* **119**, 651 (Jan 19, 2012).
12. I. Lavrik, A. Golks, P. H. Krammer, *J Cell Sci* **118**, 265 (Jan 15, 2005).
13. N. Muller, A. Wyzgol, S. Munkel, K. Pfizenmaier, H. Wajant, *Fibs j* **275**, 2296 (May, 2008).
14. H. Wajant, J. Gerspach, K. Pfizenmaier, *Cancer Lett* **332**, 163 (May 28, 2013).
15. S. Nagata, *Cell* **88**, 355 (Feb 7, 1997).
16. D. Vercaammen *et al.*, *The Journal of experimental medicine* **188**, 919 (Sep 7, 1998).
17. N. Itoh, S. Nagata, *J Biol Chem* **268**, 10932 (May 25, 1993).
18. H. Hsu, H. B. Shu, M. G. Pan, D. V. Goeddel, *Cell* **84**, 299 (Jan 26, 1996).
19. H. Hsu, J. Xiong, D. V. Goeddel, *Cell* **81**, 495 (May 19, 1995).
20. T. H. Watts, *Annu Rev Immunol* **23**, 23 (2005).
21. A. Wyzgol *et al.*, *J Immunol* **183**, 1851 (Aug 1, 2009).
22. A. Fick *et al.*, *J Biol Chem* **287**, 484 (Jan 2, 2012).
23. A. Wicovsky *et al.*, *Cell Death Differ* **16**, 1445 (Nov, 2009).
24. S. Kreuz *et al.*, *J Cell Biol* **166**, 369 (Aug 2, 2004).
25. K. Iwai, *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **10**, 3095 (Sep 15, 2011).
26. I. E. Wertz, V. M. Dixit, *Cell Death Differ* **17**, 14 (Jan, 2010).
27. I. E. Wertz, V. M. Dixit, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a003350 (Mar, 2010).
28. M. Pasparakis, P. Vandenabeele, *Nature* **517**, 311 (Jan 15, 2015).
29. W. Zhou, J. Yuan, *Semin Cell Dev Biol* **35**, 14 (Nov, 2014).
30. Y. K. Dhuriya, D. Sharma, *Journal of neuroinflammation* **15**, 199 (Jul 6, 2018).
31. E. Varfolomeev, D. Vucic, *Cytokine* **101**, 26 (Jan, 2018).
32. H. Wajant, *Br J Pharmacol* **170**, 748 (Oct, 2013).
33. A. T. Ting, F. X. Pimentel-Muinos, B. Seed, *EMBO J* **15**, 6189 (Nov 15, 1996).
34. S. M. Park, J. B. Yoon, T. H. Lee, *FEBS Lett* **566**, 151 (May 21, 2004).
35. M. J. Bertrand *et al.*, *Mol Cell* **30**, 689 (Jun 20, 2008).
36. E. Varfolomeev *et al.*, *J Biol Chem* **283**, 24295 (Sep 5, 2008).
37. D. E. Christofferson, Y. Li, J. Yuan, *Annu Rev Physiol* **76**, 129 (2014).
38. J. Silke, J. A. Rickard, M. Gerlic, *Nat Immunol* **16**, 889 (Aug, 2015).
39. M. Feoktistova *et al.*, *Mol Cell* **43**, 449 (Aug 5, 2011).
40. S. McComb *et al.*, *Cell Death Differ* **19**, 1791 (Nov, 2012).

Literaturverzeichnis

41. Y. Dondelinger *et al.*, *Cell Death Differ* **20**, 1381 (Oct, 2013).
42. N. Muller-Sienerth *et al.*, *PLoS One*. 2011;6(6):e21556. doi: 10.1371/journal.pone.0021556. Epub 2011 Jun 30.
43. O. Micheau, J. Tschopp, *Cell* **114**, 181 (Jul 25, 2003).
44. M. A. Kelliher *et al.*, *Immunity* **8**, 297 (Mar, 1998).
45. L. Wang, F. Du, X. Wang, *Cell* **133**, 693 (May 16, 2008).
46. D. Legarda-Addison, H. Hase, M. A. O'Donnell, A. T. Ting, *Cell Death Differ* **16**, 1279 (Sep, 2009).
47. L. Galluzzi, O. Kepp, F. K. Chan, G. Kroemer, *Annual review of pathology* **12**, 103 (Jan 24, 2017).
48. A. Degterev *et al.*, *Nat Chem Biol* **4**, 313 (May, 2008).
49. H. Walczak *et al.*, *EMBO J* **16**, 5386 (Sep 1, 1997).
50. G. Pan *et al.*, *Science* **277**, 815 (Aug 8, 1997).
51. G. Pan *et al.*, *Science* **276**, 111 (Apr 4, 1997).
52. S. Shalini, L. Dorstyn, S. Dawar, S. Kumar, *Cell Death Differ* **22**, 526 (Apr, 2015).
53. S. Horn *et al.*, *Cell Rep* **19**, 785 (Apr 25, 2017).
54. A. Oberst *et al.*, *Nature* **471**, 363 (Mar 17, 2011).
55. D. Siegmund, P. Hadwiger, K. Pfizenmaier, H. P. Vornlocher, H. Wajant, *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **8**, 725 (Nov, 2002).
56. P. Geserick *et al.*, *J Cell Biol* **187**, 1037 (Dec 28, 2009).
57. T. Tenev *et al.*, *Mol Cell* **43**, 432 (Aug 5, 2011).
58. P. S. Welz *et al.*, *Nature* **477**, 330 (Jul 31, 2011).
59. M. C. Bonnet *et al.*, *Immunity* **35**, 572 (Oct 28, 2011).
60. Y. Lin, A. Devin, Y. Rodriguez, Z. G. Liu, *Genes Dev* **13**, 2514 (Oct 1, 1999).
61. S. Feng *et al.*, *Cell Signal* **19**, 2056 (Oct, 2007).
62. M. A. O'Donnell *et al.*, *Nat Cell Biol* **13**, 1437 (Oct 30, 2011).
63. J. Hitomi *et al.*, *Cell* **135**, 1311 (Dec 26, 2008).
64. M. E. Peter, *Nature* **471**, 310 (Mar 17, 2011).
65. S. Vallabhapurapu, M. Karin, *Annu Rev Immunol* **27**, 693 (2009).
66. E. Rieser, S. M. Cordier, H. Walczak, *Trends in biochemical sciences* **38**, 94 (Feb, 2013).
67. C. K. Ea, L. Deng, Z. P. Xia, G. Pineda, Z. J. Chen, *Mol Cell* **22**, 245 (Apr 21, 2006).
68. P. J. Naude, J. A. den Boer, P. G. Luiten, U. L. Eisel, *FEBS J* **278**, 888 (Apr, 2011).
69. P. Obexer, M. J. Ausserlechner, *Front Oncol* **4**, 197 (2014).
70. M. S. Hayden, S. Ghosh, *Cell* **132**, 344 (Feb 8, 2008).
71. S. C. Sun, S. C. Ley, *Trends Immunol* **29**, 469 (Oct, 2008).
72. H. Wajant, P. Scheurich, *FEBS J* **278**, 862 (Apr, 2011).
73. A. Hoffmann, G. Natoli, G. Ghosh, *Oncogene* **25**, 6706 (Oct 30, 2006).
74. M. Karin, *Oncogene* **18**, 6867 (Nov 22, 1999).
75. M. Karin, *J Biol Chem* **274**, 27339 (Sep 24, 1999).
76. M. S. Hayden, S. Ghosh, *Genes Dev* **18**, 2195 (Sep 15, 2004).
77. M. S. Hayden, S. Ghosh, *Genes Dev* **26**, 203 (Feb 1, 2012).
78. H. Rauert *et al.*, *J Biol Chem* **285**, 7394 (Mar 5, 2010).
79. I. M. Verma, J. K. Stevenson, E. M. Schwarz, D. Van Antwerp, S. Miyamoto, *Genes Dev* **9**, 2723 (Nov 15, 1995).
80. S. J. Martin, *Trends in cell biology* **11**, 188 (May, 2001).

Literaturverzeichnis

81. A. Oeckinghaus, S. Ghosh, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a000034 (Oct, 2009).
82. D. M. Rothwarf, M. Karin, *Sci STKE* **1999**, RE1 (Oct 26, 1999).
83. X. Sun, M. W. Feinberg, *Am J Pathol* **181**, 1513 (Nov, 2012).
84. F. E. Chen, G. Ghosh, *Oncogene* **18**, 6845 (Nov 22, 1999).
85. H. L. Pahl, *Oncogene* **18**, 6853 (Nov 22, 1999).
86. T. Saitoh *et al.*, *J Biol Chem* **278**, 36005 (Sep 19, 2003).
87. F. B. Vincent, D. Saulep-Easton, W. A. Figgett, K. A. Fairfax, F. Mackay, *Cytokine & growth factor reviews* **24**, 203 (Jun, 2013).
88. M. Nakayama, N. Manabe, N. Inoue, T. Matsui, H. Miyamoto, *Biology of reproduction* **68**, 530 (Feb, 2003).
89. B. Razani, A. D. Reichardt, G. Cheng, *Immunol Rev* **244**, 44 (Nov, 2011).
90. S. C. Sun, *Immunol Rev. 2012 Mar;246(1):125-40. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01088.x.*
91. D. Vucic, *Current cancer drug targets* **8**, 110 (Mar, 2008).
92. K. W. Murphy, C., *Janeway immunologie*. 7th, Ed., Springer-Verlag (2018).
93. N. Holler *et al.*, *Nat Immunol* **1**, 489 (Dec, 2000).
94. J. Grooten, V. Goossens, B. Vanhaesebroeck, W. Fiers, *Cytokine* **5**, 546 (Nov, 1993).
95. J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie, *British journal of cancer* **26**, 239 (Aug, 1972).
96. L. Yu *et al.*, *Science* **304**, 1500 (Jun 4, 2004).
97. S. M. Srinivasula, M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri, G. Litwack, E. S. Alnemri, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 14486 (Dec 10, 1996).
98. M. Muzio, G. S. Salvesen, V. M. Dixit, *J Biol Chem* **272**, 2952 (Jan 31, 1997).
99. J. D. Lane *et al.*, *J Cell Biol* **156**, 495 (Feb 4, 2002).
100. A. H. Boulares *et al.*, *J Biol Chem* **274**, 22932 (Aug 13, 1999).
101. K. M. Boatright *et al.*, *Mol Cell* **11**, 529 (Feb, 2003).
102. M. Donepudi, A. Mac Sweeney, C. Briand, M. G. Grutter, *Mol Cell* **11**, 543 (Feb, 2003).
103. M. E. Peter, P. H. Krammer, *Cell Death Differ* **10**, 26 (Jan, 2003).
104. B. C. Barnhart, E. C. Alappat, M. E. Peter, *Seminars in immunology* **15**, 185 (Jun, 2003).
105. M. L. Wurstle, M. A. Laussmann, M. Rehm, *J Biol Chem* **285**, 33209 (Oct 22, 2010).
106. S. Sarvothaman, R. B. Undi, S. R. Pasupuleti, U. Gutti, R. K. Gutti, *Blood Res. 2015 Jun;50(2):73-9. doi: 10.5045/br.2015.50.2.73. Epub 2015 Jun 25.*
107. D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **100**, 57 (Jan 7, 2000).
108. Y. S. Cho *et al.*, *Cell* **137**, 1112 (Jun 12, 2009).
109. T. Vanden Berghe, A. Linkermann, S. Jouan-Lanhouet, H. Walczak, P. Vandenabeele, *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 135 (Feb, 2014).
110. M. Conrad, J. P. Angeli, P. Vandenabeele, B. R. Stockwell, *Nature reviews. Drug discovery* **15**, 348 (May, 2016).
111. A. Kaczmarek, P. Vandenabeele, D. V. Krysko, *Immunity* **38**, 209 (Feb 21, 2013).
112. Y. K. Dhuriya, D. Sharma, *J Neuroinflammation. 2018 Jul 6;15(1):199. doi: 10.1186/s12974-018-1235-0.*
113. D. W. Zhang *et al.*, *Science* **325**, 332 (Jul 17, 2009).

Literaturverzeichnis

114. P. Vandenabeele, W. Declercq, F. Van Herreweghe, T. Vanden Berghe, *Sci Signal* **3**, re4 (Mar 30, 2010).
115. J. Li *et al.*, *Cell* **150**, 339 (Jul 20, 2012).
116. S. He *et al.*, *Cell* **137**, 1100 (Jun 12, 2009).
117. H. Zhang *et al.*, *Nature* **471**, 373 (Mar 17, 2011).
118. S. Orozco *et al.*, *Cell Death Differ* **21**, 1511 (Oct, 2014).
119. X. N. Wu *et al.*, *Cell Death Differ* **21**, 1709 (Nov, 2014).
120. L. Sun *et al.*, *Cell* **148**, 213 (Jan 20, 2012).
121. J. M. Murphy *et al.*, *Immunity* **39**, 443 (Sep 19, 2013).
122. Z. Cai *et al.*, *Nat Cell Biol* **16**, 55 (Jan, 2014).
123. X. Chen *et al.*, *Cell Res* **24**, 105 (Jan, 2014).
124. Y. Dondelinger *et al.*, *Cell Rep* **7**, 971 (May 22, 2014).
125. L. Su *et al.*, *Structure* **22**, 1489 (Oct 7, 2014).
126. H. Wang *et al.*, *Mol Cell* **54**, 133 (Apr 10, 2014).
127. V. Kumar, Abbas, A. & Fausto, N. , *Robbins and cotran pathologic basis of disease*. Saunders (2009).
128. I. Karl *et al.*, *Cell Death Dis* **5**, e1444 (Oct 9, 2014).
129. B. B. Aggarwal, *Nat Rev Immunol* **3**, 745 (Sep, 2003).
130. R. M. Friedlander, R. H. Brown, V. Gagliardini, J. Wang, J. Yuan, *Nature* **388**, 31 (Jul 3, 1997).
131. T. W. Kim, W. H. Pettingell, Y. K. Jung, D. M. Kovacs, R. E. Tanzi, *Science* **277**, 373 (Jul 18, 1997).
132. Y. P. Goldberg *et al.*, *Nature genetics* **13**, 442 (Aug, 1996).
133. C. Gunther *et al.*, *Nature* **477**, 335 (Sep 14, 2011).
134. K. E. Lawlor *et al.*, *Nature communications* **6**, 6282 (Feb 18, 2015).
135. D. Ofengeim *et al.*, *Cell Rep* **10**, 1836 (Mar 24, 2015).
136. M. Pierdomenico *et al.*, *Am J Gastroenterol* **109**, 279 (Feb, 2014).
137. N. Gonzalez-Juarbe *et al.*, *PLoS pathogens* **11**, e1005337 (Dec, 2015).
138. A. Birbach *et al.*, *J Biol Chem* **277**, 10842 (Mar 29, 2002).
139. S. Ghosh, M. Karin, *Cell* **109 Suppl**, S81 (Apr, 2002).
140. L. Galluzzi, G. Kroemer, *Cell* **135**, 1161 (Dec 26, 2008).
141. G. B. Koo *et al.*, *Cell Res* **25**, 707 (Jun, 2015).
142. K. Moriwaki, J. Bertin, P. J. Gough, G. M. Orlowski, F. K. Chan, *Cell Death Dis* **6**, e1636 (Feb 12, 2015).
143. A. L. Nuges *et al.*, *Cell Death Dis* **5**, e1384 (Aug 21, 2014).
144. S. Gallucci, M. Lolkema, P. Matzinger, *Nat Med* **5**, 1249 (Nov, 1999).
145. A. Degterev *et al.*, *Nat Chem Biol* **1**, 112 (Jul, 2005).
146. A. Degterev, J. Yuan, *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 378 (May, 2008).
147. M. Dannappel *et al.*, *Nature* **513**, 90 (Sep 4, 2014).
148. L. Duprez *et al.*, *Immunity* **35**, 908 (Dec 23, 2011).
149. E. E. Varfolomeev *et al.*, *Immunity* **9**, 267 (Aug, 1998).
150. W. C. Yeh *et al.*, *Science* **279**, 1954 (Mar 20, 1998).
151. J. Zhang, D. Cado, A. Chen, N. H. Kabra, A. Winoto, *Nature* **392**, 296 (Mar 19, 1998).
152. W. J. Kaiser *et al.*, *Nature* **471**, 368 (Mar 17, 2011).
153. C. P. Dillon *et al.*, *Cell Rep* **1**, 401 (May 31, 2012).
154. J. A. Rickard *et al.*, *Cell* **157**, 1175 (May 22, 2014).
155. C. P. Dillon *et al.*, *Cell* **157**, 1189 (May 22, 2014).

Literaturverzeichnis

156. Y. Dondelinger, P. Vandenabeele, M. J. Bertrand, *Regulation of RIPK1's cell death function by phosphorylation*. (Cell Cycle. 2016;15(1):5-6. doi: 10.1080/15384101.2015.1112688.).
157. X. Guo *et al.*, *Circulation* **136**, 729 (Aug 22, 2017).
158. D. Siegmund, J. Kums, M. Ehrenschwender, H. Wajant, *Cell Death Dis* **7**, e2375 (Sep 22, 2016).
159. S. L. Petersen *et al.*, *Cell Death Differ* **22**, 1846 (Nov, 2015).
160. A. Wicovsky *et al.*, *Oncogene* **28**, 1769 (Apr 16, 2009).
161. M. Fotin-Mleczek *et al.*, *Journal of cell science* **115**, 2757 (Jul 1, 2002).
162. M. G. Valmiki, J. W. Ramos, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **66**, 814 (Mar, 2009).
163. C. M. Henry, S. J. Martin, *Mol Cell* **65**, 715 (Feb 16, 2017).
164. M. Grunert *et al.*, *Cell Death Dis*. 2012 Oct 25;3:e414. doi: 10.1038/cddis.2012.154.
165. J. L. Bodmer *et al.*, *Nat Cell Biol*. 2000 Apr;2(4):241-3. doi: 10.1038/35008667.
166. A. A. Kuang, G. E. Diehl, J. Zhang, A. Winoto, *J Biol Chem*. 2000 Aug 18;275(33):25065-8. doi: 10.1074/jbc.C000284200.
167. M. R. Sprick *et al.*, *Immunity*. 2000 Jun;12(6):599-609.

9. Anhang

9.1. Einzelwerte der Toxizitäts-Assays

Tab. 9.1.1 TNF- und TRAIL-Stimulation von HeLa und HeLa-RIPK3-Varianten

HeLa-LV	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	7	74 ; 75 ; 76 ; 83 ; 96 ; 97 ; 104	
TNF + Z	3	88 ; 95 ; 101	
TNF + N	3	63 ; 93 ; 97	
TNF + ZN	3	87 ; 89 ; 102	
TNF + C	2	23 ; 25	1,3 ; 3,1
TNF + CZ	7	85 ; 89 ; 92 ; 98 ; 107 ; 109 ; 110	
TNF + CN	2	30 ; 56	
TNF + CZN	5	82 ; 93 ; 106 ; 108 ; 110	
TRAIL	6	82 ; 85 ; 90 ; 91 ; 93 ; 100	
TRAIL + Z	5	94 ; 96 ; 96 ; 101 ; 106	
TRAIL + N	2	63 ; 68	
TRAIL + ZN	3	87 ; 90 ; 98	
TRAIL + C	4	0 ; 1 ; 17 ; 38	0,9 ; 1,5 ; 2 ; 2
TRAIL + CZ	7	80 ; 91 ; 96 ; 97 ; 101 ; 104 ; 106	
TRAIL + CN	3	7 ; 25 ; 37	1 ; 1,2 ; 12
TRAIL + CZN	4	83 ; 91 ; 99 ; 100	

HeLa-RIPK3	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	7	81 ; 84 ; 98 ; 99 ; 102 ; 103 ; 107	
TNF + Z	7	81 ; 83 ; 89 ; 95 ; 98 ; 107 ; 110	
TNF + N	5	85 ; 87 ; 95 ; 99 ; 107	
TNF + ZN	4	87 ; 98 ; 100 ; 103	
TNF + C	4	31 ; 41 ; 43 ; 43	2 ; 13 ; 31 ; 50
TNF + CZ	4	54 ; 59 ; 65 ; 68	
TNF + CN	3	47 ; 55 ; 86	
TNF + CZN	4	93 ; 101 ; 106 ; 108	
TRAIL	11	82 ; 84 ; 91 ; 91 ; 92 ; 94 ; 95 ; 96 ; 96 ; 100 ; 102	
TRAIL + Z	7	78 ; 88 ; 90 ; 92 ; 94 ; 97 ; 102	
TRAIL + N	5	71 ; 75 ; 79 ; 80 ; 81	
TRAIL + ZN	5	85 ; 89 ; 93 ; 98 ; 99	
TRAIL + C	6	0 ; 4 ; 5 ; 7 ; 11 ; 12	0,8 ; 0,8 ; 1 ; 1 ; 1,4 ; 5,3
TRAIL + CZ	5	0 ; 18 ; 22 ; 24 ; 40	0,7 ; 2,6 ; 2,8 ; 3,1 ; 4,7
TRAIL + CN	5	1 ; 7 ; 9 ; 11 ; 22	0,3 ; 0,7 ; 1 ; 1,3 ; 2,5
TRAIL + CZN	4	98 ; 100 ; 102 ; 102	

Kontrolle	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	45	62 ; 68 ; 68 ; 69 ; 72 ; 75 ; 78 ; 78 ; 82 ; 82 ; 83 ; 86 ; 89 ; 90 ; 90 ; 92 ; 92 ; 95 ; 96 ; 96 ; 98 ; 98 ; 99 ; 99 ; 99 ; 100 ; 100 ; 101 ; 102 ; 103 ; 103 ; 104 ; 104 ; 105 ; 105 ; 105 ; 106 ; 106 ; 107 ; 108 ; 108 ; 108 ;	

Anhang

		108 ; 109 ; 110	
TNF + Z	39	80 ; 80 ; 81 ; 82 ; 89 ; 90 ; 91 ; 91 ; 93 ; 95 ; 95 ; 96 ; 96 ; 97 ; 97 ; 98 ; 98 ; 98 ; 99 ; 101 ; 101 ; 102 ; 102 ; 102 ; 102 ; 102 ; 103 ; 103 ; 103 ; 103 ; 104 ; 104 ; 104 ; 106 ; 108 ; 109 ; 110 ; 110 ; 110	
TNF + N	29	82 ; 86 ; 87 ; 91 ; 92 ; 92 ; 93 ; 95 ; 95 ; 95 ; 96 ; 97 ; 98 ; 98 ; 98 ; 99 ; 100 ; 100 ; 100 ; 101 ; 101 ; 101 ; 103 ; 103 ; 104 ; 104 ; 104 ; 105 ; 106	
TNF + ZN	35	80 ; 83 ; 84 ; 84 ; 85 ; 88 ; 90 ; 90 ; 91 ; 92 ; 92 ; 94 ; 94 ; 95 ; 96 ; 96 ; 96 ; 98 ; 98 ; 98 ; 98 ; 99 ; 100 ; 101 ; 101 ; 102 ; 102 ; 102 ; 103 ; 104 ; 105 ; 107 ; 107 ; 109 ; 110	
TNF + C	9	0 ; 6 ; 16 ; 21 ; 28 ; 32 ; 35 ; 37 ; 40	0,2 ; 0,2 ; 0,2 ; 0,6 ; 0,6 ; 2,2 ; 5,2 ; 5,2 ; 7,9
TNF + CZ	4	9 ; 14 ; 25 ; 29	0,005 ; 0,03 ; 0,2 ; 5,2
TNF + CN	21	50 ; 51 ; 51 ; 52 ; 52 ; 56 ; 58 ; 59 ; 60 ; 61 ; 61 ; 63 ; 65 ; 65 ; 67 ; 68 ; 72 ; 77 ; 82 ; 83 ; 84	
TNF + CZN	23	82 ; 82 ; 83 ; 85 ; 86 ; 86 ; 88 ; 89 ; 92 ; 93 ; 93 ; 93 ; 94 ; 101 ; 101 ; 103 ; 103 ; 104 ; 105 ; 105 ; 106 ; 107 ; 108	
TRAIL	33	70 ; 71 ; 71 ; 73 ; 73 ; 74 ; 78 ; 79 ; 81 ; 81 ; 82 ; 82 ; 83 ; 86 ; 87 ; 88 ; 88 ; 88 ; 89 ; 90 ; 90 ; 92 ; 94 ; 94 ; 95 ; 96 ; 97 ; 97 ; 98 ; 98 ; 100 ; 103 ; 107	
TRAIL + Z	27	52 ; 55 ; 57 ; 59 ; 60 ; 60 ; 62 ; 66 ; 68 ; 74 ; 75 ; 78 ; 79 ; 81 ; 82 ; 82 ; 85 ; 88 ; 89 ; 91 ; 93 ; 95 ; 97 ; 98 ; 100 ; 101 ; 101	
TRAIL + N	17	51 ; 53 ; 54 ; 56 ; 58 ; 58 ; 59 ; 59 ; 64 ; 65 ; 66 ; 67 ; 72 ; 72 ; 82 ; 86 ; 87	
TRAIL + ZN	25	80 ; 83 ; 85 ; 86 ; 86 ; 88 ; 90 ; 90 ; 92 ; 93 ; 93 ; 94 ; 94 ; 95 ; 97 ; 98 ; 99 ; 99 ; 99 ; 99 ; 102 ; 102 ; 104 ; 108 ; 109	
TRAIL + C	19	0 ; 0 ; 2 ; 3 ; 4 ; 4 ; 5 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 8 ; 8 ; 9 ; 9 ; 9 ; 11 ; 12 ; 22	0,5 ; 0,8 ; 1 ; 1,4 ; 1,4 ; 1,4 ; 1,5 ; 1,6 ; 1,6 ; 1,8 ; 1,8 ; 2,1 ; 2,1 ; 3,2 ; 3,5 ; 4 ; 4,6 ; 5,7 ; 8,1
TRAIL + CZ	8	11 ; 18 ; 22 ; 31 ; 32 ; 32 ; 32 ; 46	2,9 ; 3 ; 3,1 ; 3,9 ; 4,2 ; 4,2 ; 4,7 ; 4,9
TRAIL + CN	5	0 ; 3 ; 3 ; 11 ; 14	1,1 ; 2,4 ; 3,9 ; 4,7 ; 8,1
TRAIL + CZN	17	90 ; 91 ; 91 ; 93 ; 94 ; 94 ; 96 ; 97 ; 98 ; 99 ; 99 ; 100 ; 102 ; 103 ; 106 ; 106 ; 109	

Anhang

FADD_{KO}	n=	%	EC₅₀ (ng/ml)
TNF	20	0 ; 0 ; 0 ; 1 ; 1 ; 1 ; 1 ; 1 ; 2 ; 2 ; 2 ; 3 ; 3 ; 6 ; 11 ; 15 ; 19 ; 25 ; 31 ; 40 ; 40	0,02 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,4 ; 0,4 ; 0,4 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,6 ; 0,8 ; 0,8 ; 0,8 ; 1 ; 1,5 ; 2,8 ; 3,4
TNF + Z	4	0 ; 5 ; 11 ; 13	0,05 ; 0,2 ; 0,2 ; 1
TNF + N	21	82 ; 85 ; 86 ; 89 ; 89 ; 90 ; 94 ; 94 ; 95 ; 98 ; 99 ; 99 ; 99 ; 99 ; 100 ; 100 ; 100 ; 103 ; 105 ; 106 ; 109	
TNF + ZN	25	85 ; 86 ; 88 ; 90 ; 90 ; 91 ; 95 ; 96 ; 97 ; 98 ; 99 ; 99 ; 102 ; 103 ; 103 ; 103 ; 103 ; 105 ; 105 ; 105 ; 107 ; 108 ; 108 ; 110 ; 110	
TNF + C	5	1 ; 8 ; 36 ; 40 ; 41	0,002 ; 0,004 ; 0,008 ; 0,008 ; 0,1
TNF + CZ	4	6 ; 21 ; 22 ; 41	0,02 ; 0,03 ; 0,06 ; 0,08
TNF + CN	16	81 ; 85 ; 85 ; 89 ; 93 ; 94 ; 95 ; 95 ; 97 ; 100 ; 103 ; 103 ; 104 ; 104 ; 104 ; 106	
TNF + CZN	20	80 ; 80 ; 86 ; 91 ; 91 ; 92 ; 93 ; 94 ; 98 ; 101 ; 101 ; 102 ; 103 ; 104 ; 104 ; 105 ; 106 ; 106 ; 107 ; 108	
TRAIL	31	81 ; 82 ; 83 ; 87 ; 88 ; 88 ; 88 ; 88 ; 91 ; 92 ; 92 ; 94 ; 94 ; 94 ; 98 ; 98 ; 100 ; 100 ; 101 ; 102 ; 102 ; 103 ; 103 ; 103 ; 104 ; 105 ; 107 ; 107 ; 107 ; 109 ; 110	
TRAIL + Z	28	62 ; 65 ; 65 ; 67 ; 68 ; 83 ; 86 ; 89 ; 90 ; 90 ; 91 ; 93 ; 93 ; 95 ; 96 ; 97 ; 97 ; 99 ; 100 ; 101 ; 101 ; 101 ; 102 ; 104 ; 104 ; 106 ; 108 ; 109	
TRAIL + N	26	78 ; 81 ; 82 ; 86 ; 87 ; 89 ; 91 ; 90 ; 90 ; 90 ; 94 ; 94 ; 94 ; 95 ; 95 ; 96 ; 97 ; 98 ; 99 ; 99 ; 103 ; 106 ; 107 ; 108 ; 109 ; 110	
TRAIL + ZN	22	84 ; 84 ; 86 ; 87 ; 89 ; 91 ; 93 ; 94 ; 96 ; 97 ; 97 ; 97 ; 98 ; 98 ; 99 ; 102 ; 106 ; 106 ; 107 ; 109 ; 109 ; 110	
TRAIL + C	31	62 ; 64 ; 65 ; 66 ; 78 ; 78 ; 80 ; 82 ; 82 ; 83 ; 86 ; 86 ; 87 ; 88 ; 88 ; 89 ; 89 ; 90 ; 91 ; 91 ; 93 ; 94 ; 95 ; 95 ; 96 ; 96 ; 99 ; 100 ; 107 ; 107 ; 109	
TRAIL + CZ	22	63 ; 69 ; 71 ; 72 ; 80 ; 82 ; 83 ; 85 ; 86 ; 87 ; 87 ; 96 ; 97 ; 97 ; 97 ; 98 ; 98 ; 100 ; 101 ; 102 ; 108 ; 109	
TRAIL + CN	22	68 ; 70 ; 71 ; 72 ; 79 ; 80 ; 81 ; 82 ; 84 ; 85 ; 92 ; 92 ; 97 ; 97 ; 97 ; 98 ; 98 ; 99 ; 100 ; 103 ; 106 ; 108	
TRAIL + CZN	17	80 ; 81 ; 81 ; 82 ; 82 ; 84 ; 88 ; 89 ; 94 ; 95 ; 97 ; 99 ; 99 ; 100 ; 101 ; 107 ; 109	

Anhang

TRADD_{KO}	n=	%	EC₅₀ (ng/ml)
TNF	29	71 ; 82 ; 83 ; 85 ; 87 ; 88 ; 89 ; 89 ; 90 ; 90 ; 90 ; 92 ; 92 ; 92 ; 94 ; 94 ; 94 ; 94 ; 96 ; 97 ; 98 ; 98 ; 99 ; 99 ; 102 ; 102 ; 105 ; 106 ; 106	
TNF + Z	28	60 ; 62 ; 63 ; 67 ; 67 ; 67 ; 68 ; 75 ; 80 ; 81 ; 82 ; 84 ; 85 ; 85 ; 88 ; 88 ; 89 ; 91 ; 92 ; 92 ; 93 ; 94 ; 95 ; 98 ; 98 ; 100 ; 101 ; 104	
TNF + N	26	76 ; 76 ; 78 ; 79 ; 80 ; 81 ; 81 ; 84 ; 86 ; 87 ; 88 ; 88 ; 89 ; 90 ; 91 ; 91 ; 93 ; 93 ; 94 ; 95 ; 96 ; 100 ; 103 ; 104 ; 104 ; 107	
TNF + ZN	22	81 ; 84 ; 84 ; 87 ; 90 ; 92 ; 93 ; 94 ; 96 ; 96 ; 96 ; 97 ; 97 ; 98 ; 98 ; 99 ; 101 ; 104 ; 105 ; 108 ; 109 ; 110	
TNF + C	6	0 ; 0 ; 0 ; 2 ; 10 ; 36	0,009 ; 0,03 ; 0,03 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,2
TNF + CZ	4	19 ; 21 ; 21 ; 28	0,002 ; 0,008 ; 0,03 ; 0,07
TNF + CN	4	20 ; 23 ; 27 ; 43	0,04 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,2
TNF + CZN	17	80 ; 81 ; 86 ; 88 ; 89 ; 89 ; 92 ; 93 ; 97 ; 97 ; 98 ; 99 ; 100 ; 105 ; 106 ; 107 ; 107	
TRAIL	16	80 ; 82 ; 85 ; 87 ; 88 ; 90 ; 91 ; 93 ; 95 ; 96 ; 97 ; 99 ; 100 ; 100 ; 101 ; 103	
TRAIL + Z	10	63 ; 64 ; 70 ; 76 ; 87 ; 92 ; 93 ; 94 ; 96 ; 99	
TRAIL + N	9	69 ; 70 ; 74 ; 75 ; 77 ; 84 ; 87 ; 88 ; 89	
TRAIL + ZN	12	90 ; 93 ; 93 ; 93 ; 97 ; 100 ; 100 ; 101 ; 107 ; 109 ; 110 ; 110	
TRAIL + C	9	0 ; 0 ; 1 ; 1 ; 9 ; 9 ; 15 ; 17 ; 23	0,04 ; 0,3 ; 0,6 ; 0,9 ; 1,9 ; 2,9 ; 3,3 ; 3,6 ; 4
TRAIL + CZ	6	0 ; 0 ; 6 ; 16 ; 17 ; 28	1 ; 1,1 ; 1,6 ; 2,3 ; 2,4 ; 2,7
TRAIL + CN	5	8 ; 8 ; 15 ; 16 ; 28	2 ; 2,4 ; 2,7 ; 5,2 ; 8,9
TRAIL + CZN	9	87 ; 91 ; 95 ; 95 ; 96 ; 97 ; 98 ; 100 ; 109	

RIPK1_{KO}	n=	%	EC₅₀ (ng/ml)
TNF	24	80 ; 87 ; 87 ; 88 ; 92 ; 93 ; 95 ; 96 ; 97 ; 97 ; 98 ; 98 ; 100 ; 100 ; 100 ; 102 ; 103 ; 104 ; 105 ; 106 ; 106 ; 107 ; 110 ; 110	
TNF + Z	19	92 ; 94 ; 94 ; 95 ; 96 ; 97 ; 97 ; 98 ; 98 ; 100 ; 101 ; 101 ; 105 ; 106 ; 107 ; 108 ; 108 ; 108 ; 109	
TNF + N	21	72 ; 73 ; 75 ; 83 ; 84 ; 87 ; 88 ; 89 ; 92 ; 92 ; 93 ; 94 ; 94 ; 94 ; 99 ; 99 ; 100 ; 101 ; 102 ; 105 ; 106	
TNF + ZN	17	80 ; 88 ; 91 ; 93 ; 95 ; 96 ; 96 ; 98 ;	

Anhang

		98 ; 98 ; 99 ; 101 ; 104 ; 106 ; 106 ; 107 ; 109	
TNF + C	7	6 ; 13 ; 14 ; 21 ; 28 ; 28 ; 43	0,1 ; 0,2 ; 0,2 ; 0,6 ; 0,6 ; 1,2 ; 5,2
TNF + CZ	15	89 ; 91 ; 92 ; 93 ; 94 ; 94 ; 95 ; 96 ; 97 ; 99 ; 99 ; 101 ; 101 ; 106 ; 110	
TNF + CN	4	15 ; 26 ; 35 ; 45	0,5 ; 0,6 ; 7 ; 31
TNF + CZN	15	87 ; 87 ; 93 ; 96 ; 97 ; 97 ; 98 ; 98 ; 101 ; 102 ; 102 ; 104 ; 104 ; 105 ; 107	
TRAIL	21	71 ; 72 ; 73 ; 79 ; 80 ; 81 ; 83 ; 83 ; 84 ; 85 ; 88 ; 88 ; 88 ; 89 ; 91 ; 92 ; 93 ; 94 ; 97 ; 100 ; 107	
TRAIL + Z	15	81 ; 83 ; 89 ; 92 ; 94 ; 94 ; 96 ; 98 ; 98 ; 100 ; 100 ; 100 ; 102 ; 105 ; 106	
TRAIL + N	13	65 ; 69 ; 69 ; 71 ; 72 ; 73 ; 78 ; 81 ; 82 ; 83 ; 84 ; 87 ; 88	
TRAIL + ZN	16	83 ; 86 ; 86 ; 87 ; 89 ; 90 ; 92 ; 93 ; 94 ; 95 ; 95 ; 99 ; 101 ; 101 ; 103 ; 107	
TRAIL + C	7	4 ; 4 ; 7 ; 8 ; 9 ; 16 ; 18	2,1 ; 2,8 ; 3 ; 3 ; 3,3 ; 3,4 ; 4,5
TRAIL + CZ	12	80 ; 83 ; 88 ; 90 ; 92 ; 93 ; 95 ; 97 ; 99 ; 106 ; 108 ; 109	
TRAIL + CN	5	1 ; 3 ; 11 ; 18 ; 23	0,2 ; 0,3 ; 1,1 ; 1,1 ; 2,7
TRAIL + CZN	11	85 ; 87 ; 91 ; 92 ; 96 ; 97 ; 97 ; 98 ; 99 ; 101 ; 101	

FADD/ RIPK1_{DKO}	n=	%	EC₅₀ (ng/ml)
TNF	19	85 ; 86 ; 91 ; 91 ; 91 ; 97 ; 97 ; 97 ; 98 ; 100 ; 103 ; 106 ; 106 ; 106 ; 106 ; 107 ; 108 ; 110 ; 110	
TNF + Z	17	91 ; 93 ; 94 ; 95 ; 97 ; 97 ; 98 ; 99 ; 100 ; 101 ; 102 ; 102 ; 104 ; 106 ; 107 ; 109 ; 110	
TNF + N	15	89 ; 90 ; 90 ; 92 ; 92 ; 93 ; 94 ; 94 ; 94 ; 95 ; 96 ; 96 ; 100 ; 100 ; 104	
TNF + ZN	15	82 ; 89 ; 91 ; 92 ; 95 ; 96 ; 97 ; 98 ; 98 ; 99 ; 99 ; 99 ; 100 ; 108 ; 109	
TNF + C	11	80 ; 81 ; 87 ; 90 ; 95 ; 95 ; 96 ; 98 ; 101 ; 103 ; 106	
TNF + CZ	15	70 ; 73 ; 82 ; 83 ; 86 ; 89 ; 91 ; 94 ; 97 ; 98 ; 99 ; 101 ; 104 ; 105 ; 105	
TNF + CN	12	71 ; 73 ; 75 ; 84 ; 94 ; 95 ; 95 ; 96 ; 96 ; 97 ; 100 ; 103	
TNF + CZN	11	83 ; 90 ; 96 ; 96 ; 96 ; 97 ; 100 ; 102 ; 104 ; 104 ; 109	
TRAIL	12	91 ; 94 ; 96 ; 96 ; 98 ; 98 ; 100 ; 101 ; 103 ; 103 ; 104 ; 106	
TRAIL + Z	16	78 ; 79 ; 87 ; 95 ; 96 ; 97 ; 99 ; 99 ;	

Anhang

		99 ; 101 ; 103 ; 103 ; 105 ; 105 ; 105 ; 110	
TRAIL + N	16	80 ; 81 ; 85 ; 87 ; 89 ; 91 ; 91 ; 92 ; 96 ; 96 ; 96 ; 97 ; 98 ; 99 ; 99 ; 101	
TRAIL + ZN	19	86 ; 88 ; 88 ; 89 ; 90 ; 90 ; 91 ; 92 ; 94 ; 97 ; 97 ; 98 ; 100 ; 100 ; 101 ; 102 ; 103 ; 105 ; 106	
TRAIL + C	14	69 ; 78 ; 80 ; 81 ; 85 ; 87 ; 87 ; 87 ; 88 ; 92 ; 92 ; 96 ; 97 ; 101	
TRAIL + CZ	11	73 ; 79 ; 81 ; 84 ; 85 ; 91 ; 91 ; 92 ; 92 ; 93 ; 104	
TRAIL + CN	12	75 ; 75 ; 77 ; 78 ; 78 ; 81 ; 85 ; 88 ; 92 ; 104 ; 107 ; 109	
TRAIL + CZN	10	85 ; 88 ; 92 ; 95 ; 97 ; 98 ; 98 ; 98 ; 98 ; 98	

FADD/ TRADD_{DKO}	n=	%	EC₅₀ (ng/ml)
TNF	16	71 ; 79 ; 81 ; 81 ; 82 ; 84 ; 90 ; 91 ; 92 ; 92 ; 93 ; 93 ; 93 ; 96 ; 100 ; 100	
TNF + Z	12	73 ; 76 ; 76 ; 79 ; 80 ; 81 ; 84 ; 89 ; 89 ; 94 ; 95 ; 95	
TNF + N	17	70 ; 73 ; 77 ; 81 ; 84 ; 87 ; 87 ; 89 ; 91 ; 93 ; 93 ; 94 ; 99 ; 100 ; 101 ; 102 ; 106	
TNF + ZN	16	81 ; 90 ; 91 ; 92 ; 92 ; 94 ; 95 ; 97 ; 99 ; 100 ; 100 ; 104 ; 105 ; 106 ; 106 ; 110	
TNF + C	4	0 ; 0 ; 6 ; 18	0,0004 ; 0,03 ; 0,04 ; 1,1
TNF + CZ	4	0 ; 1 ; 2 ; 40	0,003 ; 0,006 ; 0,02 ; 0,1
TNF + CN	8	50 ; 52 ; 61 ; 68 ; 72 ; 72 ; 83 ; 89	
TNF + CZN	11	80 ; 83 ; 86 ; 90 ; 93 ; 97 ; 97 ; 99 ; 101 ; 102 ; 108	
TRAIL	10	67 ; 70 ; 70 ; 74 ; 78 ; 83 ; 90 ; 91 ; 91 ; 93	
TRAIL + Z	11	59 ; 60 ; 68 ; 71 ; 73 ; 77 ; 82 ; 82 ; 85 ; 88 ; 96	
TRAIL + N	10	58 ; 58 ; 63 ; 68 ; 75 ; 77 ; 81 ; 90 ; 98 ; 101	
TRAIL + ZN	15	83 ; 88 ; 90 ; 91 ; 91 ; 92 ; 92 ; 92 ; 95 ; 95 ; 95 ; 103 ; 103 ; 105 ; 108	
TRAIL + C	9	52 ; 55 ; 63 ; 63 ; 74 ; 78 ; 78 ; 88 ; 93	
TRAIL + CZ	5	83 ; 86 ; 95 ; 100 ; 110	
TRAIL + CN	7	54 ; 64 ; 67 ; 72 ; 78 ; 92 ; 99	
TRAIL + CZN	10	81 ; 81 ; 84 ; 89 ; 96 ; 97 ; 98 ; 100 ; 102 ; 105	

Anhang

TRADD/ RIPK1_{DKO}	n=	%	EC₅₀ (ng/ml)
TNF	30	82 ; 89 ; 89 ; 89 ; 89 ; 93 ; 94 ; 94 ; 95 ; 95 ; 95 ; 96 ; 96 ; 97 ; 97 ; 98 ; 98 ; 98 ; 98 ; 100 ; 100 ; 100 ; 101 ; 102 ; 102 ; 103 ; 103 ; 103 ; 104 ; 105 ; 107	
TNF + Z	18	86 ; 88 ; 92 ; 93 ; 93 ; 93 ; 94 ; 94 ; 95 ; 96 ; 98 ; 100 ; 101 ; 102 ; 102 ; 108 ; 109 ; 109	
TNF + N	22	83 ; 83 ; 85 ; 88 ; 88 ; 88 ; 89 ; 91 ; 91 ; 92 ; 93 ; 94 ; 96 ; 96 ; 97 ; 99 ; 99 ; 99 ; 101 ; 102 ; 103 ; 107	
TNF + ZN	22	80 ; 80 ; 82 ; 83 ; 86 ; 87 ; 88 ; 89 ; 90 ; 90 ; 91 ; 91 ; 92 ; 94 ; 96 ; 97 ; 98 ; 102 ; 102 ; 103 ; 103 ; 104	
TNF + C	13	69 ; 76 ; 77 ; 78 ; 79 ; 81 ; 81 ; 82 ; 85 ; 85 ; 85 ; 86 ; 90 ; 90 ; 91 ; 91 ; 93 ; 94 ; 95 ; 95 ; 97 ; 103 ; 106	
TNF + CZ	16	83 ; 85 ; 88 ; 92 ; 93 ; 93 ; 94 ; 95 ; 97 ; 98 ; 101 ; 103 ; 104 ; 108 ; 109 ; 110	
TNF + CN	19	74 ; 81 ; 83 ; 83 ; 83 ; 85 ; 87 ; 88 ; 89 ; 91 ; 92 ; 93 ; 93 ; 93 ; 95 ; 96 ; 97 ; 98 ; 101	
TNF + CZN	15	81 ; 86 ; 87 ; 92 ; 93 ; 95 ; 98 ; 100 ; 103 ; 104 ; 104 ; 105 ; 105 ; 106 ; 108	
TRAIL	13	53 ; 56 ; 60 ; 73 ; 75 ; 78 ; 81 ; 83 ; 85 ; 93 ; 93 ; 93	
TRAIL + Z	12	78 ; 81 ; 82 ; 89 ; 89 ; 91 ; 94 ; 95 ; 99 ; 100 ; 102 ; 103	
TRAIL + N	9	51 ; 52 ; 62 ; 65 ; 70 ; 72 ; 78 ; 79 ; 83	
TRAIL + ZN	10	86 ; 89 ; 94 ; 95 ; 101 ; 101 ; 101 ; 102 ; 106 ; 107	
TRAIL + C	4	0 ; 0 ; 23 ; 26	0,1 ; 0,6 ; 1,1 ; 25
TRAIL + CZ	8	85 ; 91 ; 94 ; 96 ; 101 ; 103 ; 106 ; 109	
TRAIL + CN	4	3 ; 6 ; 14 ; 23	0,2 ; 0,3 ; 0,3 ; 2,9
TRAIL + CZN	11	84 ; 85 ; 94 ; 95 ; 95 ; 98 ; 99 ; 103 ; 103 ; 105 ; 107	

casp-8_{KO}	n=	%	EC₅₀ (ng/ml)
TNF	14	81 ; 81 ; 82 ; 83 ; 85 ; 86 ; 86 ; 88 ; 90 ; 93 ; 93 ; 94 ; 95 ; 102	
TNF + Z	17	78 ; 80 ; 81 ; 83 ; 83 ; 84 ; 89 ; 89 ; 90 ; 90 ; 91 ; 93 ; 93 ; 103 ; 104 ; 106 ; 106	
TNF + N	12	88 ; 88 ; 92 ; 93 ; 95 ; 96 ; 100 ; 103 ; 105 ; 105 ; 106 ; 107	
TNF + ZN	12	89 ; 92 ; 95 ; 95 ; 95 ; 97 ; 102 ;	

Anhang

		103 ; 106 ; 106 ; 108 ; 109	
TNF + C	16	50 ; 52 ; 53 ; 56 ; 57 ; 59 ; 60 ; 61 ; 63 ; 64 ; 65 ; 66 ; 67 ; 69 ; 74 ; 78	
TNF + CZ	12	55 ; 56 ; 57 ; 57 ; 58 ; 59 ; 60 ; 65 ; 72 ; 72 ; 73 ; 77	
TNF + CN	15	86 ; 87 ; 93 ; 93 ; 97 ; 97 ; 98 ; 99 ; 99 ; 100 ; 101 ; 102 ; 103 ; 105 ; 109	
TNF + CZN	15	81 ; 82 ; 89 ; 89 ; 92 ; 93 ; 93 ; 98 ; 101 ; 101 ; 102 ; 103 ; 107 ; 108 ; 108	
TRAIL	15	72 ; 73 ; 74 ; 74 ; 80 ; 81 ; 86 ; 87 ; 88 ; 89 ; 93 ; 93 ; 97 ; 100 ; 102	
TRAIL + Z	13	51 ; 53 ; 63 ; 70 ; 77 ; 77 ; 79 ; 81 ; 82 ; 88 ; 88 ; 94 ; 98	
TRAIL + N	10	90 ; 94 ; 95 ; 96 ; 97 ; 100 ; 102 ; 103 ; 104 ; 105	
TRAIL + ZN	9	94 ; 97 ; 98 ; 99 ; 100 ; 101 ; 103 ; 103 ; 106	
TRAIL + C	13	52 ; 52 ; 54 ; 63 ; 65 ; 65 ; 65 ; 67 ; 69 ; 70 ; 73 ; 74 ; 76	
TRAIL + CZ	8	54 ; 56 ; 61 ; 63 ; 64 ; 65 ; 67 ; 68	
TRAIL + CN	13	77 ; 78 ; 79 ; 89 ; 90 ; 90 ; 92 ; 95 ; 96 ; 96 ; 98 ; 101 ; 109	
TRAIL + CZN	10	82 ; 85 ; 92 ; 93 ; 99 ; 100 ; 100 ; 104 ; 105 ; 106	

n= Anzahl der Experimente ; %= Vitalität; EC₅₀= Konzentration bei 50% Vitalität; C= CHX
N= Necrostatin-1 ; Z= ZVAD

Tab. 9.1.2 TWEAK-Inkubation in Kombination mit TNF- und TRAIL-Stimulation von HeLa und HeLa-RIPK3-Varianten

Kontrolle	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	10	50 ; 51 ; 54 ; 62 ; 63 ; 68 ; 68 ; 68 ; 71 ; 72 ; 76 ; 78 ; 80 ; 81 ; 81 ; 84 ; 84 ; 92 ; 96 ; 101	
TNF + Z	4	0 ; 12 ; 13 ; 17	0,0002 ; 0,002 ; 0,01 ; 0,06
TNF + N	20	50 ; 53 ; 54 ; 61 ; 61 ; 62 ; 64 ; 65 ; 67 ; 68 ; 75 ; 77 ; 79 ; 84 ; 90 ; 94 ; 95 ; 95 ; 102 ; 105	
TNF + ZN	12	92 ; 94 ; 95 ; 96 ; 97 ; 102 ; 102 ; 103 ; 105 ; 106 ; 107 ; 108	
TNF + C	8	0 ; 1 ; 4 ; 9 ; 10 ; 11 ; 13 ; 23	0,01 ; 0,02 ; 0,02 ; 0,02 ; 0,02 ; 0,04 ; 0,04 ; 0,07
TNF + CZ	4	0 ; 7 ; 33 ; 46	0,00002 ; 0,0006 ; 0,07 ; 0,9
TNF + CN	4	0 ; 1 ; 4 ; 7	0,003 ; 0,02 ; 0,02 ; 0,06
TNF + CZN	8	82 ; 83 ; 85 ; 89 ; 100 ; 103 ; 106 ; 107	
TRAIL	7	0 ; 2 ; 7 ; 16 ; 34 ; 34 ; 47	2,5 ; 3,8 ; 5,5 ; 32 ; 48 ; 56 ; 85
TRAIL + Z	4	2 ; 6 ; 7 ; 20	0,2 ; 0,3 ; 0,9 ; 4,5
TRAIL + N	4	0 ; 6 ; 27 ; 48	7 ; 15 ; 39 ; 90

Anhang

TRAIL + ZN	6	84 ; 90 ; 94 ; 95 ; 97 ; 101	
TRAIL + C	5	4 ; 10 ; 10 ; 11 ; 20	0,3 ; 0,5 ; 2,9 ; 3,8 ; 5,7
TRAIL + CZ	4	2 ; 19 ; 35 ; 38	0,2 ; 0,8 ; 1,6 ; 1,9
TRAIL + CN	4	0 ; 9 ; 19 ; 43	0,3 ; 0,8 ; 1,4 ; 3
TRAIL + CZN	3	102 ; 102 ; 105	

FADD_{KO}	n=	%	EC₅₀ (ng/ml)
TNF	13	0 ; 0 ; 1 ; 1 ; 1 ; 2 ; 2 ; 2 ; 5 ; 11 ; 14 ; 21 ; 51	0,00004 ; 0,0005 ; 0,0007 ; 0,001 ; 0,002 ; 0,004 ; 0,01 ; 0,01 ; 0,01 ; 0,01 ; 0,03 ; 0,06 ; 0,09
TNF + Z	4	0 ; 0 ; 1 ; 16	0,0000002 ; 0,0000002 ; 0,00004 ; 0,00005
TNF + N	17	61 ; 67 ; 82 ; 85 ; 88 ; 92 ; 93 ; 93 ; 95 ; 96 ; 97 ; 99 ; 99 ; 102 ; 104 ; 106 ; 107	
TNF + ZN	15	85 ; 86 ; 86 ; 87 ; 93 ; 94 ; 95 ; 99 ; 90 ; 95 ; 100 ; 100 ; 101 ; 103 ; 103	
TNF + C	4	0 ; 6 ; 26 ; 38	0,00005 ; 0,001 ; 0,002 ; 0,02
TNF + CZ	4	0 ; 8 ; 16 ; 33	0,001 ; 0,001 ; 0,003 ; 0,01
TNF + CN	12	81 ; 82 ; 86 ; 90 ; 95 ; 96 ; 96 ; 101 ; 102 ; 105 ; 108 ; 108	
TNF + CZN	12	81 ; 82 ; 83 ; 83 ; 91 ; 92 ; 93 ; 96 ; 96 ; 103 ; 103 ; 108	
TRAIL	17	73 ; 73 ; 77 ; 78 ; 81 ; 82 ; 88 ; 91 ; 92 ; 93 ; 93 ; 94 ; 95 ; 98 ; 99 ; 100 ; 109	
TRAIL + Z	14	71 ; 74 ; 82 ; 84 ; 84 ; 85 ; 86 ; 88 ; 92 ; 95 ; 96 ; 98 ; 100 ; 103	
TRAIL + N	14	76 ; 86 ; 87 ; 87 ; 88 ; 91 ; 93 ; 93 ; 94 ; 95 ; 99 ; 103 ; 103 ; 110	
TRAIL + ZN	10	91 ; 91 ; 91 ; 92 ; 96 ; 97 ; 97 ; 102 ; 103 ; 106	
TRAIL + C	13	64 ; 71 ; 73 ; 76 ; 81 ; 82 ; 86 ; 86 ; 92 ; 92 ; 95 ; 98 ; 98	
TRAIL + CZ	11	66 ; 74 ; 84 ; 85 ; 85 ; 92 ; 93 ; 96 ; 97 ; 97 ; 103	
TRAIL + CN	12	74 ; 77 ; 80 ; 82 ; 83 ; 84 ; 85 ; 89 ; 92 ; 92 ; 105 ; 106	
TRAIL + CZN	10	80 ; 80 ; 86 ; 93 ; 98 ; 100 ; 100 ; 101 ; 102 ; 110	

TRADD_{KO}	n=	%	EC₅₀ (ng/ml)
TNF	9	0 ; 1 ; 3 ; 4 ; 4 ; 6 ; 6 ; 23 ; 16	0,01 ; 0,02 ; 0,06 ; 0,06 ; 0,06 ; 0,1 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,2
TNF + Z	4	0 ; 0 ; 18 ; 24	0,0001 ; 0,001 ; 0,002 ; 0,006
TNF + N	15	54 ; 57 ; 58 ; 59 ; 62 ; 62 ; 73 ; 76 ; 76 ; 77 ; 78 ; 79 ; 79 ; 80 ; 86	
TNF + ZN	13	85 ; 86 ; 87 ; 88 ; 89 ; 93 ; 98 ; 98 ; 99 ; 106 ; 108 ; 110 ; 110	
TNF + C	4	0 ; 1 ; 1 ; 1	0,001 ; 0,002 ; 0,008 ; 0,009

Anhang

TNF + CZ	4	7 ; 7 ; 31 ; 39	0,001 ; 0,002 ; 0,003 ; 0,003
TNF + CN	4	0 ; 0 ; 2 ; 20	0,0002 ; 0,008 ; 0,01 ; 0,03
TNF + CZN	7	82 ; 88 ; 92 ; 95 ; 98 ; 101 ; 108	
TRAIL	6	2 ; 2 ; 7 ; 9 ; 16 ; 20	4,9 ; 6,7 ; 7,3 ; 9,4 ; 15 ; 29
TRAIL + Z	4	0 ; 1 ; 1 ; 2	0,04 ; 0,8 ; 1 ; 1,1
TRAIL + N	5	56 ; 58 ; 60 ; 61 ; 75	
TRAIL + ZN	10	89 ; 89 ; 90 ; 91 ; 92 ; 93 ; 97 ; 98 ; 103 ; 104 ;	
TRAIL + C	4	0 ; 0 ; 1 ; 13	0,04 ; 0,4 ; 0,5 ; 1,2
TRAIL + CZ	5	0 ; 0 ; 0 ; 0 ; 24	0,3 ; 0,4 ; 0,6 ; 1,4 ; 2,3
TRAIL + CN	5	0 ; 3 ; 4 ; 5 ; 16	0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,6 ; 3,9
TRAIL + CZN	4	78 ; 94 ; 97 ; 120	

RIPK1_{KO}	n=	%	EC₅₀ (ng/ml)
TNF	10	90 ; 91 ; 93 ; 97 ; 97 ; 98 ; 104 ; 104 ; 105 ; 106	
TNF + Z	9	91 ; 91 ; 92 ; 87 ; 94 ; 100 ; 106 ; 106 ; 110	
TNF + N	11	70 ; 73 ; 73 ; 85 ; 88 ; 95 ; 96 ; 100 ; 101 ; 102 ; 106	
TNF + ZN	9	82 ; 90 ; 96 ; 98 ; 100 ; 100 ; 100 ; 102 ; 105	
TNF + C	7	1 ; 11 ; 16 ; 26 ; 28 ; 31 ; 33	0,04 ; 0,09 ; 0,2 ; 0,2 ; 0,5 ; 2 ; 2
TNF + CZ	7	82 ; 90 ; 93 ; 93 ; 98 ; 100 ; 101	
TNF + CN	5	0 ; 19 ; 19 ; 28 ; 33	0,02 ; 0,08 ; 0,2 ; 0,6 ; 3,3
TNF + CZN	6	85 ; 87 ; 87 ; 96 ; 98 ; 104	
TRAIL	8	73 ; 75 ; 76 ; 81 ; 88 ; 88 ; 92 ; 102	
TRAIL + Z	8	72 ; 75 ; 93 ; 99 ; 101 ; 103 ; 106 ; 106	
TRAIL + N	4	58 ; 73 ; 82 ; 87 ; 87	
TRAIL + ZN	6	94 ; 96 ; 96 ; 98 ; 101 ; 101	
TRAIL + C	4	0 ; 0 ; 0 ; 6	0,4 ; 0,9 ; 1 ; 2,1
TRAIL + CZ	4	71 ; 78 ; 79 ; 88	
TRAIL + CN	4	0 ; 3 ; 5 ; 29	1,1 ; 1,3 ; 1,3 ; 2,3
TRAIL + CZN	3	99 ; 105 ; 106	

FADD/ RIPK1_{DKO}	n=	%	EC₅₀ (ng/ml)
TNF	14	90 ; 91 ; 92 ; 94 ; 96 ; 97 ; 99 ; 100 ; 101 ; 102 ; 102 ; 103 ; 105 ; 106	
TNF + Z	13	83 ; 87 ; 94 ; 95 ; 97 ; 98 ; 98 ; 98 ; 100 ; 104 ; 105 ; 106 ; 110	
TNF + N	14	79 ; 86 ; 86 ; 94 ; 94 ; 95 ; 97 ; 97 ; 99 ; 100 ; 100 ; 104 ; 105 ; 108	
TNF + ZN	12	86 ; 90 ; 90 ; 91 ; 91 ; 95 ; 97 ; 98 ; 99 ; 101 ; 101 ; 101	
TNF + C	8	84 ; 84 ; 95 ; 97 ; 97 ; 98 ; 103 ; 106	
TNF + CZ	8	79 ; 83 ; 93 ; 98 ; 99 ; 99 ; 103 ; 103	

Anhang

TNF + CN	9	77 ; 78 ; 89 ; 92 ; 96 ; 102 ; 105 ; 108	
TNF + CZN	6	80 ; 91 ; 94 ; 97 ; 98 ; 103	
TRAIL	10	86 ; 91 ; 94 ; 94 ; 97 ; 102 ; 102 ; 104 ; 106 ; 106	
TRAIL + Z	8	86 ; 92 ; 95 ; 96 ; 97 ; 97 ; 98 ; 101	
TRAIL + N	9	85 ; 87 ; 90 ; 91 ; 91 ; 95 ; 97 ; 98 ; 102	
TRAIL + ZN	11	84 ; 88 ; 90 ; 91 ; 95 ; 95 ; 97 ; 97 ; 97 ; 98 ; 104	
TRAIL + C	4	85 ; 85 ; 95 ; 99	
TRAIL + CZ	4	76 ; 81 ; 88 ; 99	
TRAIL + CN	4	91 ; 94 ; 95 ; 102	
TRAIL + CZN	4	82 ; 99 ; 102 ; 104	

FADD/ TRADD _{DKO}	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	9	0 ; 0 ; 0 ; 1 ; 1 ; 1 ; 2 ; 2 ; 3	0,00001 ; 0,00007 ; 0,0008 ; 0,001 ; 0,001 ; 0,002 ; 0,002 ; 0,005 ; 0,02
TNF + Z	4	0 ; 1 ; 21 ; 26	0,00003 ; 0,0003 ; 0,003 ; 0,02
TNF + N	12	54 ; 57 ; 63 ; 65 ; 65 ; 66 ; 66 ; 70 ; 73 ; 75 ; 81 ; 86	
TNF + ZN	13	84 ; 87 ; 87 ; 91 ; 91 ; 94 ; 96 ; 100 ; 100 ; 101 ; 101 ; 105 ; 108	
TNF + C	3	0 ; 5 ; 44	0,002 ; 0,01 ; 0,5
TNF + CZ	3	0 ; 1 ; 20	0,000004 ; 0,0008 ; 0,02
TNF + CN	3	84 ; 84 ; 90	
TNF + CZN	8	86 ; 89 ; 96 ; 99 ; 100 ; 101 ; 106 ; 110	
TRAIL	5	53 ; 61 ; 80 ; 86 ; 91	
TRAIL + Z	4	0 ; 14 ; 36 ; 40	1,1 ; 1,7 ; 1,7 ; 64
TRAIL + N	12	56 ; 56 ; 63 ; 65 ; 69 ; 70 ; 71 ; 77 ; 84 ; 86 ; 93 ; 99	
TRAIL + ZN	13	80 ; 80 ; 82 ; 85 ; 86 ; 90 ; 91 ; 91 ; 94 ; 96 ; 100 ; 100 ; 101	
TRAIL + C	6	54 ; 55 ; 55 ; 60 ; 85 ; 94	
TRAIL + CZ	5	0 ; 14 ; 19 ; 42 ; 47	0,2 ; 0,5 ; 0,6 ; 3,2 ; 4,1
TRAIL + CN	5	60 ; 60 ; 64 ; 78 ; 83	
TRAIL + CZN	8	81 ; 85 ; 87 ; 90 ; 92 ; 92 ; 97 ; 110	

TRADD/ RIPK1 _{DKO}	n=	%	EC ₅₀ (ng/ml)
TNF	19	85 ; 92 ; 94 ; 95 ; 98 ; 98 ; 99 ; 100 ; 100 ; 100 ; 103 ; 103 ; 104 ; 104 ; 105 ; 105 ; 105 ; 108 ; 108	
TNF + Z	14	71 ; 72 ; 92 ; 94 ; 95 ; 95 ; 95 ; 100 ; 101 ; 104 ; 104 ; 105 ; 106 ; 109	
TNF + N	17	69 ; 73 ; 73 ; 80 ; 84 ; 88 ; 88 ; 94 ; 94 ; 95 ; 95 ; 95 ; 97 ; 100 ; 104 ;	

Anhang

		106 ; 110	
TNF + ZN	14	86 ; 87 ; 93 ; 94 ; 95 ; 97 ; 98 ; 98 ; 101 ; 101 ; 102 ; 103 ; 106 ; 107	
TNF + C	15	71 ; 74 ; 78 ; 88 ; 88 ; 90 ; 94 ; 94 ; 94 ; 97 ; 97 ; 97 ; 98 ; 101 ; 102	
TNF + CZ	9	79 ; 82 ; 94 ; 95 ; 96 ; 96 ; 101 ; 102 ; 104	
TNF + CN	10	75 ; 76 ; 85 ; 85 ; 90 ; 92 ; 98 ; 102 ; 106 ; 110	
TNF + CZN	7	82 ; 90 ; 90 ; 92 ; 100 ; 106 ; 107	
TRAIL	14	52 ; 56 ; 59 ; 61 ; 75 ; 81 ; 83 ; 83 ; 84 ; 87 ; 91 ; 90 ; 90 ; 99	
TRAIL + Z	9	70 ; 93 ; 93 ; 94 ; 98 ; 100 ; 101 ; 103 ; 105	
TRAIL + N	8	52 ; 62 ; 63 ; 66 ; 67 ; 71 ; 77 ; 81	
TRAIL + ZN	9	95 ; 96 ; 96 ; 97 ; 98 ; 101 ; 102 ; 103 ; 105	
TRAIL + C	4	0 ; 0 ; 13 ; 23	0,1 ; 0,4 ; 2,9 ; 4,3
TRAIL + CZ	4	83 ; 89 ; 98 ; 105	
TRAIL + CN	4	1 ; 4 ; 7 ; 11	0,3 ; 0,9 ; 1,6 ; 3,7
TRAIL + CZN	3	93 ; 100 ; 109	

casp-8_{KO}	n=	%	EC₅₀ (ng/ml)
TNF	5	0 ; 0 ; 0 ; 0 ; 3	0,00007 ; 0,007 ; 0,007 ; 0,01 ; 0,04
TNF + Z	5	4 ; 15 ; 15 ; 18 ; 38	0,002 ; 0,004 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,02
TNF + N	8	87 ; 93 ; 93 ; 96 ; 102 ; 102 ; 104 ; 108	
TNF + ZN	9	83 ; 95 ; 96 ; 97 ; 100 ; 103 ; 106 ; 106 ; 109	
TNF + C	3	0 ; 3 ; 15	0,001 ; 0,002 ; 0,003
TNF + CZ	3	0 ; 2 ; 46	0,1 ; 0,1 ; 0,2
TNF + CN	8	62 ; 75 ; 87 ; 88 ; 92 ; 94 ; 99 ; 108	
TNF + CZN	6	94 ; 94 ; 96 ; 96 ; 103 ; 106	
TRAIL	5	1 ; 2 ; 14 ; 15 ; 35	2,5 ; 3,7 ; 4,2 ; 4,7 ; 14
TRAIL + Z	5	0 ; 1 ; 3 ; 7 ; 8	2 ; 3,7 ; 3,9 ; 4,7 ; 7
TRAIL + N	4	89 ; 92 ; 108 ; 108	
TRAIL + ZN	4	85 ; 88 ; 100 ; 100	
TRAIL + C	6	0 ; 0 ; 1 ; 19 ; 19 ; 26	0,4 ; 3 ; 4,1 ; 4,3 ; 4,3 ; 4,5
TRAIL + CZ	4	8 ; 11 ; 22 ; 34	4,1 ; 4,1 ; 4,3 ; 5,7
TRAIL + CN	5	86 ; 86 ; 89 ; 90 ; 92	
TRAIL + CZN	4	91 ; 99 ; 104 ; 104	

n= Anzahl der Experimente ; %= Vitalität; EC₅₀= Konzentration bei 50% Vitalität; C= CHX
N= Necrostatin-1 ; Z= ZVAD

9.2. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
α	Alpha oder Anti
°C	Grad Celsius
à	je
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2`-Amino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADP	Adenosindiphosphat
Apaf-1	<i>Apoptosis-protease-activating factor 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
APRIL	<i>A proliferation-inducing ligand</i>
AS	Aminosäure
BAFF	<i>B cell activating factor</i>
BAFFR	<i>B cell activating factor receptor</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist / killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-like protein 4</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCMA	<i>B-cell maturation antigen</i>
BH3	<i>Bcl-2 homology domain 3</i>
Bid	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
bzw.	Beziehungsweise
C (CHX)	Cycloheximid
ca.	Circa
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CAML	<i>Calcium modulating ligand</i>
Caspase (casp.)	<i>Cysteiny aspartat specific proteinase</i>
CD95	<i>Cluster of differentiation 95</i>
clAP1/2	<i>Cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2</i>
CRD	<i>Cysteine-rich domain</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CYLD	Cylin
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DcR	<i>Decoy receptor</i>
DD	<i>Death domain</i>
Da	Dalton
DED	<i>Death effector domain</i>
d.h.	Das heißt
DISC	<i>Death inducing signaling complex</i>
DKO	Doppel-Knockout
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DR	<i>Death receptor</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EC ₅₀	<i>Half maximal effective concentration</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EtOH	Ethanol
FADD	<i>Fas associated death domain</i>
Fas (L)	<i>First apoptosis signal / CD95 (ligand)</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable region</i>
FCS	<i>Fetal calf serum / fötales Kälberserum</i>
FGF1/2	Fibroblast growth factor 1/2
fl	full lenght = volle Länge
FLICE	<i>FADD-like IL-1β-converting enzyme</i>

Anhang

FLIP _L	<i>FLICE-like inhibitory protein long</i>
Fn14	<i>FGF1/2 inducible</i>
g	Gramm
h	<i>Hour(s) / Stunde(n)</i>
H ₂ O	Wasserstoffhydroxid (Wasser)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Hydrogenchlorid (Salzsäure)
HOIL-1L	<i>Haem-oxidized IRP2 ubiquitin ligase-1</i>
HOIP	<i>HOIL-1-interacting protein</i>
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
IL	Interleukin
IκB	<i>Inhibitor of NFκB</i>
IKK	<i>Inhibitor of NFκB kinase</i>
IRP2	<i>iron-responsive element-binding proteins 2</i>
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LTα	<i>Lymphotoxin alpha</i>
LUBAC	<i>Linear ubiquitin chain assembly complex</i>
Lsg	Lösung
LV	Leervektor
M	Molar (mol/l)
M2	Anti-Flag Antikörper
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MLKL	<i>Mixed lineage kinase domain-like protein</i>
mM	Millimolar
n	Anzahl
N (nec-1)	Necrostatin-1
Na ⁺	Natrium-Ion
Na-Azid	Natriumazid
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natrium-dihydrogenphosphat
NEDD8	<i>Neddylin (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated protein 8)</i>
NEMO	<i>NFκB essential modifier</i>
NFκB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
ng	Nanogramm
NIK	<i>NFκB inducing kinase</i>
nm	Nanometer
n.s.	Nicht spezifisch
OPG	Osteoprogenin
OX40(L)	TNFRSF4 (ligand)
p	Phospho
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PARP	<i>poly(ADP-ribose)polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

Anhang

P/S	Penicillin / Streptomycin
pH	<i>Pondus Hydrogenii / potential Hydrogenii</i>
PLAD	<i>Preligand assembly domain</i>
RANK	<i>Receptor activator of NFκB</i>
RANKL	<i>RANK ligand</i>
RelB	<i>v-rel avainreticyloendotheliosis viral oncogene homology B</i>
RHIM	<i>RIP homotypic interaction motif</i>
RIPK 1/3	<i>Receptor interacting protein kinase 1/3</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institut Zellkulturmedium
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat / Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde(n)
SH3	<i>SRC homology 3 domain</i>
SHANK	<i>SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1</i>
SHARPIN	<i>SHANK-associated RH domain interacting protein</i>
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SMAC	<i>second mitochondria-derived activator of caspases</i>
SRC	<i>cellular sarcoma</i>
Tab.	Tabelle(n)
TAB1/2	<i>TAK1-binding protein</i>
TACI	<i>Transmembrane activator and CAML interactor</i>
TAK1	<i>TGFβ-activated kinase 1</i>
tBid	<i>truncated p15 BID</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	TBS Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGFβ	<i>Transforming growth factor-β</i>
THD	<i>TNF homology doamin</i>
TL1A	<i>TNF-like ligand 1A</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFα	<i>TNF alpha</i>
TNFR	TNF Rezeptor
TNFRSF	TNF-Rezeptor-Superfamilie
TNFSF	TNF-Superfamilie
TRAF	<i>TNFR associated factor</i>
TRADD	<i>TNFR associated death domain</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
TRAILR	TRAIL-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEAK	<i>TNF-like weak inducer of apoptosis</i>
u.a.	Unter anderem
Ub	Ubiquitin
üN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v / v	<i>volume per volume</i>
VEGI	<i>Vascular endothelial growth inhibitor</i>
vs	Versus
w / v	<i>Weight per volume</i>
wt	Wildtyp

Anhang

XIAP

Z (ZVAD)

z.B.

ZVAD-fmk

μg

μl

μM

μm

X-linked IAP

ZVAD-fmk

Zum Beispiel

N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-keton

Mikrogramm

Mikroliter

Mikromolar

Mikrometer

9.3. Abbildungsverzeichnis

Abb.1.2.1 TNFR1 Komplexbildung und anschließende Aktivierung vom NFκB Signalweg, Apoptose und Nekroptose.....	12
Abb.1.2.2 TRAILR1/2 DISC-induzierter NFκB Signalweg, Apoptose und Nekroptose	13
Abb.1.3.1 Klassischer vs. alternativer NFκB-Signalweg.....	15
Abb.1.3.2 Extrinsische vs. intrinsische Apoptose.....	19
Abb.1.3.3 Zellulärer Verfall durch Apoptose vs. Nekrose.....	21
Abb.4.1.1 TNF- und TRAIL-induzierte Caspase-Aktivierung in HeLa-LV Zellen und HeLa-RIPK3 Zellen.....	36
Abb.4.1.2 TNF- und TRAIL-induzierte RIPK1-Aktivierung in HeLa-LV Zellen und HeLa-RIPK3 Zellen.....	37
Abb.4.1.3 Toxizitäts-Assay mit TNF- und TRAIL-stimulierten HeLa-LV Zellen und HeLa-RIPK3 Zellen.....	39
Abb.4.1.4 TNF- bzw. TRAIL-stimulierte und CHX- und / oder ZVAD-inkubierte HeLa-RIP3 (Kontrolle) Zellen	40
Abb.4.2.1 Nachweis der Deletion bei Einzel-KO Zelllinien	41
Abb.4.2.2 Toxizitäts-Assay von TNF- und TRAIL-stimulierten Einzel-DD-Adapterprotein-KO Zellen	43
Abb.4.2.3 Einzel-DD-Adapterprotein-KO Zellen stimuliert mit abnehmenden Konzentrationen an TNF oder TRAIL	45
Abb.4.2.4 Caspase-Aktivierung in TNF- und TRAIL-stimulierten Kontrollzellen und Einzel-KO Zellen.....	46
Abb.4.2.5 Western Blot Analyse von p-RIPK1 bei TNF-, TNF/CHX/ZVAD- oder TRAIL/CHX/ZVAD-stimulierten Kontrollzellen und FADD _{KO} Zellen.....	47
Abb.4.2.6 Phosphorylierung von RIPK1 in Kontrolle und Einzel-KO Zellen	48
Abb.4.2.7 Apoptose- und Nekroptose-Induktion in TRADD _{KO} Zellen	49
Abb.4.2.8 IL-8 Produktion nach TNF-, TRAIL- oder TWEAK-Stimulation von Einzel-DD-Adapterprotein-KO Zellen.....	51
Abb.4.3.1 Nachweis der Doppel- <i>Knockouts</i> von TRADD und RIPK1	52
Abb.4.3.2 Vitalitätsuntersuchung von TNF- und TRAIL-stimulierten TRADD/RIPK1 _{DKO} Zellen	53
Abb.4.3.3 TRAIL-Titration bei TRADD/RIPK1 _{DKO} Zellen	53
Abb.4.3.4 Caspase-Aktivierung nach TNF- und TRAIL-Stimulation in TRADD/RIPK1 _{DKO} Zellen	55

Abb.4.3.5 Ausbleibende RIPK1-Phosphorylierung in TNF- oder TRAIL-stimulierten TRADD/RIPK1 _{DKO} Zellen	56
Abb.4.3.6 NFκB-Signalweg-Aktivierung bei TRADD _{KO} Zellen und RIPK1 _{KO} Zellen ..	57
Abb.4.3.7 Verringerte IL-8 Produktion von stimulierten TRADD/RIPK1 _{DKO} Zellen.....	58
Abb.4.4.1 Nachweis des Doppel- <i>Knockouts</i> von FADD und RIPK1 in FADD/RIPK1 _{DKO} Zellen und von FADD und TRADD in FADD/TRADD _{DKO} Zellen	58
Abb.4.4.2 Kein Zellsterben von TNF- und TRAIL-stimulierten FADD/RIPK1 _{DKO} Zellen und Zelltodinduktion in TNF/CHX-stimulierten FADD/TRADD _{DKO} Zellen.....	59
Abb.4.4.3 Toxizitäts-Assay von TNF- und TRAIL-stimulierten FADD/RIPK1 _{DKO} Zellen und FADD/TRADD _{DKO} Zellen	60
Abb.4.4.4 Keine Caspase-Aktivierung nach TNF- oder TRAIL-Stimulation in FADD/RIPK1 _{DKO} Zellen	62
Abb.4.4.5 Caspase-Aktivierung in TNF-stimulierten FADD/TRADD _{DKO} Zellen.....	62
Abb.4.4.6 IL-8-Induktion bei TNF-, TRAIL- und TWEAK-stimulierten FADD/TRADD _{DKO} Zellen und FADD/RIPK1 _{DKO} Zellen.....	63
Abb.4.5.1 Nachweis des <i>Knockouts</i> von FADD und Caspase-8	64
Abb.4.5.2 TNF- und TRAIL-induzierter Zelltod in casp-8 _{KO} Zellen und TNF-induzierter Zelltod in FADD _{KO} Zellen	65
Abb.4.5.3 Untersuchung der TNF- und TRAIL-induzierten Caspase-Aktivierung in FADD _{KO} Zellen und casp-8 _{KO} Zellen	66
Abb.4.5.4 TNF- und TRAIL-induzierte RIPK1-Phosphorylierung in FADD _{KO} Zellen und casp-8 _{KO} Zellen.....	67
Abb.4.5.5 TNF- und TRAIL-induzierte IL-8-Produktion in FADD _{KO} Zellen und casp-8 _{KO} Zellen	68
Abb.4.6.1 TWEAK verstärkt die TNF- und TRAIL-induzierte Nekroptose	69
Abb.4.6.2 TWEAK verstärkt die TNF- und TRAIL-induzierte Nekroptose in Kontrollzellen und TRADD _{KO} Zellen.....	74
Abb.4.6.3 TWEAK-Einfluss auf TNF- und TRAIL-stimulierte FADD/RIPK1 _{DKO} Zellen	75
Abb.5.4 Modell von TNFR1 und TRAIL Todesrezeptor 1/2 Signalkaskade	85

9.4. Tabellenverzeichnis

Tab.2.1 HeLa-RIPK3 Varianten.....	23
Tab.2.2.1 Primär Antikörper	23
Tab.2.2.2 Sekundär Immunglobulin HRP- <i>linked</i> Antikörper	24
Tab.2.3 TNF-Fusionsproteine.....	24
Tab.2.4 Angesetzte Lösungen und Puffer	25
Tab.2.5 Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmedien	26
Tab.2.6 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	27
Tab.2.7 Computerprogramme	29
Tab.4.1 EC ₅₀ Werte von HeLa Zellen und HeLa-RIPK3 Zellen.	39
Tab.4.2 EC ₅₀ Werte der Einzel-DD-Adapterprotein-KO Zellen.	44
Tab.4.3 EC ₅₀ Werte von TRAIL-stimulierten TRADD/RIPK1 _{DKO} Zellen.....	54
Tab.4.4 Zellvitalität von FADD/RIPK1 _{DKO} Zellen und FADD/TRADD _{DKO} Zellen sowie EC ₅₀ Werte von stimulierten FADD/TRADD _{DKO} Zellen.....	60
Tab.4.5 TNF- und TRAIL-induzierter Zelltod in casp-8 _{KO} Zellen	65
Tab.4.6 EC ₅₀ Werte von TWEAK-vorinkubierten TNF- und TRAIL-stimulierten Zellen.	70
Tab.5.3 Zelltodinduktion bei den einzelnen HeLa-RIPk3- <i>Knockout</i> -Zelllinien nach TNF- und TRAIL-Stimulation.	83
Tab.9.1.1 TNF- und TRAIL-Stimulation von HeLa und HeLa-RIPK3-Varianten	94
Tab.9.1.2 TWEAK-Inkubation in Kombination mit TNF- und TRAIL-Stimulation von HeLa und HeLa-RIPK3-Varianten	101

10. Publikationen

- S. Fullsack, A. Rosenthal, H. Wajant, D. Siegmund, *Cell Death Dis.* 2019 Feb 11;10(2):122. doi: 10.1038/s41419-019-1396-5.
- M. A. Anany *et al.*, *Cell Death Dis.* 2018 Oct 22;9(11):1084. doi: 10.1038/s41419-018-1137-1.
- Lang, S. Fullsack, H. Wajant, *Front Immunol.* 2018 Apr 23;9:793. doi: 10.3389/fimmu.2018.00793. eCollection 2018.
- Lang *et al.*, *J Biol Chem.* 2016 Mar 4;291(10):5022-37. doi: 10.1074/jbc.M115.683946. Epub 2015 Dec 31.
- S. Bittner *et al.*, *FEBS J.* 2016 Jan;283(2):323-36. doi: 10.1111/febs.13576. Epub 2015 Nov 24.